

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

ALICE DAMINELLI VALENTIM

**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA**
(Danio rerio, Hamilton-Buchanan, 1822) **SUBMETIDO A ADMINISTRAÇÃO AGUDA
DE ETANOL**

CRICIÚMA

2018

ALICE DAMINELLI VALENTIM

**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA
(*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1822) SUBMETIDO A ADMINISTRAÇÃO AGUDA
DE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para
obtenção do grau de Bacharel no curso de Ciências
Biológicas da Universidade do Extremo Sul
Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico

CRICIÚMA

2018

ALICE DAMINELLI VALENTIM

**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A
ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA
(*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1822) SUBMETIDO A ADMINISTRAÇÃO AGUDA
DE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Neurociências.

Criciúma, 20 de novembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico – Universidade do Extremo Sul Catarinense - Orientador

Prof. Dra. Geovana Savi Dagostim – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. MsC. Meline Oliveira dos Santos Morais – Universidade do Extremo Sul Catarinense

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente o apoio e compreensão dos meus pais, que possibilitaram a minha caminhada até aqui. Obrigada à minha família, meus irmãos Aline, Alisson, Jackson e Joaquim por sempre me incentivarem a continuar e a nunca desistir dessa jornada, apesar de todas as dificuldades.

Agradeço ao meu professor orientador Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico pela orientação, apoio e confiança no decorrer deste projeto. Obrigada pela oportunidade incrível de desenvolver este estudo. Serei eternamente grata por todo o conhecimento compartilhado.

À equipe do Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia (Cissa, Carol, Samira, Niauny) por toda ajuda e paciência na realização dos experimentos, para que assim, tudo isso fosse possível.

Às minhas amigas que tive a sorte de encontrar ao longo destes anos da graduação, Bianca, Letícia Silva, Letícia Viana e Thuany. Os momentos tornam-se melhores ao lado de vocês. E aos meus amigos, Tiago, Kálita, Marieli e Ayumi que sempre acreditaram na minha capacidade e me deram muita força.

Agradeço também às professoras participantes da banca, Prof. Dra. Geovana Savi Dagostim e Prof. MsC. Meline Oliveira dos Santos Morais, por aceitarem o convite.

E por fim, agradeço a todos que contribuíram para a minha chegada até aqui.

“Os sonhadores mudam o mundo. Mentas curiosas nos impulsionam para a frente.”

Anne With An E

RESUMO

O alcoolismo é tido como um dos problemas de saúde pública de ordem mundial mais comuns e onerosos. Tratando-se de uma substância psicoativa, a exposição ao álcool pode levar a um desequilíbrio no sistema nervoso central (SNC), promovendo alterações bioquímicas e fisiológicas, além de ocasionar mudanças comportamentais e cognitivas. O sistema colinérgico tem sido associado com as funções cognitivas e o processamento das funções sensoriais. Além disso, o etanol (EtOH) e seu metabólito acetaldeído estão relacionados a efeitos deletérios através do aumento na formação das espécies reativas de oxigênio. Devido às descobertas acerca dos efeitos dos radicais livres no organismo, há grande interesse no estudo de antioxidantes, que possuem papel importante no seu combate. Usualmente a N-acetilcisteína (NAC) tem sido utilizada no tratamento de intoxicação hepática por paracetamol, possuindo ação mucolítica e no tratamento do HIV, além de apresentar eficácia em pacientes com a doença de Alzheimer. No cenário científico, o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), peixe-zebra, também conhecido como “paulistinha” tem sido um modelo promissor em pesquisas científicas, principalmente por possuir 70% de equivalência com o genoma humano, tornando-se um modelo consagrado em estudos toxicológicos, genéticos e patológicos, incluindo o abuso do álcool. Sabe-se que o etanol é capaz de alterar o padrão de atividade e expressão da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro do peixe-zebra, enzima essa que possui papel fundamental no funcionamento das sinapses colinérgicas presentes em nosso sistema nervoso central e periférico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar efeitos *in vitro* e *in vivo* da exposição aguda ao etanol na sinalização colinérgica sob a atividade da AChE e sua associação com a possível modulação da NAC em cérebro de peixe-zebra. Para análise *in vivo* os animais foram divididos em oito grupos experimentais consistindo em uma pré-exposição de 10 minutos seguido de 60 minutos: Controle (água seguido de água); EtOH (água seguido de etanol 1%); NAC 0,1 (NAC 0,1 mg/l seguido de água); NAC 1 (NAC 1 mg/l seguido de água); NAC 10 (NAC 10 mg/l seguido de água) e NAC-grupo (NAC 0,1; 1,0; 10 mg/l seguido de etanol 1%). O grupo etanol promoveu um aumento na atividade da AChE em 29% e quando pré-tratado com NAC 10 mg/l foi observada uma reversão da atividade da AChE em 34%, similar ao grupo controle. Para a análise *in vitro*, a atividade da AChE foi avaliada com a adição de diferentes concentrações de NAC (0,01µM a 10µM) e não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima em tecido cerebral de peixe-zebra. Foi possível relatar que a NAC preveniu os efeitos da exposição aguda ao etanol através de parâmetros de avaliação do sistema colinérgico no peixe-zebra. Tais resultados permitem compreender que a exposição aguda ao etanol influencia no sistema colinérgico através do aumento da atividade da AChE em tecido cerebral de peixe-zebra e isso pode estar relacionado a geração de espécies reativas de oxigênio. Desta forma nossa perspectiva é avaliar parâmetros de estresse oxidativo.

Palavras-chave: EtOH, exposição aguda, peixe-zebra, NAC, sistema colinérgico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da N-acetilcisteína	17
Figura 2 – Representação do delineamento experimental <i>in vivo</i>	21
Figura 3 – Efeito da exposição aguda ao etanol sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro total de peixe-zebra..	24
Figura 4 – Efeito da exposição aguda a N-acetilcisteína nas concentrações de 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L e 1000µg/L sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro total de peixe-zebra.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina (do inglês, *acetylcholine*)

AChE - Acetilcolinesterase (do inglês, *acetylcholinesterase*)

ANOVA – Análise de variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ChAT – Colina acetiltransferase (do inglês, *choline acetyltransferase*)

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

NAC – N-acetilcisteína

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 METABOLISMO DO ETANOL	14
3.2 SISTEMA COLINÉRGICO: ATIVIDADE DA AChE	15
3.3 N-ACETILCISTEÍNA	17
3.4 PEIXE-ZEBRA	18
4 MATERIAIS E METODOS	20
4.1 ANIMAIS	20
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
4.2.1 Tratamento <i>in vivo</i>	20
4.2.2 Exposição <i>in vitro</i>	22
4.2.3 Atividade da AChE.....	22
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXO(S).....	39
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Uso Animal.	40

1 INTRODUÇÃO

O alcoolismo é tido como um dos problemas de saúde pública de ordem mundial mais comuns e onerosos (HIPOLITO et al., 2007). O seu consumo, está relatado em diversas sociedades e culturas em rituais festivos e religiosos durante séculos (MARTINS, 2009). Acredita-se que a bebida alcoólica teve origem no período Neolítico (de 8000 a.C. até 5000 a.C.), a partir do processo de fermentação natural proveniente do arroz, trigo, cevada, mel e frutas e que de alguma forma tornou-se um incentivo para os caçadores-coletores se estabelecerem e domesticarem estes grãos (MCGOVERN, 2009; CISA, 2018). Na fermentação natural, os microrganismos produzem etanol (EtOH). Quando elevada concentração de glicose, utilizam o ácido pirúvico da via glicolética, o qual é descarboxilado para produzir CO₂ e acetaldeído, que é reduzido a NADH para produzir NAD⁺ e etanol (TORTORA et al., 2010). Posteriormente, a produção de bebidas alcoólicas sofreu modificações, tanto na sua composição como na sua utilização pelas diferentes sociedades. A partir do século 20, o uso excessivo do álcool começou a ser rotulado como doença ou desordem e países como a França determinaram a maioria de 18 anos para o seu consumo (CISA, 2018). Em 1920 é decretado a Lei Seca nos Estados Unidos, que proibiu a produção, transporte, importação e exportação de bebidas alcoólicas em todos os estados até o ano de 1933 (RODRIGUES, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o alcoolismo como doença a partir de 1967, inclusive recomendando que os órgãos governamentais tratassem o assunto como demanda de saúde pública (CISA, 2018).

Somente em 2016, três milhões de mortes foram atribuídas ao uso nocivo do álcool, representando aproximadamente 5,3% de todas as mortes naquele ano (WHO, 2018). Segundo dados da OMS (2018), o Brasil é o quarto colocado no consumo de álcool puro para cada indivíduo na América do Sul com um total de 7,8 litros, permanecendo atrás do Chile (9,3L), Argentina (9,8L) e Uruguai (10,8L). Além disso, os custos que os acidentes no trânsito causam a sociedade são de aproximadamente R\$ 50, 000.000 bilhões de reais por ano, onde muitos possuem relação direta com o uso do álcool (IPEA, 2015). O seu consumo não só resulta na incidência de doenças, como também na evolução dos distúrbios que as pessoas já possuem, apresentando papel significativo em cerca de 200 tipos de doenças e transtornos (WHO, 2014). As categorias de doenças mais comuns que são parcialmente ou totalmente causadas pelo consumo do álcool incluem doenças infecciosas, uma série de tipos de cânceres, diabetes, doenças neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares, hepatopatia, além de lesões premeditadas ou não (REHM, 2011). Salienta-se, que além dos efeitos individuais

causados pelo abuso do álcool, o seu uso está relacionado a danos à saúde de outros, causadas por dirigir sob influência do álcool, casos de abuso ou negligência de menores, além da violência doméstica, acarretando em custos aos serviços de saúde (REHM, 2011).

Na falta de uma base cultural ideal para o consumo de substâncias psicoativas, faz-se necessário a adoção de políticas públicas através do Estado, da qual possuem dois principais posicionamentos: o proibicionismo e a redução de danos (ALVES, 2009). As políticas proibicionistas concentram esforços na redução da oferta de drogas por intermédio de repressão e criminalização, enquanto a política de redução de danos foca na diminuição de danos à saúde do usuário, problemas sociais e econômicos sem necessariamente impedir o consumo (TAMMI; HURME, 2006; WODAK, 2008). Tratando-se de uma substância psicoativa, a exposição ao álcool pode levar a um desequilíbrio no sistema nervoso central (SNC), promovendo alterações bioquímicas e fisiológicas, além de ocasionar mudanças comportamentais e cognitivas (BERNARDO, 2017). O consumo de etanol pode alterar a função neuronal devido a modificação de rotas de transdução de sinais mediadas por neurotransmissores, como exemplo a acetilcolina. A exposição ao etanol pode resultar em alterações no sistema colinérgico, como na atividade da acetilcolinesterase, causando importantes mudanças na neurotransmissão colinérgica e no controle da transmissão de impulsos nervosos.

Sabendo-se que não há um tratamento específico que possa prevenir o desenvolvimento de patologias provenientes do consumo do etanol, o estudo de possíveis formas de prevenção, tornam-se necessárias. Neste sentido, o tratamento com N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante conhecido, que tem sido usualmente utilizado para intoxicação hepática por paracetamol, também é conhecido como um neuroprotetor em distúrbios psiquiátricos e doenças neurodegenerativas. Sua ação está envolvida com o sistema colinérgico e desta forma, será estudada como um agente neuroprotetor para a exposição aguda por etanol em peixe-zebra, um modelo animal consolidado para diversas áreas da ciência, incluindo a neurociências.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da exposição aguda ao etanol na sinalização colinérgica de acordo com a atividade da AChE e sua associação com a possível modulação da N-acetilcisteína em cérebro de peixe-zebra.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos *in vivo* da exposição aguda a N-acetilcisteína por meio da avaliação da atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra;
- Investigar os efeitos *in vitro*, em concentrações de 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L e 1000µg/L de N-acetilcisteína, sobre a atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra;
- Analisar o efeito do pré-tratamento da N-acetilcisteína sob a atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra submetido a administração aguda de etanol.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 METABOLISMO DO ETANOL

O metabolismo é um processo do corpo responsável na conversão de substâncias ingeridas em outros compostos, tornando-as em mais ou menos tóxicas (NIAAA, 1997). Um dos processos envolvidos no metabolismo, é a oxidação. Devido às suas propriedades hidrofílica e hipofílica, a ação do etanol está geralmente associada à sua alta solubilidade, tornando-se uma molécula facilmente distribuída na corrente sanguínea para a maioria dos órgãos e sistemas (BERTELI, 2017). Após o consumo e no início da absorção do etanol no estômago e intestino, a sua degradação metabólica irá ocorrer por intermédio de múltiplas vias enzimáticas e não enzimáticas, produzindo o acetaldeído, seu principal metabólito (BERNARDO, 2017). O fígado é o órgão mais vulnerável aos efeitos danosos do consumo de bebidas alcoólicas, visto que, a maior parte do álcool consumido será metabolizado nele através da oxidação (QUERTEMONT; TAMBOUR; TIRELLI, 2005). A taxa de velocidade do metabolismo do etanol irá variar de acordo com a quantidade consumida e o total de enzimas metabolizadoras presentes, sujeitas a variação em cada indivíduo (NIAAA, 1997). No fígado, existem três sistemas metabólicos capazes de realizar a oxidação do etanol, sendo elas a álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1), uma série de enzimas especializadas presentes no citosol de diferentes tecidos, enzimas do citocromo P450 (CYP450; EC 1.14.14.1) dentro do retículo endoplasmático e catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) dentro dos peroxissomos (QUERTEMONT; TAMBOUR; TIRELLI, 2005; EDENBERG, 2007; BERTELI, 2017). A enzima ADH está presente principalmente nas células hepáticas, atuando no início do processo de metabolização do etanol em acetaldeído no citosol (BERNARDO, 2017). As enzimas ADH estimulam a oxidação do etanol em acetaldeído, acoplando essa oxidação com a redução da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) em NADH e o CYP450 oxida a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em NADP⁺ (RIVEROS-ROSAS; JULIÁN-SÁNCHEZ; PIÑA, 1997; BERNARDO, 2017). O terceiro e último sistema é encontrado nos peroxissomos das células hepáticas, onde a oxidação de uma molécula de etanol em acetaldeído é ligada com a decomposição simultânea de uma molécula de peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada pela enzima catalase (CAT) (RIVEROS-ROSAS; JULIÁN-SÁNCHEZ; PIÑA, 1997). Uma pequena quantidade não metabolizada do álcool pode ser medida na respiração e na urina (NIAAA, 1997). Os três sistemas funcionam simultaneamente na metabolização do etanol, porém com atividades e afinidades distintas.

O consumo crônico do etanol pode afetar habilidades comportamentais e sociais, interferindo no SNC através dos sistemas de neurotransmissores de aminoácidos, especialmente os excitatórios (aspartado e glutamato) e os inibitórios (ácido γ -aminobutírico [GABA] e taurina) (DE WITTE, 2004; AGOSTINI et al., 2017). O desequilíbrio nos diferentes aminoácidos e neurotransmissores, quando se há uma redução ou eliminação no consumo de etanol, são expressos comportalmente na forma de abstinência, principalmente através do glutamato e do GABA (DE WITTE, 2004). Além do sistema excitatório e inibitório, o sistema dopaminérgico, opioide e purinérgico demonstraram alteração quando expostos ao etanol (CHASTAIN, 2006), bem como o sistema colinérgico (ARENDRT et al., 1989; PAPALE et al., 2008; AGOSTINI et al., 2017; BERTELLI, 2017). Segundo Arendt e colaboradores (1989), a administração oral de etanol 20% resultou em reduções profundas do conteúdo da acetilcolina, captação da colina, atividade da colina acetiltransferase, da acetilcolinesterase, piruvato descarboxilase, teor de noradrenalina, serotonina e, em menor grau, dopamina em todo o cérebro.

3.2 SISTEMA COLINÉRGICO: ATIVIDADE DA AChE

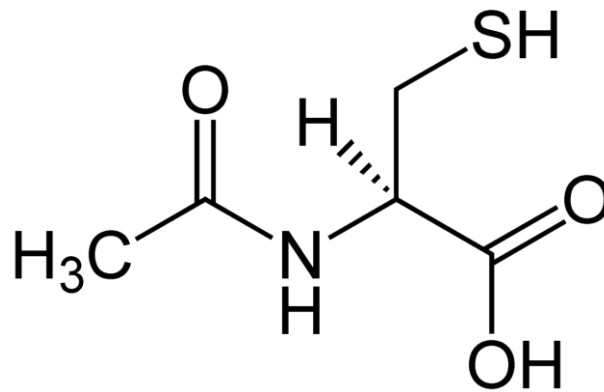
Os neurônios colinérgicos, bem como suas projeções são amplamente distribuídos por todo o SNC, com um papel fundamental em muitas funções vitais, como aprendizado, memória e controle do fluxo sanguíneo cerebral (WINKLER et al., 1995). A enzima AChE é responsável por um dos mecanismos mais importantes para manter a correta atividade colinérgica (GONÇALVES et al., 2010). Esta enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica e nas junções neuromusculares (SOREQ, 2001). A ACh é um neurotransmissor do sistema colinérgico e é considerado um dos mais importantes no cérebro, com atividade em todo o córtex, nos gânglios e no prosencéfalo (HAMPEL et al., 2018). A ACh é formada no axônio terminal dos neurônios pela colina-o-acetil-transferase (ChAT) produzida a partir de acetil-coenzima A ACh depois de sintetizada é transportada e armazenada em vesículas sinápticas (VENTURA et al., 2009). A ACh desempenha o papel de mediador químico de sinapses do SNC e periférico (SNP) envolvido em aspectos ligados ao comportamento, atenção, aprendizado e memória (VENTURA et al., 2009). Quando o impulso nervoso chega ao axônio terminal, a ACh sofre exocitose, sendo liberada na região sináptica, onde é atraída e interage com os receptores colinérgicos do próximo neurônio (PETRONILHO et al., 2011; BABADI et al., 2014). Sua ação somente será cessada quando hidrolisada na fenda sináptica pela AChE em acetato e colina, onde a última é reabsorvida

pelo primeiro neurônio para ser reconvertida em ACh, permitindo assim sua reutilização nos impulsos nervosos (PETRONILHO et al., 2011). A AChE é uma enzima pertencente à família das colinesterases e é alvo para o desenvolvimento de novas drogas, dado o papel importante que desenvolve no funcionamento das sinapses colinérgicas presentes no SNC e SNP (PETRONILHO et al., 2011; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). No SNP, a AChE é responsável pelo controle nos impulsos nervosos, dos batimentos cardíacos, pela contração de músculos lisos, dilatação de vasos sanguíneos e no SNC modula o controle motor, a memória e cognição (CHIERRITO, 2016). Sabe-se que o etanol é capaz de alterar o padrão de atividade e expressão da enzima AChE no cérebro do peixe-zebra (RICO et al., 2007). Enzima esta, que já possui o gene clonado e sequenciado, com atividade detectada em cérebro de peixe-zebra (SOARES, 2009). Os inibidores da AChE impedem a enzima colinesterase de degradar a ACh, aumentando tanto o nível quanto a duração da ação do neurotransmissor e podem ser divididos em dois grupos: irreversíveis e reversíveis (COLOVIC et al., 2013). A inibição da AChE tem sido amplamente estudada como biomarcador de neurotoxicidade, visto que, inibidores reversíveis possuem aplicações terapêuticas, enquanto os irreversíveis estão associados a efeitos tóxicos no organismo (COLOVIC et al., 2013). A interação da ACh com os receptores leva a continuidade da transmissão dos impulsos nervosos, porém o excesso de transmissão nervosa pode levar a problemas de funcionamento do corpo (PETRONILHO et al., 2011). Com a inibição da enzima AChE, o neurotransmissor ACh não pode ser hidrolisado resultando em uma quantidade anormal que leva a possíveis efeitos tóxicos no organismo (SOARES, 2009). A AChE tem uma atividade catalítica muito alta, isso porque cada molécula da enzima é capaz de degradar aproximadamente 25.000 moléculas do neurotransmissor ACh por segundo em colina e ácido acético (COSTA et al., 2016). A atividade normal da AChE no cérebro é imprescindível para o bom funcionamento do órgão, visto que as alterações na sua atividade geralmente estão acompanhadas de sinais de toxicidade neurocomportamental (BABADI et al., 2014). Bertrand e colaboradores (2001) clonaram e sequenciaram o gene responsável pela codificação da AChE em peixe-zebra, demonstrando que da sequência de 634 aminoácidos há uma similaridade de 62% com a dos mamíferos. A inibição da atividade da AChE foi constatada em peixes-zebra expostos a substâncias tóxicas (LIMA; ROQUE; ALMEIDA, 2013), e em contrapartida, o etanol foi responsável por um significativo aumento da atividade (RICO et al., 2007). O consumo crônico de etanol pode ocasionar prejuízos cognitivos, como disfunções na memória e aprendizado, e alterações no sistema colinérgico podem possuir relação com estas injúrias (TIWARI; CHOPRA, 2013).

3.3 N-ACETILCISTEÍNA

Usualmente a N-acetilcisteína (NAC) tem sido utilizada clinicamente no tratamento de intoxicação hepática por paracetamol, possuindo ação mucolítica e no tratamento do HIV, além de apresentar eficácia em pacientes com a doença de Alzheimer, melhorando a resposta imune (DEAN et al., 2011). A NAC é um tiol cuja fórmula química é $C_5H_9NO_3S$ (Figura 1), tem sido empregada como um precursor do aminoácido L-cisteína, aumentando as suas concentrações intracelulares e, portanto, da glutathiona reduzida (GSH) (ROVER-JUNIOR et al., 2001; PIVETTA, 2005).

Figura 1 – Estrutura da NAC.



Fonte: Soares (2011).

Após a absorção, a NAC é rapidamente metabolizada em cisteína, um precursor direto na síntese de glutathiona intracelular (SADOWSKA, 2012), utilizado para a síntese de proteínas (ROVER-JUNIOR et al., 2001; PIVETTA, 2005), auxiliando na biotransformação e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A GSH é um tripeptídeo que está presente em altas concentrações na maioria das células (MOLDEUS, 1986). Após a ingestão, a NAC passa por um metabolismo de primeira passagem pelas células do intestino delgado e fígado, sendo rapidamente absorvida quando ingerida por via oral (RIBEIRO, 2010). A GSH possui em sua estrutura três aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína e a NAC serve como um resíduo de cisteína capaz de aumentar a proteção celular ao estresse oxidativo, quando há baixa disponibilidade do mesmo (SHAHRIPOUR; HARRIGAN; ALEXANDROV, 2014).

Estudos demonstram que a coadministração da NAC é capaz de diminuir o estresse oxidativo, aumentando as enzimas antioxidantes (OZARAS et al., 2003). Estudos

investigativos sobre a doença de Alzheimer com camundongos, relatam que a NAC foi capaz de diminuir a atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral *in vitro* (COSTA et al., 2016a; COSTA et al., 2016b). Mocelin e colaboradores (2015) relatam que o pré-tratamento com NAC 1mg/L foi capaz de prevenir efeitos da exposição aguda ao etanol relacionados aos parâmetros de estresse oxidativo, bem como testes comportamentais, sugerindo que alterações comportamentais induzidas pelo etanol podem possuir relação com danos oxidativos no SNC. Além disso, a NAC é capaz de modular vários sistemas de neurotransmissores, como o glutamato e a dopamina (MOCELIN et al., 2015). Asevedo e colaboradores (2014) em uma revisão sistemática sobre tratamento de transtornos de abuso de substâncias, atestam que a NAC possui potencial frente a tratamentos de dependência, incluindo a cocaína e cannabis, envolvendo vias glutamatérgicas. Em ratos expostos a cádmio, a NAC preveniu a diminuição da atividade da ACh, bem como estresse oxidativo e aspectos relacionados a memória (GONÇALVES et al., 2010). Esta molécula também é descrita como um agente neuroprotetor em distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia e doenças neurodegenerativas, incluindo declínio cognitivo e funcional (DODD et al., 2013), com propriedades anti-inflamatórias, resultando na melhora sinérgica da memória (HABER et al., 2013), envolvendo assim, aspectos relacionados ao sistema colinérgico. As ações da NAC como um antioxidante e neuromodulador a tornam uma substância atraente para o estudo de um eventual papel protetor frente a neurotoxicidade causada pelo etanol.

3.4 PEIXE-ZEBRA

No cenário científico, o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), peixe-zebra, também conhecido como “paulistinha” tem sido um modelo promissor em pesquisas científicas, principalmente para análise de mutagênese e descoberta de novos medicamentos (GERLAI; LEE; BLASER, 2006). O peixe-zebra é um pequeno peixe ósseo, pertencente à família Cyprinidae, com três a quatro centímetros de comprimento e habita ambientes de água doce (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). O grande interesse na utilização destes organismos pode ser justificado por serem peixes de pequeno porte, que quando se encontra em condições adequadas uma única fêmea pode ovipositar centenas de ovos por fecundação, além de possuir fácil observação e manutenção (GERLAI; LEE; BLASER, 2006; ADW, 2011). Além disso, o peixe-zebra absorve facilmente substâncias dissolvidas na água, através das brânquias e de toda a sua superfície corporal, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais SNC está incluído (GERLAI; LEE; BLASER, 2006). Outro ponto considerável é de

que o genoma do peixe-zebra é totalmente sequenciado e possui de 70-80% de equivalência com o genoma humano (HOWE et al., 2013).

Esta espécie tem sido submetida a vários estudos desde os anos 30 e hoje mostra-se como um dos principais organismos modelos para a pesquisa biomédica (ENGESZER et al., 2007; BARRIONUEVO; FERNANDES; ROCHA, 2010). Em estudos anteriores, o peixe-zebra foi utilizado em testes para a avaliação dos efeitos da NAC em parâmetros comportamentais ligados a ansiedade, da qual o NAC apresentou propriedades anti-estresse e ansiolíticas (MOCELIN et al., 2015), além disso, é considerado um importante modelo para as descobertas de drogas psiquiátricas (KOKEL; PETERSON, 2008). Estudos recentes demonstraram que o peixe-zebra é um modelo adequado para análise de mecanismos básicos da inflamação em doenças inflamatórias humanas (FORN-CUNÍ et al., 2017). Em estudos com a exposição embrionária do peixe-zebra, o etanol foi capaz de promover sintomas conhecidos como síndrome do alcoolismo fetal, como malformações craniofaciais, anomalias cardíacas e problemas no desenvolvimento físico externo e interno (BILOTTA et al., 2004). Adicionalmente, estudos avaliam um eixo evolutivo conservado entre mamífero e peixe-zebra para resposta a hipóxia e ao estresse oxidativo em células neuronais, sugerindo que peixes e mamíferos possuem respostas semelhantes a esse evento (MUGONI et al., 2014). Diferentes sistemas de neurotransmissão já foram identificados em peixe-zebra, e de acordo com estudos de Arenzana e colaboradores (2005), parâmetros do sistema colinérgico de peixe-zebra já foram sequenciados e identificados. Ademais, pesquisas argumentam que a análise comportamental do peixe-zebra, incluindo exposição ao álcool, torna-se um alvo importante para análises ligadas a toxicod dependência e aos efeitos biológicos ao abuso de drogas (GERLAI et al., 2000; GERLAI, 2003).

Apesar da grande frequência e impacto, as doenças psiquiátricas e outras desordens do SNC estão entre as doenças mais inadequadamente tratadas, e nesse cenário, o peixe-zebra é um organismo efetivo para a descoberta de medicamentos (KOKEL; PETERSON, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os testes para análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção, unidade de Sinalização Neural e Psicofarmacologia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. Para a realização dos testes foram utilizados 83 peixe-zebra adultos e de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo shortfin, com idade de quatro meses pós fertilização para ambos os testes (*in vivo* e *in vitro*). Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e sendo posteriormente mantidos no Laboratório de Neurologia Experimental da UNESC, em aquários com água destilada, salinizada e continuamente aerada com um ciclo claro/escuro de 14/10h controlado por fotoperíodo (luzes acendem às 7h; luzes apagadas às 21h), por um período de duas semanas para aclimação. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com artêmias e/ou ração flocada. Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários com filtração mecânica auto-limpante e limpeza automática de resíduos sólidos a uma temperatura de 28°C, pH de 7,4 e uma condutividade de 500µS, com uma densidade de três animais por litro de água. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC (protocolo 023/2018-1, anexo A), obedecendo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal nº 465 de 23 de maio de 2013 (BRASIL, 2013).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

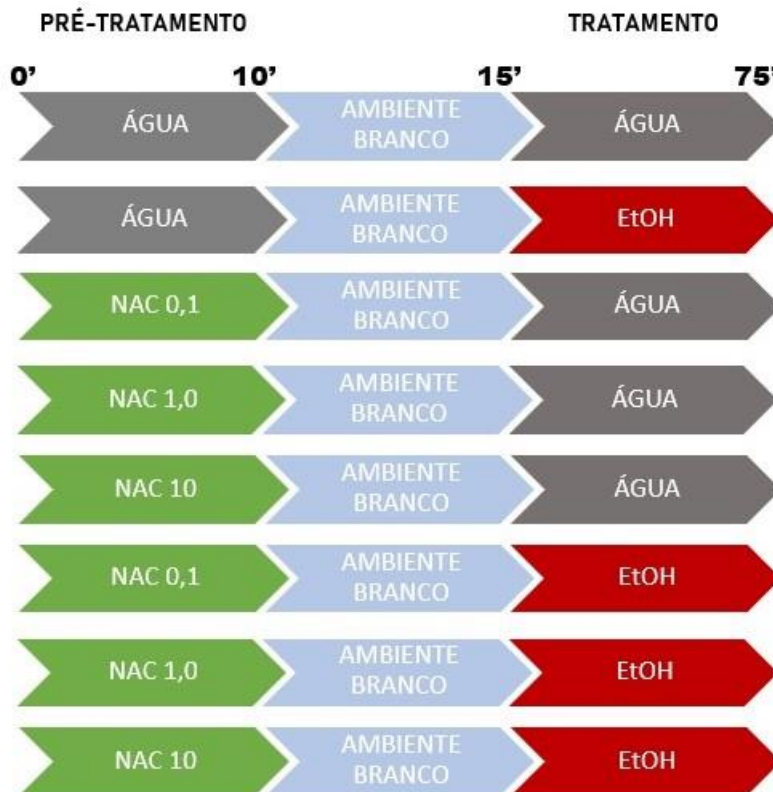
4.2.1 Tratamento *in vivo*

Para análise *in vivo* os animais foram divididos em oito grupos experimentais (cada grupo sendo formado por um *n* de três amostras compostas por um *pool* de dois cérebros totais por amostra). As concentrações de NAC e o tempo de exposição foram pré-estabelecidas em modelo de neuroproteção de estresse em peixe-zebra por Mocelin et al. (2015). Na análise *in vivo* todos os animais dos diferentes grupos passaram entre a primeira exposição de 10 minutos e a segunda de 60 minutos, em um aquário com água sem a presença

de nenhuma substância para a remoção de qualquer resíduo da exposição anterior, para garantir as variáveis durante cinco minutos.

- (i) Grupo-controle: O grupo controle foi tratado com água durante 10 minutos, seguido do ambiente branco durante cinco minutos, seguido de água novamente durante 60 minutos.
- (ii) Grupo-EtOH 1%: Tratou-se com água durante 10 minutos, passando pelo ambiente branco durante cinco minutos, seguido de etanol 1% durante 60 minutos.
- (iii) NAC 0,1; 1,0 e 10mg/l: Três diferentes grupos foram pré-tratados nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 mg/l de NAC por 10 minutos, passando pelo ambiente branco durante cinco minutos, seguido de água durante 60 minutos.
- (iv) NAC-grupo: Três diferentes grupos foram pré-tratados com NAC 0,1; 1,0; 10 mg/l por 10 minutos, passando pelo ambiente branco por cinco minutos e seguido de etanol 1% durante 60 minutos.

Figura 2 – Representação do delineamento experimental *in vivo*.



Fonte: Do autor (2018).

4.2.2 Exposição *in vitro*

Para a análise *in vitro* os animais foram divididos em cinco grupos experimentais. A atividade da AChE foi avaliada com diferentes concentrações de NAC (1µg/L, 10µg/L, 100µg/L e 1000µg/L) que foram diretamente adicionadas ao meio de reação antes da pré-incubação enzimática e mantida durante o ensaio. A concentração final de NAC foi na faixa de 1µg/L a 1000µg/L.

4.2.3 Atividade da AChE

Após o término dos testes, os animais foram expostos a uma solução de triclaína para eutanásia. As caixas cranianas foram abertas e os cérebros retirados, limpos e mantidos a -80°C até o momento da realização das análises. No momento dos experimentos, os tecidos cerebrais foram homogeneizados em um mesmo tampão específico para a realização das técnicas mencionadas. A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada através do método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. A análise foi realizada em cérebro total de acordo com o método de ensaio colorimétrico descrito por Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação 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 três minutos. A reação foi iniciada pela adição de 8 mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh) e a absorbância lida em 412 nm por 3,15 minutos, com intervalos de 30s. Todas as amostras foram testadas em triplicata e a atividade enzimática foi expressa em µmol de AcSCh.h-1.mg de proteína-1.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA), sendo expressos como média ± desvio padrão seguido do teste post hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significante. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

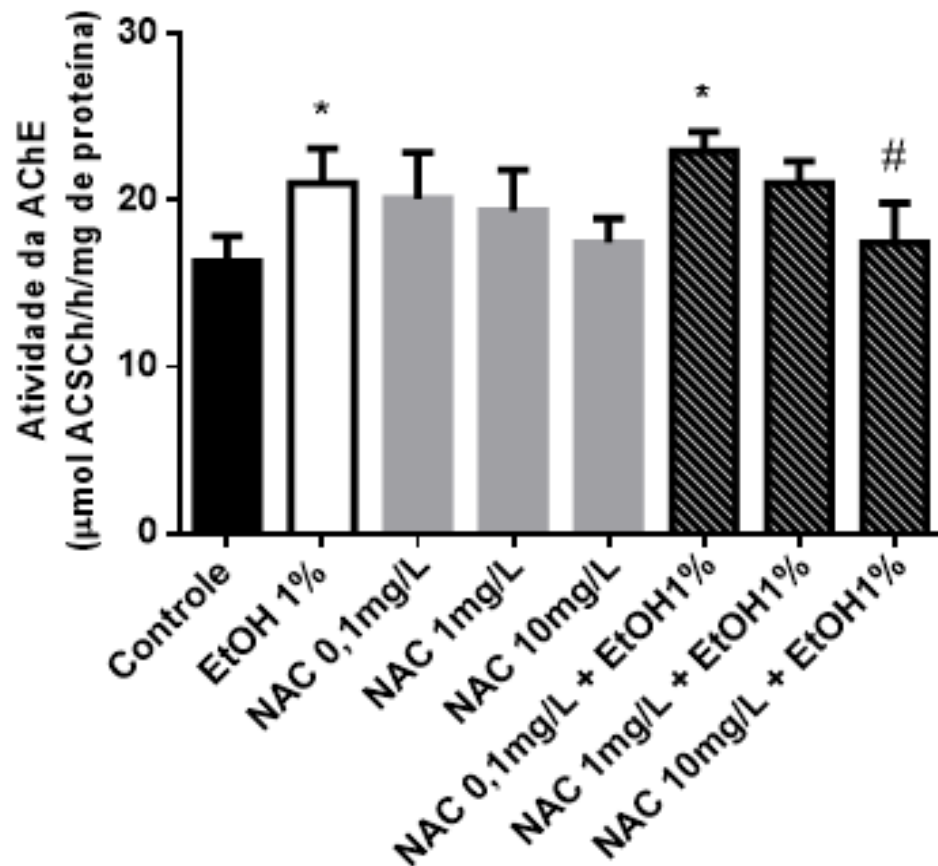
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação do etanol está geralmente associada à sua alta solubilidade, tornando-se uma molécula facilmente distribuída na corrente sanguínea para a maioria dos órgãos e sistemas (BERTELI, 2017). O peixe-zebra tem sido um modelo promissor em pesquisas científicas, incluindo análise dos efeitos do álcool, visto a sua simplicidade de aplicação no ambiente do organismo. Quando dissolvido na água do aquário, o álcool é rapidamente absorvido pelos vasos sanguíneos presentes nas brânquias e na pele do peixe-zebra (GERLAI et al., 2000). Além disso, múltiplos sistemas de neurotransmissão já foram identificados em peixe-zebra, compreendendo também o sistema colinérgico (ARENZANA et al., 2005). Visto que estudos demonstram que o álcool está envolvido na alteração de funções neurais, afetando vários neurotransmissores, como o glutamato, o ácido gama-amino-butírico, serotonina, dopamina e o sistema opioide (CHASTAIN, 2006), o sistema colinérgico pode sofrer alterações e investigações são necessárias através de importantes marcadores da atividade colinérgica. Os receptores da ChAT, ACh e da AChE, incluindo linfócitos (T e B) e macrófagos demonstram a maior parte dos componentes necessários para a funcionalidade correta do sistema colinérgico (FUJII et al., 2017). A atividade da AChE é considerada um marcador bioquímico para a identificação e previsão de várias disfunções do SNC e SNP, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esquizofrenia e o alcoolismo crônico (BILGI et al., 2003). A NAC é um antioxidante tiólico que auxilia na resposta imune do organismo, utilizada para o tratamento de superdosagens de acetaminofeno (VICTOR; DE LA FUENTE 2002; QUINTANILLA et al., 2018). Uma das ações da NAC está relacionada ao reabastecimento de GSH através da cisteína, modulando também a inflamação com ações anti-inflamatórias e com efeitos diretos sobre a neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica (FRIES; KAPCZINSKI, 2011).

Visto que a absorção do etanol está relacionada ao dano sistêmico, gerando modificações no SNC, tendo influência na memória e cognição, e ocasionalmente afetando o sistema colinérgico, a NAC torna-se uma substância promissora na modulação destas modificações. Neste sentido, o peixe-zebra mostrou ser um modelo próspero em pesquisas científicas relacionadas ao abuso do álcool. Neste contexto, o presente estudo foi realizado para avaliar o efeito da exposição aguda ao etanol sob a atividade da AChE e sua associação com a possível ação modulatória da NAC em tecido cerebral de peixe-zebra. Inicialmente, foi avaliado a atividade enzimática da AChE *in vivo* em cérebro de peixe-zebra expostos agudamente ao etanol e a NAC divididos em oito grupos (Figura 3). Os experimentos foram

realizados após os 75 minutos de exposição.

Figura 3 – Efeito da exposição aguda ao etanol e a NAC sobre a atividade da enzima AChE em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 8 diferentes experimentos, cada um em triplicata. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em $\mu\text{mol ACSC/h/mg}$ de proteína. *# $p < 0,05$; em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).



Fonte: Do autor (2018).

A alteração da atividade da AChE tem sido amplamente utilizada como biomarcador em estudos ligados a exposição ao etanol (SHIN et al., 1991; BILGI et al., 2003; FEKONJA et al., 2007; RICO et al., 2007; ROSEMBERG et al., 2010; RICO et al., 2011; BERTELI, 2017). Foi possível relatar que o etanol pode alterar a atividade da AChE no cérebro de peixe-zebra. Os resultados demonstraram que a atividade da AChE aumentou 29% quando somente exposta ao etanol 1%, similar aos resultados de Rico e colaboradores (2007), cujo resultado apresentou um aumento de 33%. Pesquisas afirmam que a ingestão crônica do etanol leva ao estresse oxidativo cerebral e à neuroinflamação, sendo o hipocampo a área do

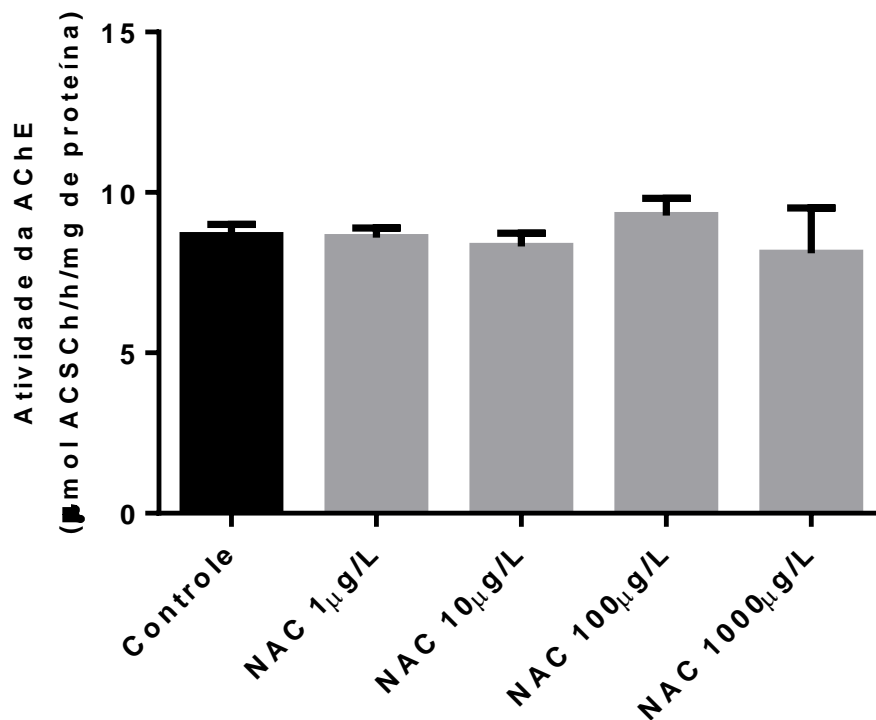
cerebro mais patologicamente afetada (QUINTANILLA et al., 2018). A análise da atividade da AChE torna-se um importante índice de neurotoxicidade em animais e humanos e para a descoberta de inibidores e fármacos, bem como a exposição ao etanol (NINO et al., 2006). Neste estudo foi verificado um crescimento na atividade da enzima AChE, em cérebro de peixe-zebra expostos agudamente ao etanol, o que ocasionalmente indica uma menor quantidade da ACh na fenda sináptica. A ACh é um neurotransmissor principalmente do sistema parassimpático periférico ou colinérgico, que possui papel fundamental no funcionamento do SNC, sendo hidrolisado pela enzima AChE (BILGI et al., 2003). Estudos disponíveis sobre os efeitos do álcool no sistema colinérgico divergem entre os seus resultados. Erickson e Graham (1973) e Charmichael e Israel (1975) demonstraram que o etanol inibiu a liberação do neurotransmissor ACh, analisados em diferentes concentrações da substância. Bertelli (2017) também demonstrou uma diminuição da ACh em grupos expostos cronicamente ao etanol. Porém, Parker e colaboradores (1978) constaram que a ACh cerebral aumentou significativamente. Em outras investigações, a inibição da atividade da AChE foi constatada em peixes-zebra expostos a cobre, ferro, chumbo e cádmio (LIMA; ROQUE; ALMEIDA, 2013), e em contrapartida, sua atividade elevou-se significativamente quando exposto ao etanol (RICO et al., 2007). A diminuição da atividade da enzima AChE pode acarretar a possíveis efeitos tóxicos no organismo, uma vez que esta enzima é responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh na fenda sináptica. A inibição desta enzima está relacionada a hiperestimulação dos receptores colinérgicos, interrupção da neurotransmissão (SILVA, 2015), além do acúmulo de ACh na fenda sináptica, o que pode resultar na perturbação de diversas funções do corpo e levar até mesmo a morte (COSTA et al., 2016a).

No presente estudo, enquanto exposto somente a NAC não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos testados. No entanto, observou-se uma reversão na atividade da AChE quando pré-tratada com a NAC 10 mg/l, similar ao grupo controle. No grupo pré-tratado com NAC 0,1 mg/l e posteriormente exposto ao etanol 1%, houve um aumento de 41% da atividade da AChE e quando pré-tratado com NAC 10 mg/l, houve uma reversão da atividade da enzima em 34%. Mocelin e colaboradores (2015) verificaram que quando pré-tratado com NAC 1,0 mg/l, seguido de etanol 1%, houve uma prevenção tanto de alterações comportamentais como de parâmetros ligados ao estresse oxidativo no peixe-zebra. Costa e colaboradores (2016), demonstraram que o tratamento com NAC impediu alterações cognitivas, sendo capaz de restaurar o sistema colinérgico sem causar mudanças no mesmo.

Uma vez que houve queda na atividade da AChE no grupo pré-tratado com NAC 10 mg/l e a fim de verificar se a exposição à esta medicação poderia modificar a atividade da

AChE através de mecanismos diretos, realizou-se ensaios *in vitro* com concentrações de 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L e 1000µg/L (Figura 4).

Figura 4 – Efeito da exposição aguda a NAC nas concentrações de 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L e 1000µg/L sobre a atividade da enzima AChE em cérebro total de peixe-zebra *in vitro*. Os resultados representam média ± desvio padrão de 5 diferentes experimentos, cada um em triplicata. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em µmol ACSC/h/mg de proteína.



Fonte: Do autor (2018).

Quando adicionada diretamente ao meio de reação, na análise *in vitro*, a NAC não promoveu alterações significativas na atividade da enzima nos grupos avaliados, permanecendo similar ao grupo controle. No presente estudo foi possível demonstrar que a NAC preveniu os efeitos da exposição aguda ao etanol através de parâmetros de avaliação do sistema colinérgico no peixe-zebra. O etanol aumentou a atividade da AChE, e as mudanças relatadas foram evitadas pelo pré-tratamento com NAC na dose de 10mg/l. A NAC possui ação variada, atuando com um antioxidante indireto por ser um precursor da GSH, aumentando seus níveis neuronais, possuindo também comportamento anti-inflamatório e neurotrófico (BENVENUTTI et al., 2018). É considerada um antioxidante indireto pois tem a capacidade de fornecer cisteína para a síntese da GSH, que possui papel importante na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER et al., 2008). Isso porque, intracelularmente,

a molécula de NAC sofre desacetilação tendo como produto a cisteína (PIVETTA, 2005). Dean, Giorlando & Berk (2011) descreveram os resultados promissores que NAC vêm apresentando no campo de pesquisa psiquiátrica, em desordens incluindo a dependência de substâncias, transtornos compulsivos, esquizofrenia e transtorno bipolar. O potencial da NAC referente a sintomas de transtornos psiquiátricos pode estar relacionado a redução das citocinas inflamatórias, da qual são contribuintes para a fisiopatologia desses distúrbios (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011). Estudos demonstram que a NAC tem sido amplamente utilizada como antioxidante *in vivo* e *in vitro*, onde verificou-se que além do seu potencial indireto, possui capacidade de eliminar diretamente oxidantes, particularmente o ácido hipocloroso e o radical hidroxila (ARUOMA et al., 1989). Em estudos relacionados aos efeitos do estresse oxidativo, a suplementação com NAC demonstrou-se eficaz na proteção dos animais contra os efeitos tóxicos (MODI et al., 2006). Além disso, apresentou melhora na vasoconstrição renal (HEYMAN et al., 2003), como forte potencial antiangionênico e possível adjuvante na terapia de câncer (ALBINI et al., 2001) e também como hepatoprotetor (PEREIRA-FILHO et al., 2008; SATHISH et al., 2011). Doses de 150mg/kg de NAC previniram a diminuição da atividade da Ach quando exposto a cádmio, bem como o estresse oxidativo, demonstrando ser capaz de modular a neurotransmissão colinérgica e por consequência melhorar a cognição e memória dos organismos testados (GONÇALVES et al., 2010).

Estudos relacionados aos efeitos diretos do etanol no sistema nervoso são de complexa interpretação, visto que a alteração neuronal pode estar relacionada a ação direta do etanol; da alteração das células devido a uma ação distinta em outro lugar do SNC; consequências indiretas como a diminuição de fluxo sanguíneo e fornecimento de oxigênio e também a efeitos associados aos metabólitos do etanol (KALANT, 1975). Pesquisas indicam que alguns efeitos neuroquímicos causados pelo etanol podem ter participação indireta associada ao seu metabolismo, como a formação do acetaldeído e o estresse oxidativo (REIMERS et al., 2004; RICO et al., 2007). E ambas as opções podem levar a alterações do SNC. O metabolismo do etanol está diretamente envolvido com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que auxiliam no surgimento do estresse oxidativo (DAS; VASUDEVAN, 2007). As espécies reativas ou radicais livres são o produto do metabolismo celular normal, principalmente produzido pelas mitocôndrias e podem ser definidos por serem átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não emparelhados na órbita externa, tornando-o instáveis (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). Devido a esta característica, são moléculas altamente reativas, tendo

a capacidade de capturar elétrons de outros compostos em busca de estabilidade causando alterações a moléculas importantes, levando até mesmo a uma perda total da funcionalidade (EVANS, 2000; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). Segundo Halliwell (1994, p. 254), *“The simplest free radical is an atom of the element hydrogen, with one proton and a single electron”*. Os radicais livres cumprem duplas funções biológicas nos organismos, podendo ser benéficas ou tóxicas dependendo dos seus níveis (BARBOSA et al., 2010). Em níveis moderados podem atuar como mediadores para transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas; geração de ATP (energia); fertilização do óvulo; ativação de genes, além de atuar na defesa contra microrganismos patogênicos (BARBOSA et al., 2010). Porém, os seus altos níveis são responsáveis pela geração de estresse oxidativo e a danos a biomoléculas, incluindo o DNA, resultando em processos pré-mutagênicos e cancerígenos (SENTÜRKER et al., 1997; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). Os mecanismos antioxidantes de defesa como vitaminas C e E e enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx), bem como os tióis endógenos, ou compostos que contêm sulfidrilas tais como a GSH e tioredoxina protegem as células dos efeitos tóxicos dos radicais livres (SENTÜRKER et al., 1997). Através deste processo, as quantificações de tais enzimas podem apontar possível correlação entre diminuição de enzimas antioxidantes e o aumento de bases danificadas no DNA, resultante do estresse oxidativo (ROVER-JUNIOR et al., 2001).

Estudos indicam que a produção de radicais livres no cérebro interfere no sistema de defesa antioxidante, que por sua vez, leva a uma alteração da integridade estrutural dos lipídeos e secundariamente afeta as enzimas e a atividade da AChE (GONÇALVES et al., 2010). Estudos relatam que o comprometimento da memória induzido pelo etanol, é consequência de alterações no SNC por meio do estresse oxidativo e disfunção colinérgica (PATIL et al., 2015). Neste estudo, Patil e colaboradores (2015) demonstraram que através do tratamento com o antioxidante barberina, foi possível diminuir a produção de espécies reativas e de prejuízos ao sistema colinérgico, causado pela exposição ao etanol. A desregularização do sistema colinérgico através do estresse oxidativo possui ligação com o comprometimento cognitivo e da memória, através do consumo do etanol (TIWARI; CHOPRA, 2013). Portanto, não podemos excluir a possibilidade de que o estresse oxidativo causado pelo etanol poderia estar modulando a atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra, apresentado neste estudo.

6 CONCLUSÃO

Diante dos objetivos propostos, conclui-se que a exposição aguda ao etanol influencia no sistema colinérgico através do aumento da atividade da AChE em tecido cerebral de peixe-zebra. Além disso, foi possível relatar que a NAC possui ações benéficas contra os efeitos causados pelo etanol, sendo capaz de restaurar a atividade da AChE e, conseqüentemente, modular a neurotransmissão do sistema colinérgico.

Com isso, este estudo visa contribuir para novas investigações com o objetivo de compreender os prejuízos neurais causados pelo uso agudo do álcool, bem como o efeito da NAC frente a esta exposição. Pretendemos analisar parâmetros de estresse oxidativo, com o intuito de compreender a modulação colinérgica através da NAC. No entanto, se faz necessário investigações futuras com o uso de diferentes marcadores bioquímicos do sistema colinérgico, para que assim, seja possível aprimorar pesquisas relacionadas as diferentes utilizações da NAC e a alternativas terapêuticas em relação aos danos causados pelo abuso do álcool.

REFERÊNCIAS

- ADW, Animal Diversity Web. **Danio rerio**. 2011. Disponível em: <http://animaldiversity.org/accounts/Danio_rerio/>. Acesso em: 11 ago. 2018.
- AGOSTINI, Jotele Fontana et al. **Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol**. Neurotoxicity Research, v. 33, n. 4, p.749-758, 23 set. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28942534>>. Acesso em: 15 out. 2018.
- ALBINI, A. et al. **Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine**. Cancer Research, v. 15, n. 61, p. 8171-8178, nov. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719447>>. Acesso em: 26 out. 2018.
- ALVES, Vânia Sampaio. **Modelos de atenção à saúde de usuários de álcool e outras drogas: discursos políticos, saberes e práticas**. Cadernos de Saúde Pública, v. 25, n. 11, p.2309-2319, nov. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2009001100002&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 ago. 2018.
- ARAÚJO, Cleônia Roberta M.; SANTOS, Victória L. A.; GONSALVES, Arlan A. **Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme**. Revista Virtual de Química, v. 8, n. 6, p.1818-1834, 2016. Disponível em: <<http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v8n6a04.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- ARENDDT, T. et al. **Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system**. Neuroscience, v. 33, n. 3, p. 435-462, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2636702>>. Acesso em: 18 out. 2018.
- ARENZANA, Francisco Javier et al. **Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish**. Brain Research Bulletin, v. 66, n. 4-6, p.421-425, set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144624>>. Acesso em: 15 set. 2018.
- ASEVEDO, E. et al. **Systematic review of N-acetylcysteine in the treatment of addictions**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 36, n. 2, p. 168-175, mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676047>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- BABADI, Vahid Yousefi et al. **The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains**. Journal Of Toxicology, v. 2014, p.1-4, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jt/2014/946372/>>. Acesso em: 28 set. 2018.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p.629-643, ago. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013>. Acesso em: 29 out. 2017.
- BARRIONUEVO, Wr; FERNANDES, Mn; ROCHA, O. **Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, Danio rerio, reared under normoxic and hypoxic**

conditions and exposed to acute hypoxia during development. Brazilian Journal Of Biology, v. 70, n. 2, p.425-434, maio 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842010000200027>. Acesso em: 15 set. 2018.

BERNARDO, Henrique Teza. **Modelo de exposição intermitente ao etanol altera parâmetros do sistema colinérgico, estresse oxidativo e comportamento em peixe-zebra.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2017. Disponível em: <<http://200.18.15.60:8080/pergamumweb/vinculos/00005D/00005D96.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2018.

BERTELI, Jotele Fontana Agostini. **Avaliação da Neurotransmissão Colinérgica, Estresse oxidativo e Parametros Inflamatórios em Tecido Cerebral de Peixe-Zebra Exposto Cronicamente ao Etanol.** 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2017.

BERTRAND, Christelle et al. **Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7.** Journal Of Biological Chemistry, v. 276, n. 1, p.464-474, 2 out. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016933>>. Acesso em: 28 out. 2018.

BILGI, C. et al. **The effects of chronic ethanol consumption and ethanol withdrawal on serum cholinesterase activity in rats.** Alcohol And Alcoholism, v. 38, n. 4, p.316-320, 1 jul. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/alcalc/article/38/4/316/232347>>. Acesso em: 02 out. 2018.

BILOTTA, Joseph et al. **Ethanol exposure alters zebrafish development: A novel model of fetal alcohol syndrome.** Neurotoxicology And Teratology. v. 26, n. 6, p.737-743, nov. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451038>>. Acesso em: 15 maio 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria n 465, de 23 de maio de 2013. Aprova a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização e Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA.

CARMICHAEL, FJ., ISRAEL, Y. **Effects of ethanol on neurotransmitter release by rat brain cortical.** The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics. v. 193, n. 3, p. 824-834, jun. 1975. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239216>>. Acesso em: 19 out. 2018.

CHASTAIN, Garvin. **Alcohol, Neurotransmitter Systems, and Behavior.** The Journal Of General Psychology, v. 133, n. 4, p.329-335, out. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128954>>. Acesso em: 10 out. 2018.

CHIERRITO, Talita Perez Cantuaria. **Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer.** 2016. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/T.60.2016.tde-02052016-092044. Acesso em: 14 set. 2018

CISA, Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool. **História do Álcool**. 2018. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/234/historia-alcool.php>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

COLOVIC, Mirjana B. et al. **Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology**. Current Neuropharmacology, v. 11, n. 3, p.315-335, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648782/>>. Acesso em: 14 set. 2018.

COSTA, M. et al. **N-Acetyl Cysteine Decreases Mice Brain Acetyl Cholinesterase Activity: An In Vitro Kinetic Study**. Enzyme Engineering, v. 05, n. 01, p.5-11, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/303212291_N-acetyl_cysteine_decease_mice_brain_acetyl_cholinesterase_activity_Ai_in_vitro_kinetic_study>. Acesso em: 21 out. 2018.

COSTA, Michael et al. **N -acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice**. Chemico-biological Interactions, v. 253, p.10-17, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087133>>. Acesso em: 14 set. 2018.

DAS, Subir Kumar; VASUDEVAN, D.m. **Alcohol-induced oxidative stress**. Life Sciences, v. 81, n. 3, p.177-187, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432050700358X>>. Acesso em: 01 nov. 2017.

DEAN, Olivia; GIORLANDO, Frank; BERK, Michael. **N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action**. Journal Of Psychiatry & Neuroscience, v. 36, n. 2, p.78-86, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044191/>>. Acesso em: 06 out. 2017.

DODD, Seetal et al. **Putative neuroprotective agents in neuropsychiatric disorders**. Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry, v. 42, p.135-145, abr. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584612002898>>. Acesso em: 05 out. 2018.

EDENBERG, Howard J. **The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants**. Alcohol Research: Current Reviews. p.5-13, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860432/>>. Acesso em: 11 maio 2018.

ENGESZER, Raymond E. et al. **Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field**. Zebrafish, v. 4, n. 1, p.21-40, mar. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041940>>. Acesso em: 15 set. 2018.

ERICKSON, Carlton K., GRAHAM, David T. **Alteration of cortical and reticular acetylcholine release by ethanol *in vivo***. The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics. v. 185. n. 3. p. 583-593, jun. 1973. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/185/3/583>>. Acesso em: 19. out. 2018.

EVANS, William J. **Vitamin E, vitamin C, and exercise**. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 72, n. 2, p.647-652, 1 ago. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919971>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

FORN-CUNÍ, G. et al. **Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals.** *Scientific Reports*, v. 7, p.41905, 3 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291205/>>. Acesso em: 26 out. 2017.

FUJII, Takeshi et al. **Physiological functions of the cholinergic system in immune cells.** *Journal Of Pharmacological Sciences*, v. 134, n. 1, p.1-21, maio 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347861317300695?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 out. 2018.

GERLAI, R. **Zebra fish: an uncharted behavior genetic model.** *Behavior Genetics*, v. 33, n. 5, p. 461-468, set. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574124>>Acesso em: 01 out. 2018.

GERLAI, R. et al. **Drinks like a fish: zebra fish (Danio rerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects.** *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, v. 67, n. 4, p.773-782, dez. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305700004226>>. Acesso em: 01 out. 2018.

GERLAI, Robert; LEE, Vallent; BLASER, Rachel. **Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (Danio rerio).** *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, v. 85, n. 4, p.752-761, dez. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1885548/>>. Acesso em: 25 out. 2017.

GONÇALVES, Jamile F. et al. **N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium.** *Chemico-biological Interactions*, v. 186, n. 1, p.53-60, jun. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399762>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

HABER, Margalit et al. **Minocycline plus N-acetylcysteine synergize to modulate inflammation and prevent cognitive and memory deficits in a rat model of mild traumatic brain injury.** *Experimental Neurology*, v. 249, p.169-177, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488613002707>>. Acesso em: 02 out. 201

HALLIWELL, Barry. **Free radicals and antioxidants: updating a personal view.** *Nutrition Reviews*, v. 70, n. 5, p.257-265, 26 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537212>>. Acesso em: 20 out. 2017.

HAMPEL, Harald et al. **The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease.** *Brain*, v. 141, n. 7, p.1917-1933, 29 maio 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29850777>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

HEYMAN, Samuel N. et al. **N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: Studies in rats.** *Kidney International*, v. 63, n. 2, p.634-641, fev. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631128>>. Acesso em: 26 out. 2018.

HIPOLITO, L. et al. **Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update.** *Current Drug Metabolism*, v. 8, n. 7, p.716-727, 1 out. 2007. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/59919/article>>. Acesso em: 09 mar. 2018.

HOWE, Kerstin et al. **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** Nature, v. 496, n. 7446, p.498-503, 17 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594743>>. Acesso em: 09 maio 2018.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. **Glutaciona e enzimas relacionadas:** papel biológico e importância em processos patológicos. Química Nova, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000500046&script=sci_abstract>. Acesso em: 06 jul. 2018.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). **Estimativa dos Custos dos Acidentes de Trânsito no Brasil com Base na Atualização Simplificada das Pesquisas Anteriores do Ipea.** 2015. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7456/1/RP_Estimativa_2015.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2017.

KALANT, H. **Direct effects of ethanol on the nervous system.** Federation proceedings. v. 34, n. 10, p. 1930-1941, set. 1975. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1098939>>. Acesso em: 20 out. 2018.

KOKEL, D.; PETERSON, R. T. **Chemobehaviouralphenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish.** Briefings In Functional Genomics And Proteomics, v. 7, n. 6, p.483-490, 31 out. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2722257/>>. Acesso em: 25 out. 2017.

MARTINS, Otávio Augusto. **Efeito do consumo de bebidas alcoólicas no organismo:** uma revisão. Revista Eletrônica de Educação e Ciência, São Paulo, v. 03, n. 02, p.7-10, jan. 2013. Disponível em: <http://fira.edu.br/revista/vol3_num2_pag7.pdf>. Acesso em: 03 out. 2017.

MCGOVERN, Patrick E. **Uncorking the Past.** p. 352, out. 2009. Disponível em:<<https://www.ucpress.edu/book/9780520267985/uncorking-the-past/>>. Acesso em: 14 set. 2018.

MOCELIN, Ricieri et al. **N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish.** Pharmacology Biochemistry And Behavior, v. 139, p.121-126, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305715300435?via=ihub>>. Acesso em: 14 out. 2017.

MODI, Manoj et al. **Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats.** Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology, v. 20, n. 3, p.197-204, set. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959597>>. Acesso em: 25 out. 2018.

MOLDÉUS, Peter; COTGREAVE, Ian A.; BERGGREN, Margareta. **Lung Protection by a Thiol-Containing Antioxidant: N-Acetylcysteine.** Respiration, v. 50, n. 1, p.31-42, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3809741>>. Acesso em: 02 jun. 2018. MUGONI, Vera; CAMPOREALE, Annalisa; SANTORO, Massimo M. **Analysis of Oxidative Stress in Zebrafish Embryos.** Journal Of Visualized Experiments, n. 89, 7 jul.

2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212721/>>. Acesso em: 05 ago. 2018.

NIAAA, National Institute On Alcohol Abuse And Alcoholism. **Alcohol Alert**. 1997. Disponível em: <<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa35.htm>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

NIÑO, Jaime et al. **In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 7, p.783-785, nov. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000700013>. Acesso em: 14 set. 2018.

OZARAS, Resat et al. **N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat**. World Journal Of Gastroenterology, v. 9, n. 1, p.125-128, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728225/>>. Acesso em: 01 jul. 2018.

PAPALE, L.a. et al. **Participation of the cholinergic system in the ethanol-induced suppression of paradoxical sleep in rats**. Brazilian Journal Of Medical And Biological Research, v. 41, n. 9, p.782-788, set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2008000900007>. Acesso em: 14 out. 2018.

PARKER, T. H. et al. **The Effects of Ethanol on Cerebral Regional Acetylcholine Concentration and Utilization**. Experimental Biology And Medicine, v. 159, n. 2, p.270-275, 1 nov. 1978. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-159-40330?journalCode=ebma>>. Acesso em: 20 out. 2018.

PATIL, Shaktipal et al. **Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats**. Pharmacology Biochemistry And Behavior, v. 136, p.13-20, set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159088>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

PEREIRA-FILHO, Gustavo et al. **Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats**. Arquivos de Gastroenterologia, v. 45, n. 2, p.156-162, jun. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032008000200013>. Acesso em: 28 out. 2018.

PETRONILHO, Elaine da Conceição; PINTO, Angelo C.; VILLAR, José Daniel Figueroa. **Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química**. Revista Militar de Ciência e Tecnologia, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p.03-14, set. 2011. Disponível em: <http://rmct.ime.eb.br/arquivos/revistas/RMCT_3_tri_2011.pdf>. Acesso em: 13 set. 2018.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. **Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases**. Indian Journal Of Clinical Biochemistry, v. 30, n. 1, p.11-26, 15 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310837/>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

PIVETTA, Lucinéia Albanio. **Efeitos tóxicos do etanol e sua relação com o estresse oxidativo**. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/11078/LUCINEIA%20PIVETTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 07 jul. 2018.

QUERTEMONT, Etienne; TAMBOUR, Sophie; TIRELLI, Ezio. **The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol**: A comprehensive review of animal studies. *Progress In Neurobiology*, v. 75, n. 4, p.247-274, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882776>>. Acesso em: 14 set. 2018.

QUINTANILLA, María Elena et al. **Beyond the “First Hit”**: Marked Inhibition by N-Acetyl Cysteine of Chronic Ethanol Intake But Not of Early Ethanol Intake. Parallel Effects on Ethanol-Induced Saccharin Motivation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 40, n. 5, p.1044-1051, 8 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27062046>>. Acesso em: 10 out. 2018.

QUINTANILLA, Maria Elena et al. **Commonality of Ethanol and Nicotine Reinforcement and Relapse in Wistar-Derived UChB Rats**: Inhibition by N-Acetylcysteine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 42, n. 10, p.1988-1999, 13 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30035805>>. Acesso em: 10 out. 2018.

REHM, Jürgen. **The Risks Associated With Alcohol Use and Alcoholism**. *Alcohol Research & Health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. p. 135-143. jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3307043/>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

RIBEIRO, Gianine Lima. **Efeitos da n-acetilcisteína sobre o dano oxidativo renal e hepático de ratos diabéticos**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/8977/RIBEIRO%2C%20GIANINE%20LIMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

RICO, Eduardo Pacheco. **Influência do metanol e do etanol sobre a atividade e a expressão gênica das ectonucleotidases e acetilcolinestrases em cérebro de zebrafish (Danio rerio)**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/10070>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

RIVEROS-ROSAS, Hector; JULIÁN-SÁNCHEZ, Adriana; PIÑA, Enrique. **Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals**. *Archives Of Medical Research, México*, v. 4, n. 28, p.453-471, fev. 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/13800996_Enzymology_of_ethanol_and_acetaldehyde_metabolism_in_mammals>. Acesso em: 02 set. 2018.

RODRIGUES, Thiago M. S. **A infundável guerra americana**: Brasil, EUA e o narcotráfico no continente. *São Paulo em Perspectiva*, v. 16, n. 2, p.102-111, jun. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-88392002000200012>. Acesso em: 05 ago. 2018

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse**

oxidativo. Química Nova, v. 24, n. 1, p.112-119, fev. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100019>. Acesso em: 29 out. 2017.

SADOWSKA, Anna M. **N-Acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease.** Therapeutic Advances In Respiratory Disease. v. 6, n. 3, p.127-135, 23 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361928>>. Acesso em: 05 set. 2018.

SATHISH, Priya et al. **N-acetylcysteine attenuates dimethylnitrosamine induced oxidative stress in rats.** European Journal Of Pharmacology, v. 654, n. 2, p.181-186, mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114986>>. Acesso em: 27 out. 2018.

SENTÜRKER, Sema et al. **Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Febs Letters, v. 416, n. 3, p.286-290, 27 out. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373171>>. Acesso em: 19 out. 2017.

SHAHRIPOUR, Reza Bavarsad; HARRIGAN, Mark R.; ALEXANDROV, Andrei V. **N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities.** Brain And Behavior, v. 4, n. 2, p.108-122, 13 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967529/#b62>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. **Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas.** Ciência e Cultura, v. 64, n. 2, p.4-5, jun. 2012. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002>. Acesso em: 06 out. 2017.

SOARES, Vanessa de Matas. **Efeitos da exposição aguda a nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro do Peixe-Zebra (Danio rerio).** 2009. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/1316>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

SOREQ, Hermona; SEIDMAN, Shlomo. **Acetylcholinesterase** — new roles for an old actor. Nature Reviews Neuroscience, v. 2, n. 4, p.294-302, abr. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283752>>. Acesso em: 29 out. 18.

SOARES, Layciane Aparecida. **Propriedades analíticas e eletroanalíticas de um silsesquioxano nanoestruturado organofuncionalizado.** 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/91961/soares_la_me_ilha.pdf?sequence=1>. Acesso em: 05 ago. 2018.

TAMMI, Tuukka; HURME, Toivo. **How the harm reduction movement contrasts itself against punitive prohibition.** International Journal Of Drug Policy, v. 18, n. 2, p.84-87, mar. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689349>>. Acesso em: 16 maio 2018.

TIWARI, Vinod; CHOPRA, Kanwaljit. **Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative–nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain.** *Neurochemistry International*, v. 62, n. 6, p.861-869, maio 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23422878>>. Acesso em: 29 out. 2018.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**, 10. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012. 967p.

VENTURA, Ana L. M. et al. **Sistema colinérgico:** revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Archives Of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 37, n. 2, p.66-72, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-60832010000200007&script=sci_abstract>. Acesso em: 28 ago. 2018.

VICTOR, VM., DE LA FUENTE, M. **N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress.** *Free Radical Research*, v. 36, n. 1, p. 33-45, jan. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999701>>. Acesso em: 02 out. 2018.

WINKLER, J. et al. **Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory.** *Nature*, v. 375, n. 6531, p.484-487, jun. 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7777056>>. Acesso em: 02 set. 2018.

WITTE, Philippe de. **Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol.** *Addictive Behaviors*, v. 29, n. 7, p.1325-1339, set. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345268>>. Acesso em: 14 out. 2018.

WODAK, Alex; MCLEOD, Leah. **The role of harm reduction in controlling HIV among injecting drug users.** *Aids*, v. 22, n. 2, p.67-79, ago. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329723/>>. Acesso em: 05 ago. 2018.

World Health Organization (WHO). **WHO calls on governments to do more to prevent alcohol-related deaths and diseases.** 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/alcohol-related-deaths-prevention/en/>>. Acesso em: 25 outubro 2017.

World Health Organization (WHO). **World Health Statistics 2018 - Monitoring Health For the SDGs.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1&ua=1>>. Acesso em: 20 out. 2018.

World Health Organization (WHO). **Global status report on alcohol and health 2018.** Disponível em: <https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/>. Acesso em: 01 dez. 2018.

ANEXO(S)

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Uso Animal.



CERTIFICADO


Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **10/04/2018**.

Título do projeto	Efeito antioxidante da N-acetilcisteína em exposição aguda ao etanol em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) (Hamilton-Buchanan, 1822)
Project title	Antioxidant effect of N-acetylcysteine on acute ethanol exposure in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) (Hamilton-Buchanan, 1822)
Número do protocolo Protocol number	023/2018-1 – Versão 02
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Alice Daminelli Valentim, Niuany Viel Mendes, Maria Cecilia Manenti Alexandre, Karine Medeiros Vieira, Samira Leila Baldin, Daiana Alves Spilere, Carolina Antunes Torres, Ketheryn Stahnke Cechin Minatto.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/04/2018 a 21/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Peixe** <i>Danio rerio</i>
Nº de animais	634 masculino e 634 feminino = 1268
Idade/Peso	4 meses / 400-500 mg
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 10 de abril de 2018.