

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
CURSO DE DOUTORADO

GIOVANNA TREVISAN COUTO

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA SUSCETIBILIDADE A CRISES  
CONVULSIVAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM PEIXE-ZEBRA (*Danio  
rerio*)**

Porto Alegre  
2023

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Giovanna Trevisan Couto

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA SUSCETIBILIDADE A  
CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL  
EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Orientadoras

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ROSANE SOUZA DA SILVA (11/03/2019 a 19/07/2022)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MÔNICA RYFF MOREIRA VIANNA (20/07/2022 a 31/03/2023)

**Porto Alegre**

**2023**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA SUSCETIBILIDADE A  
CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM  
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Tese apresentada como requisito  
para obtenção do grau de  
Doutora pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Escola de Ciências  
da Saúde e da Vida da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio  
Grande do Sul

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Siebel (FURG)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone (PUCRS)

Prof. Dr. Jean Pierre Oses (UFPEL)

**Porto Alegre**

**2023**

## Ficha Catalográfica

C871i Couto, Giovanna Trevisan

Investigação do papel da Adenosina na suscetibilidade a crises convulsivas induzidas pela exposição ao etanol em peixe-zebra (*Danio rerio*) / Giovanna Trevisan Couto. – 2023.  
98.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Vianna.

Coorientadora: Profa. Dra. Rosane Silva.

1. Adenosina. 2. convulsão. 3. Etanol. 4. CPA. 5. A1. I. Vianna, Mônica. II. Silva, Rosane. III. , . IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

## RESUMO

O consumo de etanol está inserido em muitas culturas ao redor do mundo. No entanto, seu consumo crônico adulto ou por gestantes pode levar a mudanças transitórias ou permanentes no sistema nervoso central (SNC). Esses distúrbios na sinalização neuronal podem culminar em episódios convulsivos. Nesse contexto, a sinalização adenosinérgica é capaz de atuar como anticonvulsivante endógeno através da sua ação neuromoduladora. As perturbações dessa sinalização podem acarretar alterações na suscetibilidade a crises convulsivas conforme o estágio de desenvolvimento em que a perturbação ocorre e o tempo de exposição do agente perturbador. Esta tese compreende três trabalhos experimentais que abordam diferentes aspectos da relação entre o sistema adenosinérgico e a suscetibilidade a crises convulsivas associadas à exposição ao etanol em diferentes fases do desenvolvimento em peixe-zebra. No primeiro trabalho, avaliamos a expressão e funcionalidade do receptor  $A_1$  de adenosina ao longo de três fases de desenvolvimento: larval (6 dias pós-fertilização, dpf), adulta (8 meses pós-fertilização, mpf) e idosa (24 mpf). A funcionalidade do receptor  $A_1$  foi avaliada através da resposta locomotora basal e da sensibilidade ao pro-convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) à adenosina e ao agonista rígido CPA ( $N_6$ -ciclopentiladenosina) em diferentes doses e concentrações ao longo do desenvolvimento. O uso da adenosina pura não foi capaz de promover o conhecido efeito hipolocomotor, mesmo em concentrações e doses altas, como  $500 \mu\text{M}$  para larvas e  $6 \text{ mg.Kg}^{-1}$  para adultos, respectivamente. O CPA promoveu hipolocomoção em larvas a partir da concentração de  $100 \mu\text{M}$  e para adultos a partir da dose de  $20 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . O efeito anticonvulsivante do CPA foi alcançado nas doses de  $75 \mu\text{M}$  para larvas e  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$  para adultos. A expressão gênica relativa do receptor  $A_1$  de adenosina aumentou 9,3 e 8,4 vezes em animais de 8 e 24 mpf em relação as larvas de 6 dpf, respectivamente. No segundo manuscrito, avaliamos o envolvimento da adenosina na suscetibilidade à convulsão de animais adultos após a exposição e a abstinência ao etanol. Animais adultos foram submetidos diariamente por uma hora ao etanol (0,5%) por 16 dias (exposição contínua) ou por 8 dias seguidos de 8 dias ou 1 dia de abstinência ao etanol. A sensibilidade à convulsão foi demonstrada pelo

aumento do número de animais atingindo convulsões tônico-clônicas nos grupos abstidos de etanol (1 ou 8 dias) mesmo em dose subconvulsivante de PTZ. O CPA foi capaz de prevenir o desenvolvimento destas crises convulsivas nos animais abstidos de etanol na dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. A avaliação da expressão de gênica dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2aa</sub>/A<sub>2ab</sub> de adenosina e da enzima ecto-5'-nucleotidase em encéfalo, revelou que o grupo abstido (1 dia) teve a expressão gênica do receptor A<sub>1</sub> reduzida em relação aos demais grupos. No terceiro trabalho, avaliamos a suscetibilidade às crises convulsivas em animais submetidos a um modelo de Síndrome Alcoólica Fetal e o possível envolvimento da adenosina. Para isso, foi feita uma exposição única a 1% de etanol em embriões de peixe-zebra entre 24 e 26 horas pós-fertilização. A suscetibilidade a convulsões induzidas por PTZ e o efeito anticonvulsivante do CPA foram avaliados em larvas de 7 dpf e adultos de 3 mpf. A exposição embrionária ao etanol não foi capaz de aumentar a suscetibilidade à crise convulsiva, visto que o número de animais convulsionando não diferiu entre os grupos tratado e controle. No entanto, para os estágios convulsivos alcançados no estágio larval, estágios I e II, a latência (I e II) e a duração (I) diferiram entre os grupos, indicando uma maior sensibilidade nos animais expostos ao etanol. Na idade adulta, a exposição embrionária ao etanol não alterou o número de animais atingindo estágios convulsivos, bem como a latência ou duração destes estágios. Estes resultados contribuem para a importância da manutenção do curso normal da modulação adenosinérgica ao longo do desenvolvimento, em especial do papel do receptor A<sub>1</sub> de adenosina no contexto da sensibilidade ao etanol, bem como da contribuição da adenosina para o aumento da sensibilidade à convulsão em indivíduos adultos abstidos de etanol.

Palavras-chave: Adenosina, convulsão, etanol, CPA, A<sub>1</sub>, peixe-zebra

## ABSTRACT

Ethanol consumption is embedded in many cultures around the world. However, its chronic consumption in adults or during pregnancy can lead to transient or permanent changes in the central nervous system (CNS). These disturbances in neuronal signaling include behavioral effects that can culminate in seizure episodes. In this context, adenosinergic signaling is an endogenous anticonvulsant through its neuromodulatory action. Disturbances in this signaling pathway can lead to changes in susceptibility to seizures depending on the stage of development in which the disturbance occurs and the time of exposure to the disturbing agent. This thesis comprises three experimental studies that address different aspects of the relationship between the adenosinergic system and susceptibility to seizures associated with exposure to ethanol at different stages of development in zebrafish. In the first study, we evaluated the expression and functionality of the adenosine A<sub>1</sub> receptor throughout three developmental stages: larval (6 days post-fertilization, dpf), adult (8 months post-fertilization, mpf) and old (24 mpf). The functionality of the A<sub>1</sub> receptor was evaluated through the baseline locomotor response and sensitivity to the proconvulsant pentylenetetrazole (PTZ) to adenosine and the rigid agonist CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine) at different doses and concentrations throughout development. The use of adenosine per se was not able to promote the known hypolocomotor effect, even at high concentrations and doses, such as 500 μM for larvae and 6 mg.Kg<sup>-1</sup> for adults, respectively. CPA promoted hypolocomotion in larvae from a concentration of 100 μM and in adults from a dose of 20 mg.Kg<sup>-1</sup>. The anticonvulsant effect of CPA was achieved at doses of 75 μM for larvae and 10 mg.Kg<sup>-1</sup> for adults. The relative gene expression of the adenosine A<sub>1</sub> receptor increased 9.3 and 8.4 times in 8 and 24 mpf animals compared to 6 dpf larvae, respectively. In the second manuscript, we evaluated the involvement of adenosine in the seizure susceptibility of adult animals after exposure and abstinence to

ethanol. Adult animals were submitted daily for one hour to ethanol (0.5%) for 16 days (continuous exposure) or for 8 days followed by 8 days or 1 day of abstinence from ethanol. Seizure sensitivity was demonstrated by the increased number of animals achieving tonic-clonic seizures in the ethanol abstained groups (1 or 8 days) even at subconvulsant dose of PTZ. CPA was able to prevent the development of these seizures in animals abstaining from ethanol at a dose of 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. The evaluation of the gene expression of the A<sub>1</sub> and A<sub>2aa</sub>/A<sub>2ab</sub> adenosine receptors and the ecto-5'-nucleotidase enzyme in the brain revealed that the abstained group (1 day) had a reduced gene expression of the A<sub>1</sub> receptor in relation to the other groups. In the third study, we evaluated the susceptibility to seizures in animals submitted to a model of Fetal Alcohol Syndrome and the possible involvement of adenosine. For this, a single exposure to 1% ethanol was performed on zebrafish embryos between 24 and 26 hours post-fertilization. The susceptibility to PTZ-induced seizures and the anticonvulsant effect of CPA were evaluated in 7 dpf larvae and 3 mpf adults. Embryonic exposure to ethanol was not able to increase susceptibility to seizures, as the number of animals convulsing did not differ between treated and control groups. However, for the convulsive stages reached in the larval stage, stages I and II, latency (I and II) and duration (I) differed between groups, indicating a greater sensitivity in animals exposed to ethanol. In adulthood, embryonic exposure to ethanol did not alter the number of animals reaching convulsive stages, as well as the latency or duration of these stages. These results contribute to the importance of maintaining the normal course of adenosinergic modulation throughout development, in particular the role of the adenosine A<sub>1</sub> receptor in the context of ethanol sensitivity, as well as the contribution of adenosine to the increased sensitivity to seizures in adults abstained from ethanol.

Keywords: Adenosine, seizures, ethanol, CPA, A<sub>1</sub>, zebrafish

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADK – Adenosina quinase

AMP - Adenosina 5´monofosfato

ATP - Adenosina 5´-trifosfato

CPA - N<sub>6</sub>-cyclopentyladenosine

dpf- dias-pós-fertilização

e5´nt - ecto-5´-nucleotidase

ENTs- Transportadores equilibrantes de nucleosídeos

ENT1 - Transportador independente de sódio para nucleosídeos de purina e pirimidina

ETOH - etanol

GABA - Ácido gama-aminobutírico

hpf- horas-pós-fecundação

mpf-meses-pós-fecundação

NMDA- N-metil D-aspartato

PTZ- Pentilenotetrazol

## Sumário

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>11</b>
<i>Introdução</i> .....	11
1.1 Etanol.....	11
1.1.1 Aspectos gerais.....	11
1.1.2 Espectro da Síndrome Alcoólica Fetal .....	12
1.1.3 Consumo crônico e abstinência .....	14
1.1.4 Etanol e suscetibilidade a convulsão .....	15
1.2 Adenosina .....	17
1.2.1 Aspectos gerais .....	17
1.2.2 Adenosina e o sistema nervoso em desenvolvimento .....	19
1.2.3 Adenosina e convulsões .....	20
1.2.4 Adenosina e etanol .....	22
1.3 Modelos de crise convulsiva em peixe-zebra ( <i>zebrafish</i> ) .....	24
3. Objetivos .....	26
3.1 Objetivo geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>27</b>
<i>Functioning and gene expression of adenosine A1 receptor during zebrafish (Danio rerio) development</i> .....	28
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>49</b>
<i>Anticonvulsant role of adenosine is blunted during alcohol withdrawal syndrome in na adult zebrafish model</i> .....	50
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>59</b>
<i>Avaliação do papel da adenosina sobre a sensibilidade ao PTZ em um modelo de exposição ao etanol no início do desenvolvimento em peixe-zebra</i> .....	60
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>81</b>
<i>Considerações finais</i> .....	81
<b>Anexos</b> .....	<b>93</b>
Anexo A – Homologação do projeto e aprovação CEUA.....	93
Anexo B – Trabalho realizado durante o curso que não compõe a tese.....	95
Anexo C – Comprovante de submissão Manuscrito 1 (Cap.2) .....	96
Anexo C – Comprovante de submissão do Manuscrito 2 (Cap. 3) .....	97

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Etanol

#### 1.1.1 Aspectos gerais

Atualmente, o etanol é uma das substâncias lícitas mais consumidas no mundo (Bukiya, 2019). O etanol tem propriedades psicoativas capazes de produzir dependência e está inserido em muitas culturas ao redor do mundo (OMS, 2022). O seu consumo abusivo, além de causar danos à saúde, tem um impacto social e econômico (OMS, 2022).

O consumo do etanol é um fator causal em mais de 200 condições de doença e lesão (OMS, 2022). Além disso, está associado ao risco de desenvolver problemas de saúde como transtornos mentais e comportamentais, dependência e violência, além de acentuar as doenças de origem crônica, pois agrava os efeitos da hipertensão, diabetes, hepatite e interfere no metabolismo e nas ações terapêuticas de vários medicamentos (De la Monte e Kril, 2014).

A nível global, a porcentagem de mortes atribuíveis ao etanol entre homens é de 7,7% em comparação com 2,6% de mortes entre mulheres adultas (OMS, 2022). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Rio Grande do Sul, mais de 60% dos jovens que frequentam o 9º ano do ensino fundamental, entre homens e mulheres, já experimentaram etanol alguma vez na vida. Sendo que esse percentual de consumo é maior em escolas públicas comparadas a escolas particulares (Pesquisa Nacional da Saúde do Escolar. IBGE, 2015).

Esses dados são mais preocupantes quando envolvem o consumo de etanol entre mulheres em fase gestacional, principalmente sobre o impacto que isso se dá no desenvolvimento embrionário e fetal. Segundo estudos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), agência nacional de saúde dos Estados Unidos, 1 em cada 9 grávidas com idades de 18 a 44 anos relatam consumo de etanol e cerca de 11.5% e 3.9% indicam estar bebendo etanol ou ter tido episódios de ingestão de etanol nos últimos 30 dias, respectivamente (Clark et al., 2019).

Em ocasião da pandemia, o *lockdown* levou as pessoas a consumirem etanol em casa, enfraquecendo o sistema imunológico e aumentando o risco de infecção durante a pandemia. Intensificando assim episódios depressivos, suicídio, violência doméstica e acidentes (Garcia et al., 2020). O consumo de etanol parece ser um recurso, seja para lidar com situações de luto ou de isolamento social (Drabwell et al., 2020). Nos EUA, um estudo longitudinal para avaliar padrões de consumo em pessoas maiores de 21 anos mostrou um aumento de 36 e 38% nos meses de abril e novembro, respectivamente, comparados com fevereiro de 2020 (Barbosa et al., 2023).

Isso reflete uma necessidade de políticas de restrição ao comércio de bebidas alcoólicas, bem como a conscientização dos problemas de saúde pública causados pelo uso nocivo do etanol. O *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* dos Estados Unidos estabeleceu diretrizes para limites aceitáveis (sem risco de doença) do consumo de etanol por adultos. A maioria destas diretrizes recomenda abstinência para mulheres grávidas ou que amamentam (Kiese et al., 2016). A exposição pré-natal ao álcool pode prejudicar o desenvolvimento do feto e é a principal causa evitável de defeitos congênitos e de deficiências intelectuais no desenvolvimento neurológico.

### **1.1.2 Espectro da Síndrome Alcoólica Fetal**

A ingestão materna de etanol durante a gravidez foi documentada cientificamente no final do século XIX (De la Monte e Kril, 2014). Atualmente, os fatores que influenciam o consumo pré-gestacional em mulheres são de causas diversas e normalmente estão inseridos no contexto social, tais como violência física ou sexual, sendo estímulos para a ingestão de etanol para lidar com a dor física e emocional proveniente de traumas (Skagerström, 2011). fetal, a falta de acompanhamento médico no período gestacional e o desconhecimento da gravidez, também são fatores que contribuem para a ingestão deste.

O etanol, por suas propriedades farmacológicas, atravessa rapidamente as membranas celulares, é absorvido no trato gastrointestinal superior por difusão e em seguida se distribui livremente entre os compartimentos do corpo (Bukiya A. N., 2019) Assim, o etanol tem como alvo múltiplas proteínas, processos celulares, órgãos e sistemas. No fígado, o etanol é convertido a acetaldeído que por sua vez

produz o acetato, um produto metabólico tóxico que, por meio da corrente sanguínea, participa de outros ciclos metabólicos (Cederbaum, 2012). No organismo de uma gestante, o etanol no sangue da mãe chega ao bebê através do cordão umbilical (Stratton et al., 1996). O embrião e, subsequentemente, o feto não se encontram aptos a metabolizar o etanol por conta da sua baixa massa hepática e direcionamento do metabolismo hepático para a hematopoese, acarretando que a concentração circulante e tecidual de etanol se mantenha elevada por mais tempo (Stratton et al., 1996).

O consumo de etanol durante a gravidez tem sido associado a inúmeras consequências adversas à saúde do embrião em desenvolvimento. O transtorno do espectro alcoólico fetal (*fetal alcohol spectrum disorders* ou FASD) é um termo geral que abrange a gama de efeitos adversos associados à exposição pré-natal ao etanol. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que a prevalência de FASD está entre 0,5 e 2 casos para cada 1.000 nascidos vivos (OMS, 2019). O espectro da FASD inclui a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF ou FAS do inglês *fetal alcohol syndrome*), a Síndrome Alcoólica Fetal parcial (pFAS), os transtornos do desenvolvimento relacionados ao álcool (ARND) e os defeitos congênitos relacionados ao álcool (ARBD) (Stratton et al., 1996). Adicionalmente, foi incluído no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM-5 o transtorno neurocomportamental associado à exposição pré-natal ao álcool (abreviado, em inglês, como ND-PAE do *Neurobehavioral disorder associated with prenatal alcohol exposure*) (American Psychiatric Association, 2013). No ND-PAE a exposição ao etanol é indicada por deficiências na cognição, autorregulação e funcionamento adaptativo. Desta forma, déficits de comportamento são observados em adolescentes e adultos sem que apresentem todas as características da FASD (Streissguth et al., 1997). Problemas como déficit de atenção e dificuldades no comportamento social que refletem em criminalidade são algumas das características desta patologia (Streissguth et al., 1997).

Estudos correlacionam a Síndrome Alcoólica Fetal como uma das principais anomalias do sistema nervoso central (SNC) capaz de gerar danos irreversíveis na idade adulta (De la Monte e Kril, 2014). Atualmente, não existe um teste que identifique a doença e seu diagnóstico é feito através de características físicas e

comportamentais. Características faciais anormais, microcefalia, baixo peso ao nascer, problemas auditivos, cardíacos, renais, ósseos, hiperatividade, déficit de atenção e dificuldades de aprendizagem são alguns dos fatores mais comuns que identificam a síndrome. (Williams e Smith, 2015).

O etanol prejudica a função dos neurônios e da glia e interrompe uma gama de funções, incluindo a sobrevivência neuronal, migração celular e diferenciação de células gliais (De la Monte, Kril, 2014). De forma geral, a exposição ao etanol na gravidez ocasiona na vida adulta episódios de irritabilidade, falta de amizades, dificuldade de aprendizado e memória, alterações motoras e audiovisuais (OMS, 2019). Dessa forma, é considerado que o tempo de exposição pré-natal ao etanol, a frequência de consumo e o período de desenvolvimento fetal estão diretamente relacionadas à gravidade da síndrome, sendo difícil relacionar com exatidão o reflexo da doença com o histórico comportamental materno. Em um estudo realizado em crianças, foi observado que 90,1% daquelas que foram expostas ao etanol na gestação apresentavam alterações clínicas, enquanto somente 27% das crianças controle tinham problemas clínicos (Mattson et al., 2011).

Desta forma, o etanol é considerado neurotóxico e teratogênico em qualquer estágio gestacional, podendo apresentar sequelas por toda a vida. Estudos indicam que de 3 a 21% dos indivíduos com SAF desenvolvem algum tipo de estado convulsivo (Boronat et al., 2017). Entretanto, os mecanismos subjacentes a esta suscetibilidade a convulsões em indivíduos expostos ao etanol durante o desenvolvimento inicial do Sistema Nervoso Central são pouco conhecidos.

### **1.1.3 Consumo crônico e abstinência**

A síndrome da abstinência (*alcohol withdraw syndrome, AWS*) é um dos períodos mais críticos de quem consome álcool cronicamente. Isso porque a nível de Sistema Nervoso, ocorrem mudanças adaptativas nos sistemas inibitórios e excitatórios e são mais desafiadas após a interrupção ou a redução do seu consumo (Olsen e Liang, 2017).

Com forte identificação entre os sistemas de neuromodulação, o consumo crônico de etanol inicialmente aumenta a neurotransmissão GABAérgica inibitória (Förster et al., 2016; Mihic 1999), reproduzindo efeitos semelhantes a medicamentos sedativos como benzodiazepínicos e barbitúricos (Grant, 1995). Já o

neurotransmissor glutamato (Möykkynen e Korpi, 2012) fica diminuído, por ter ação compensatória antagônica ao GABA. Após a ingestão crônica, os receptores de glutamato parecem se adaptar aos efeitos inibitórios do álcool, aumentando sua atividade excitatória (Hoffmann et al., 1990).

O glutamato, sendo o principal neurotransmissor excitatório do SNC, se utiliza do receptor N-metil D-aspartato (NMDA) como alvo primário para traduzir seu sinal. Já o etanol, de etanol regula positivamente o número de receptores NMDA (Gulya, 1991), mantendo-os aumentados até mesmo em estruturas corticais como demonstrado em estudo após a morte em tecido cerebral de indivíduos dependentes (Michaelis et al., 1990; Freund, 1996).

Durante a abstinência aguda de etanol, o aumento de receptores NMDA, como a ansiedade e o estresse (possivelmente pelo aumento de cortisol) (Jonathan et al., 2009), a ataxia, a agitação, a confusão mental e até as convulsões (Da Silva Chaves et al., 2018; Gulya, 1991). Nos animais como o peixe-zebra, essas mesmas respostas comportamentais são observadas após a exposição ao etanol, como por exemplo, *freezing* (medida de medo e/ou ansiedade), aumento de movimentos erráticos e diminuição da exploração vertical (medida de medo e/ou ansiedade) foram observados em animais abstidos (Steven Train et al., 2015)

Ainda, a exposição aguda tende a aumentar os níveis de dopamina de maneira linear dependente da concentração, explicando o aumento progressivo na quantidade de etanol consumido ocasionado pelo sistema compensatório (Gerlai et al., 2019). Dessa forma, esse perfil de consumo pode acentuar as neuroadaptações e mudanças robustas nos grupos de retirada (Vengeliene et al., 2008)

#### **1.1.4 Etanol e suscetibilidade à convulsão**

O etanol é uma substância psicoativa que afeta múltiplos alvos no SNC e interage com quase todos os neurotransmissores. Em particular, transmissores inibitórios e excitatórios como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, respectivamente. Sendo assim, é notável que o etanol interfere na neurotransmissão alterando direta ou indiretamente as concentrações destes neurotransmissores (Bukiya e Dopico, 2018). Em geral, sabe-se que o consumo do etanol na vida adulta vem associado a outros agravantes que facilitam o desenvolvimento de crises convulsivas Rathlev et al., 2006).

No contexto de um cérebro em desenvolvimento, é notável que existem alterações neuronais em crianças com síndrome alcoólica fetal (Bukiya, 2019). Exposições de longo período ao etanol levam à perda desproporcional de substância branca cerebral gerando deficiência nas funções executivas, tais como, atrofia, inflamação e toxicidade (De la Monte e Kril, 2014). Ainda, o SNC, por conter baixos níveis de antioxidantes, alta concentração de lipídeos e consumir muito oxigênio, torna-se mais facilmente suscetível ao estresse oxidativo induzido pelo etanol (Li e Wang, 2004). Um estudo realizado com roedores mostrou uma maior suscetibilidade a convulsões em um grupo tratado pré-natal com etanol quando comparado ao grupo controle (Russo et al., 2008). Estes animais apresentaram interferência na formação do hipocampo, na região temporal medial do encéfalo e criticamente envolvido em processos de aprendizagem, memória e epilepsias, além do funcionamento de receptores que interferem nas conexões tálamo-corticais (Russo et al., 2008).

Ainda não se conhece plenamente os alvos moleculares que relacionem a exposição ao etanol com o desenvolvimento de convulsões. Entretanto, fortes evidências sobre a atuação do etanol nos sistemas de neurotransmissão, como sua ação em subunidades específicas dos receptores GABA e NMDA como alvos primários do etanol e a capacidade de alterar a função das proteínas tirosina-quinase *Src* e *Fyn* que modulam os receptores NMDA e a plasticidade sináptica, fornecem informações intrigantes sobre como tais alterações poderiam corresponder a uma programação no desenvolvimento de convulsões em indivíduos adultos (Trudell et al., 2014).

Sabemos até então que o aumento da transmissão através dos receptores NMDA durante a dependência ao etanol é agravada por um aumento na liberação de glutamato (Rossetti et al 1995). Os níveis elevados deste neurotransmissor na fenda sináptica podem levar a uma superativação dos receptores ionotrópicos promovendo excitotoxicidade (Sattler e Rothstein, 2006). Ainda, a exposição prolongada ao etanol muda a expressão de aproximadamente 2000 genes (Bailey et al., 2020).

Adicionalmente, sabe-se que o etanol eleva os níveis celulares de adenosina, um potente neuromodulador, estimulando de forma indireta os receptores de adenosina (Choi, 2004). Por possuir efeitos anticonvulsivantes (Boison, 2013), a

adenosina pode ser um alvo importante nas alterações neuroquímicas relacionadas à exposição do etanol.

## 1.2 Adenosina

### 1.2.1 Aspectos gerais

A adenosina é um importante composto celular, a qual atua na regulação de todos os tecidos e órgãos (Cacciari et al., 2005), e teve seu potencial terapêutico avaliado pela primeira vez em 1930 (Kaiser e Quinn, 1999). Este é um nucleosídeo endógeno composto por uma adenina ligada a uma ribose, formada do subproduto do metabolismo de nucleotídeos da purina e outros processos celulares (Wei C. J. et al., 2011).

A disponibilidade de adenosina é resultado da ação de uma série de enzimas e transportadores de membrana. Embora várias enzimas extracelulares possam degradar ATP em ADP e AMP, foi demonstrado que apenas a enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73) pode degradar AMP em adenosina (Bianchi e Spichala, 2003; Boison D., 2013). A adenosina quinase (ADK), por sua vez é capaz de converter a adenosina em adenosina monofosfato (AMP) (Boison, 2013), enquanto a adenosina deaminase é capaz de converter adenosina em inosina (Cristalli et al., 2001). Adicionalmente, transportadores equilibrativos (ENTs) e concentrativos (CNTs) atuam transportando adenosina através das membranas celulares (Nagai et al., 2005; Fredholm et al., 2005; Novotný J., 2015)

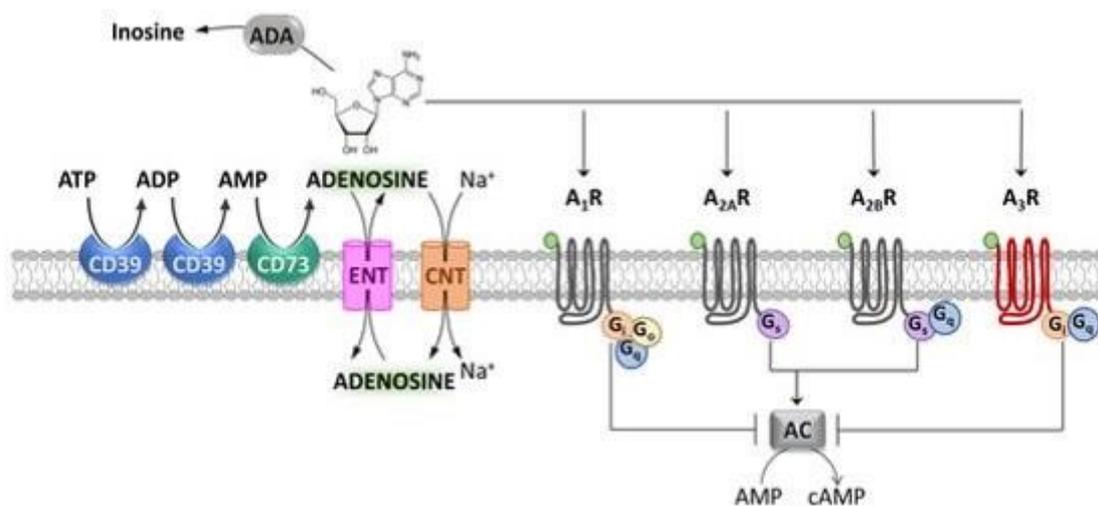


Figura 1 – Metabolismo da adenosina e tipos de receptores purinérgicos.

Fonte: <https://doi.org/10.3390/molecules27061890>

A adenosina afeta diretamente uma variedade de processos sinápticos, vias de sinalização e desempenha um papel importante na regulação de vários neurotransmissores do SNC (Sachdeva e Gupta, 2013; Novotný J., 2015). Ao contrário de um neurotransmissor, a adenosina não é armazenada e liberada de vesículas. Sua liberação e captação são mediadas por transportadores dependentes do gradiente de concentração entre citoplasma e espaço extracelular (Sachdeva e Gupta, 2013; Novotný J., 2015). A adenosina é, portanto, considerada um neuromodulador que afeta a atividade neuronal através de mecanismos pré-sinápticos, controlando a liberação de neurotransmissores, mecanismos pós-sinápticos, por hiperpolarização, e mecanismos não sinápticos, principalmente via efeitos regulatórios nas células gliais (Boison et al., 2012; Liu, H., & Xia, Y., 2015).

Os receptores purinérgicos foram classificados como P1 e P2. Os receptores P1 são subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> e A<sub>3</sub> e possuem o nucleosídeo adenosina como ligante endógeno (Cunha, 2001; Sachdeva e Gupta, 2013). A adenosina e seus agonistas atuam por meio desses receptores acoplados à proteína G, os quais são capazes de fazer modulação cerebral, dependendo principalmente das ações dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2a</sub>, devido a maior densidade e maior afinidade pela adenosina (Gomes et al., 2011). Qualquer mudança na relação da ação inibitória dos receptores A<sub>1</sub> versus o estímulo dos receptores A<sub>2a</sub> afeta diretamente a excitabilidade neuronal (Cunha, 2001).

O receptor A<sub>1</sub> exibe a maior afinidade pelo ligante endógeno e é mais prevalente e densamente expresso ao longo do SNC (Sachdeva e Gupta, 2013). Os receptores A<sub>1</sub> são especialmente expressos no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (Fredholm et al., 2011). O mecanismo da inibição da transmissão sináptica mediada por A<sub>1</sub> se baseia na combinação da inibição dos canais de cálcio pré-sinápticos e a hiperpolarização pós-sináptica através da ativação de canais de potássio, diminuindo assim a liberação de neurotransmissores e a responsividade do neurônio pós-sináptico (Gomes et al., 2011). Em contraste, os receptores A<sub>2</sub> possuem menor afinidade pela adenosina em comparação ao receptor A<sub>1</sub>, e exibem caráter estimulatório (Sachdeva e Gupta, 2013). O subtipo de receptores A<sub>2a</sub> está localizado em vários neurônios e modula positivamente a transmissão de diversos

neurotransmissores, tais como GABA, acetilcolina e glutamato (Sachdeva e Gupta, 2013)

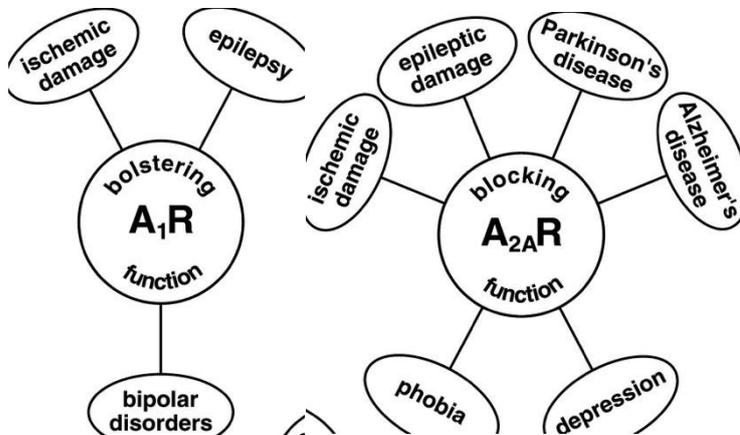


Fig. 2 – Impacto de diferentes manipulações do sistema de neuromodulação da adenosina

Fonte: Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration –

Gomes et al., 2011.

### 1.2.2 Adenosina e o sistema nervoso em desenvolvimento

O ATP juntamente com a adenosina é liberado das células em função da sua atividade metabólica, sendo ambos relevantes na comunicação célula-célula. Um dos importantes papéis da sinalização purinérgica é o controle de diferentes processos de desenvolvimento, como a neurogênese embrionária (Rodrigues et al., 2018). A relevância das purinas no desenvolvimento do cérebro está associada a distúrbios do neurodesenvolvimento, sendo este um alvo importante para o entendimento de ajustes da conectividade cerebral (Rodrigues et al., 2018).

Evidências mostram que a sinalização purinérgica está envolvida em diferentes estágios do desenvolvimento cerebral. Além do papel do ATP extracelular, a sinalização purinérgica está presente na embriogênese desde a gastrulação e formação de camadas germinativas (Rodrigues et al., 2018). Sendo o receptor A1 responsável por inibir o crescimento de neuritos e modular a atividade neuronal imatura em diferentes regiões do cérebro incluindo hipocampo e córtex enquanto o receptor A2a é responsável pela ativação e crescimento de dendritos e o alongamento axonal por diferentes vias de sinalização (Jeon et al., 2011; Ribeiro et al 2016). Isso implica desde a formação de neurônios, a migração e a alocação

até sua orientação morfológica e sinaptogênese, processos essenciais para projetar uma cito-arquitetura cerebral (Rodrigues et al., 2018).

Os efeitos da adenosina no sistema nervoso podem ser mais proeminentes no período pós-natal no qual existe crescimento robusto dos axônios. A adenosina liga-se aos receptores de adenosina A<sub>1</sub> em concentrações fisiológicas, tornando mais provável deste tipo de receptor traduzir os efeitos da adenosina e influenciar o crescimento neuronal (Rivkees, 2011). De fato, existe uma grande redução no volume da substância branca, ventriculomegalia, redução no desenvolvimento axonal e perda de neurônios quando receptores do tipo A<sub>1</sub> são ativados por agonistas não hidrolisáveis (Turner et al., 2002; Rivkees, 2001).

Outro aspecto relevante é que comumente o SNC de fetos e neonatos são expostos ao antagonismo dos receptores adenosinérgicos, pois, este estado hiperexcitável é essencial para o desenvolvimento cerebral de um neonato, sendo esta população de maior risco para desenvolver episódios convulsivos (Mottahedin 2017; Rakhade 2009). Um outro exemplo é a cafeína, que é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina (Fredholm et al., 2011). A exposição à cafeína por um longo prazo durante a embriogênese gera uma sinalização alterada da adenosina (Rivkees e Wendler, 2017), sendo este um processo crítico para o desenvolvimento normal (Rivkees e Wendler, 2017). Sendo assim, o sistema adenosinérgico é um candidato interessante na identificação de alvos moleculares que possivelmente estejam relacionados a alterações duradouras na atividade neuronal. De fato, sob estresse tecidual, como a exposição ao etanol, os níveis de adenosina aumentam localmente e, por consequência, os neurônios são expostos a alterações nos níveis de adenosina (Hughes, et al., 2018). Essa ativação dos receptores P1 por sua vez desencadeia uma cascata de eventos que podem levar ao comprometimento do crescimento neuronal durante o desenvolvimento e assim a uma gama de consequências.

### **1.2.3 Adenosina e convulsões**

A epilepsia é uma doença crônica não transmissível caracterizada por descargas elétricas excessivas e temporárias no cérebro, podendo causar ou não episódios de movimentos involuntários (convulsões) que podem envolver parte do corpo ou o corpo inteiro e algumas vezes acompanhado de perda de consciência

(WHO, 2023). Classifica-se como idiopática aquela que não tem uma causa identificável, sendo esta a forma mais prevalente, e como epilepsia sintomática, aquelas que incluem fatores genéticos, decorrem de infecções neuronais como meningite e encefalite, ferimentos na cabeça, tumores cerebrais, danos no período pré-natal e perinatal, abuso de substâncias psicoativas, entre outras causas desconhecidas (OMS, 2019).

Atualmente, a epilepsia é considerada um dos distúrbios neurológicos mais comuns e afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas de todas as idades ao redor do mundo (OMS, 2019). Sua prevalência é de 3-14 por 1000 crianças e 5-19 por 1000 em adultos, sendo proveniente de diversas etiologias (Gomes et al., 2011). Segundo a OMS, 80% desses pacientes vivem em países de baixa e média renda, o que leva a pensar que a falta de profissionais treinados para tratar e diagnosticar, o precário acesso a medicamentos antiepilépticos e a falta de informação e de acompanhamento gestacional são agravantes para a doença (OMS, 2019).

Além disso, pacientes com epilepsia tem alta prevalência de comorbidades, incluindo alterações cognitivas, déficit de atenção, depressão e ansiedade que podem até preceder o seu diagnóstico (Boison D., 2016). Ainda, o estresse celular pode ocasionar neuroinflamação aumentando a probabilidade de manifestação de crises (Menéndez Méndez et al, 2020). Embora a associação com outras patologias não tenha sido totalmente elucidada, o envolvimento de estruturas anatômicas e neurotransmissores em comum leva a relacionar com tais comorbidades.

Em neonatos, a convulsão pode aumentar 3-6 vezes mais o risco de morte prematura (OMS, 2019). Esta manifestação é o início de um limiar para o desenvolvimento de uma doença severa na qual reflete uma anormalidade no SNC. O predomínio da excitação sobre a inibição da atividade neuronal, provoca um desequilíbrio. Isso é decorrente da sinalização exagerada do glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, combinado com uma ação deficiente do GABA, o principal neurotransmissor inibitório. Dessa forma, a inibição direta da sinalização glutamatérgica mediada principalmente pela adenosina através dos receptores  $A_1$  é necessária para evitar a disseminação de convulsões (Li et al., 2007). Estudos em camundongos identificaram maior suscetibilidade a convulsões espontâneas em animais com *knockout* de receptores  $A_1$ , enquanto a inativação

genética dos receptores  $A_{2a}$  tornou-os mais resistentes a convulsões (Li et al., 2007)

Em consonância a isto, temos a adenosina como um importante anticonvulsivante endógeno (Dunwiddie, 1980, Weltha et al., 2019). A capacidade da adenosina, através dos receptores  $A_1$  e  $A_{2a}$  em modular as transmissões sinápticas, leva a considerar o sistema adenosinérgico como um alvo terapêutico no manejo de distúrbios cerebrais. De forma geral, a adenosina desempenha um papel sinalizador de situações de perigo, considerando que suas concentrações se elevam drasticamente em desequilíbrio da homeostase (Weltha et al., 2019).

A adenosina pode ser liberada dos neurônios nas sinapses (por exocitose) ou com a participação dos transportadores de nucleosídeo de equilíbrio (ENTs) (Cieślak et al., 2017). Sob condições fisiológicas, a adenosina disponível na fenda sináptica pode ter origem via ENTs, enquanto em situações de estresse fisiológico, como isquemia e crises convulsivas, a adenosina é liberada predominantemente da hidrólise de ATP exercida pela atividade das ectonucleotidases, em especial pela ação da ecto-5'-nucleotidase (Cunha et al 1992; Augusto et al., 2013). Dessa forma, a neuroproteção mediada pela adenosina é relacionada à inibição dos canais de  $Ca^{2+}$  pré-sinápticos e à ativação de canais de  $K^+$  pós-sinápticos promovendo hiperpolarização (Cunha, 2001).

Em geral, com base nos efeitos amplamente difundidos e frequentemente benéficos, podemos considerar o receptor de adenosina e a adenosina endógena constituintes de um potente sistema terapêutico na supressão de atividade ictal. Atuando como neuroprotetor inibitório via ativação de  $A_1$  (Meghji e Newby, 1990, Weltha et al., 2019) e facilitando a função sináptica via estímulo  $A_{2a}$  (Cunha 2001, 2008; Weltha et al., 2019). Modulando assim a atividade neuronal e alterando o limiar convulsivo independente da etiologia da crise.

#### **1.2.4 Adenosina e etanol**

A adenosina como neuromodulador possui um papel direto na mediação de muitas respostas celulares e comportamentais ao etanol (Sharma et al., 2010). O etanol medeia suas ações através de sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios (Rico et al., 2008). Além disso, o etanol ativa as vias de transdução de

sinal levando a alterações na expressão gênica e função neuronal (Franke e Illes, 2006).

Atualmente, sabemos que o etanol interage com os receptores de adenosina por dois mecanismos: o primeiro acontece pelo metabolismo do etanol no fígado que resulta na liberação de acetato no sangue que atravessa livremente a barreira hematoencefálica. Uma vez no cérebro, o acetato é convertido em Acetil-CoA em um processo que requer ATP e gera AMP. Este é convertido em adenosina pela nucleotidase, elevando os níveis basais de adenosina extracelular no encéfalo (Sharma et al., 2010, Rico et al., 2008), provocando alterações na ativação do receptor A<sub>1</sub> (Hughes et al., 2018).

O segundo mecanismo pode ser explicado pela inibição da atividade de transportadores do tipo ENT1 (transportador independente de sódio para nucleosídeos de purina e pirimidina). Sabe-se que a exposição aguda ao etanol aumenta os níveis de adenosina através da inibição seletiva de transportadores ENT1, enquanto a exposição crônica leva à menor regulação de ENT1 (Ruby et al., 2010). O etanol altera a fosforilação da alça citoplasmática pela proteína quinase, modificando a atividade de transporte de adenosina (Ruby et al., 2010).

Estudos *in vitro* de cultura celular (Sharma et al., 2010) mostraram que a exposição aguda ao etanol aumenta os níveis de adenosina extracelular. Isso se confirma em experimentos realizados com camundongos (Nam et al., 2011) em que também há elevação da adenosina e inibição seletiva de ENT1. Os animais com *knockout* do gene ENT1 apresentaram diminuição do tônus adenosinérgico, resultando em aumento no consumo do etanol e o tratamento com agonista do receptor A<sub>1</sub> diminui o consumo de etanol em ratos nulos para ENT1. (Sharma et al., 2010).

Um mecanismo subjacente ao aumento da preferência alcoólica dos camundongos *Knockout* de ENT1 envolve o aumento da neurotransmissão de glutamato no *nucleos accumbens* (NAc) (Nam et al., 2011). A inibição do receptor A<sub>1</sub> aumenta a atividade pós-sináptica induzida pelo glutamato no NAc enquanto a ativação do A<sub>1</sub> reduz o consumo do etanol em camundongos ENT1 nulo (Nam et al., 2011). Isso sugere que a desregulação da sinalização da adenosina juntamente com o impacto da transmissão de glutamato tem mostrado uma forte mediação dos efeitos e abusos relacionados ao etanol.

Em geral, sabemos que a exposição precoce ao etanol é capaz de afetar permanentemente a produção de adenosina por meio da ecto-5-nucleotidase (Lutte et al., 2018). Experimentos de nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição aguda e crônica ao etanol em larvas de peixe-zebra durante o desenvolvimento inicial leva a um aumento de 25 a 58% na atividade da ecto-5-nucleotidase (Lutte et al., 2018). Dessa forma, podemos dizer que a exposição ao etanol afeta na expressão de vários alvos relacionados e neurotransmissão. Sua característica lipofílica permite a interação com membranas celulares, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. A participação da adenosina nesse contexto faz do sistema purinérgico um alvo interessante para potenciais estudos farmacológicos no que se refere a mudanças neuroquímicas.

### **1.3 Modelos de crise convulsiva em peixe-zebra (*zebrafish*)**

O pentilenotetrazol (PTZ) é um dos fármacos convulsivos mais utilizados para descoberta e desenvolvimento de medicamentos antiepilépticos (Baraban et al 2005, Mussulini et al 2013). Seu mecanismo de ação age via bloqueadores do sistema GABAérgico, sendo um antagonista competitivo de GABAA, exaltando então a sinapse glutamatérgica (Velisek et al., 1990,1991).

As convulsões induzidas por PTZ em peixe-zebra são comparáveis às relatadas em roedores. A resposta convulsiva em peixe zebra é dividida em estágios que levam em consideração: a hiperatividade cerebral, intensidade das crises e prejuízos comportamentais (Stewart et al 2012). Sendo para larvas o estágio 1 - aumento drástico da atividade de natação; estágio 2 – nado em círculo e estágio 3 - convulsões semelhantes a clônus com perda de postura, caída para o lado e imobilidade (Baraban et al., 2005). velocidade, convulsão clônica, contrações musculares e saltos; estágio 5 – perda de postura e queda para o fundo do aquário, convulsão tônica, falta de movimentos e rigidez corporal (Kundap et al., 2017; Mussulini et al., 2013). Os diferentes graus de severidade nos permitem diferenciá-los em estágios seja por um aumento na velocidade natatória ou em convulsões semelhantes a estágio clônico com perda de postura (Baraban et al., 2005). Além disso, o peixe-zebra já tem sido utilizado para investigar o potencial

modulador de vários sistemas de sinalização nervosa com potencial terapêutico, incluindo a adenosina (Siebel et al., 2015).

O expressivo número de linhagens de peixe-zebra, as quais apresentam diferentes características fenotípicas e comportamentais, e as várias formas de manejo e ambientes de criação, podem impactar a replicabilidade de dados (Gerlai, 2019). Apesar disto, o peixe-zebra ganhou seu espaço no que se refere a estudos de genética e comportamento.

Sua alta equivalência gênica e o complexo sistema anatômico evolutivo dos vertebrados, conservou os principais neurotransmissores, hormônios e receptores (Gerlai 2014, Kalueff 2014, Howe et al., 2013). Tanto em fase larval como adulta, tem se mostrado efetivo em virtude dos fenótipos comparáveis a humanos (Alfaro et al., 2011) tornando um modelo bem consolidado nos estudos de neurociências (Bertoncello e Bonan, 2021, Da silva et al., 2016)

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o envolvimento do sistema adenosinérgico na suscetibilidade à convulsão mediada pela exposição ao etanol em fase inicial do desenvolvimento e na vida adulta através do estudo de parâmetros bioquímicos e moleculares em peixe-zebra.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Definir o efeito da adenosina e do agonista específico do receptor A<sub>1</sub> N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA) sobre o perfil de resposta locomotora basal e de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra;
- Quantificar a expressão gênica relativa do receptor A<sub>1</sub> de adenosina por qPCR em larvas totais e encéfalo de adultos de peixe-zebra;
  - Avaliar o efeito da exposição ao etanol e da abstinência ao etanol sobre a suscetibilidade à convulsão através da exposição à dose subconvulsivante de PTZ em peixe-zebra adulto;
- Avaliar o efeito anticonvulsivante do CPA em peixe-zebra adulto abstido do etanol;
  - Avaliar a expressão gênica relativa dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2aa</sub> e A<sub>2ab</sub> de adenosina e da enzima ecto-5'-nucleotidase em encéfalo de peixe-zebra adulto exposto ao etanol de forma contínua e abstidos de etanol;
- Avaliar e caracterizar a suscetibilidade ao PTZ em peixe-zebra na fase larval e adulta após a exposição embrionária a 1% de etanol;
- Avaliar e caracterizar o perfil da resposta ao CPA sobre a suscetibilidade ao PTZ em peixe-zebra na fase larval e adulta após a exposição embrionária a 1% de etanol; e
- Avaliar a expressão gênica relativa dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2aa</sub> e A<sub>2ab</sub> de adenosina e da enzima ecto-5'-nucleotidase por qPCR em larvas totais e encéfalo de adultos de peixe-zebra após a exposição embrionária a 1% de etanol.

## Capítulo 2

Manuscrito **Functioning and gene expression of adenosine A<sub>1</sub> receptor during development of zebrafish (*Danio rerio*)** (ID is ZEB-2023-0002)

Submetido ao periódico **Zebrafish** (ISSN: 1545-8547 | Online ISSN: 1557-8542)

Qualis CB1: A2

*Status:* em revisão (submetido em 19/01/2023)

# Functioning and gene expression of adenosine A<sub>1</sub> receptor during zebrafish (*Danio rerio*) development

Authors: Giovanna Trevisan Couto<sup>1</sup>, Higor Arruda Caetano<sup>1</sup>, Guilherme Pietro da Silva<sup>1</sup>, Liliana Rockenbach<sup>2</sup>, Jéssica Scheid da Silva<sup>1</sup>, Monica Ryff Vianna<sup>3</sup>, Rosane Souza Da Silva<sup>4\*</sup> 1Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Running title: A<sub>1</sub> adenosine receptor during zebrafish development

\*Corresponding author:

Rosane Souza Da Silva

Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal Fluminense

R. Prof. Marcos Waldemar de Freitas Reis - São Domingos, Niterói - RJ, 24210-

201 E-mail: [rosanesouzadasilva@gmail.com](mailto:rosanesouzadasilva@gmail.com)

Keywords: adenosine; A<sub>1</sub> receptor; CPA, development; convulsion; translational science

## ABSTRACT

A<sub>1</sub> adenosine receptor is the most widely expressed P1 receptor in vertebrates. During basal physiological activation, this receptor is responsible for inhibitory tonus of the central nervous system. While increased levels of adenosine are crucial to promote tissue protection in threatening situations, such as convulsion and hypoxia. Zebrafish is an established model organism for studies on health and disease. The neuroprotection attributed to adenosine function can be safely studied using zebrafish. However, the lack of knowledge about concentration/dose response of zebrafish to available commercial ligands to A<sub>1</sub> adenosine receptor and the developmental changes of purinergic system in zebrafish are constraining the progress in this area. Here, we evaluated the functionality of A<sub>1</sub> adenosine receptor through development, accessing: (I) the effects of the agonist N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA) over locomotor parameters, (II) the anticonvulsant properties of CPA and adenosine per se in the pentylenetetrazol-induced seizure model, and (III) the gene expression of A<sub>1</sub> adenosine receptor through development. CPA promoted decreased distance travelled in the highest concentrations/doses tested (larvae: 100 and 500 μM; adults: 20 mg.kg<sup>-1</sup>), altered mean velocity (larvae: increase at 500 μM; adults: decrease in 20 mg.kg<sup>-1</sup>) and time in the bottom zone of apparatus (adults: decrease in 20 mg.kg<sup>-1</sup>). CPA anticonvulsant effect was reached at 75 μM for larvae and 10 mg.kg<sup>-1</sup> for adults, while adenosine had minor anticonvulsant effects in the concentration tested (larvae: 5 and 10 μM). The level of gene expression of A<sub>1</sub> adenosine receptor increased in adults around 9 times in comparison to larvae. These results suggest that zebrafish has similar responses to CPA as mammals. To avoid confounding factors, such as locomotor effects, during any brain function investigation using A<sub>1</sub> adenosine receptor as a target, the concentration bellow 100 μM or the dose 20 mg.kg<sup>-1</sup> of CPA are ideal for zebrafish at larval and adult stages, respectively.

## 1. INTRODUCTION

Adenosine is an ubiquitous endogenous modulator with important actions on nervous and immune systems

(1). This purine nucleoside impacts behavior, sleep, and Central Nervous System (CNS) functions in health and disease (2). Adenosine effects are determined by its levels, affected by nucleoside transporters and metabolizing enzymes, and the distribution of its specific receptors, P1 receptors, named A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub> (3). A<sub>1</sub> adenosine receptor is the most abundant adenosine receptor in CNS, acting as a massive neuroprotector during brain insults (3). In mammals, A<sub>1</sub> adenosine receptor has the highest affinity for adenosine among P1 receptors and promotes basal inhibition in physiological levels of adenosine (4, 5, 6).

The use of zebrafish to study the CNS function in health and disease is consolidated (Guo, 2004). The success of this model organism in science is attributed to the easy manipulation, high fecundity, rapid and external development in a transparent chorion, the behavioral complexity of larva and adults, and mostly, by the high physiological and genetic homology to mammals (7, 8). In neuroscience research, zebrafish has important advantages and disadvantages.

Zebrafish cells, organs and systems show high similarity to their human counterparts. The complex behavior of zebrafish offers a rich repertoire, ranging from social interaction to aggressiveness and addictive behavior (9, 10). Comparison to the human reference genome shows that approximately 70% of human genes have at least one obvious zebrafish orthologue in the zebrafish genome (8). In the other hand, the genome duplication in the teleostean evolutionary history has important implications in the physiological responses of zebrafish and deserves observance (8). The brain of zebrafish has undeveloped areas, such as cortex, and incomplete parallelism of some brain areas to their mammalian counterparts (7). Also, in the study of behavior, zebrafish exhibits fish particularities such as the temporal development of social skills and the lack of parental care (7).

The use of zebrafish to increase our understanding of adenosine function in health and diseases of CNS is increasing significantly. Gene expression of P1 receptors is strongly present from the very beginning of embryonic period of zebrafish development enabling similar pharmacological responses to mammals (11, 12). Caffeine, a non-selective blocker of adenosine receptor, can suppress neuroprotection, angiogenesis, and impact adenosine receptor and its downstream signaling molecules expression in developing embryos (11, 12, 13). Specific P1

receptor agonists and antagonists are used primarily based on mammalian studies and the knowledge about dose-response, target affinity and biodistribution of these drugs in zebrafish are limited. To give support of the use of this amazing animal model in the study of adenosine function, we characterized A<sub>1</sub> adenosine receptor functioning and expression during zebrafish development. The locomotor activity and responses to a proconvulsant were used as proxy to study the pharmacological adenosine function during zebrafish development.

## 2. METHODS

### 2.1 Chemicals

Adenosine, CPA (N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine), Pentylentetrazol and Tricaine (MSS-222) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were of analytical grade. Instant Ocean (marine salt) was purchased from Marine Enterprises International (Maryland, USA).

### 2.2 Animals

The AB zebrafish (*Danio rerio*) used in the experiments were produced and maintained at the Center for Biological and Experimental Models (CEMBE) at PUCRS on an automated aquarium system from Tecniplast (Tecniplast, Buguggiate, VA, Italy). A probe of the Tecniplast system continuously checks the pH and conductivity of the water. One dispenser uses a sea salt solution (20 g.L<sup>-1</sup>) (Instant Ocean, USA) to maintain the conductivity at 300-600 μS and a sodium bicarbonate solution (20 g.L<sup>-1</sup>) to maintain the pH around 7. The temperature was maintained at 26.5±1.5°C and the light/dark cycle was 14h/10h. Animals used in the experiments were 6-7 days, 3, 8, and 24 months old. The density of animals per aquarium was adjusted throughout development. The assignment for each experimental group was randomized. At the end of the experiments, the animals were euthanized by anesthetic overdose (buffered tricaine solution, 0.5 g.L<sup>-1</sup>), except for those that would undergo tissue extraction for gene expression analysis, which were euthanized by hypothermic shock in flocculated ice water (14, 15). All manipulation of animals were in accordance with the procedures described by Westerfield (16) and followed the guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation for Use of Fish in Research (17). All protocols performed in the experiments were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA-PUCRS) under registration number 8720/2018.

### 2.3 CPA exposure throughout development and locomotor assessment

Larvae (6-day post-fertilization) were individually exposed by transdermal route to CPA dissolved in water used for fish maintenance at 0.001, 0.05, 0.1, 5, 50, 100 and 500 M in a 24-well plate. The

exposure lasted 30 minutes. Control animals were exposed to the same conditions but exposed only to water. Adult zebrafish (8- and 24-months old) were exposed to CPA by intraperitoneal injection at the doses 0.1, 5, 10 and 20 mg.Kg<sup>-1</sup> in a volume of 5 µL (10 mL.Kg<sup>-1</sup>) (18) after anesthesia by immersion in a tricaine solution (0.1 g.L<sup>-1</sup>) using an insulin plastic syringe. The exposure lasted 30 minutes inside a Becker glass containing 500 mL of water of fish maintenance. Control animals were exposed to the same conditions, but only saline was injected.

Animals were individually assessed by locomotor parameters during the last 6 minutes of drug exposure. The first minute was an adaptation period and not considered for analysis for adults. For zebrafish larvae, the test apparatus for locomotor activity analysis (open field) consisted of a 24-well culture plate, containing the CPA solution or water free of drug (3000 µL), where the animals were placed individually, and their performance recorded by a digital camera (Logitech, Romanel-sur-Morges, Switzerland) located at the top of the apparatus. For 8- and 24-month-old animals the locomotor analysis took place in a glass aquarium (30 × 15 × 10 cm, length × height × width) and the recording was done by a digital front camera (Logitech, Romanel-sur-Morges, Switzerland). All tests were performed in the late morning or early afternoon (10:00AM-5:00PM). The parameters distance travelled (cm) and the mean velocity (m/s) (calculated dividing distance travelled by mobile time) were measured using the Ethovision® XT8 software package (Noldus, Netherlands) (19).

#### 2.4 Gene Expression – Quantitative Realtime PCR

For gene expression of adenosine A<sub>1</sub> receptor, 4 samples composed by a pool of 3 encephala (8- or 24-month-old animals) or a pool of 20 larvae (7-day old) each were prepared for each experimental group. Immediately, the brain or total larvae samples were kept in microtubes containing 300 µL of TRIzol reagent (Invitrogen) under -80°C, before total RNA extraction. The quantification of total RNA was done using NanoDrop (Thermo Scientific) microvolume spectrophotometer. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA following the manufacturer instruction (High capacity cDNA reverse transcription Kit - Thermo Fisher) in a final volume of 20 µL. The expression of genes was determined by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), utilizing PowerUp SYBR® Green (Invitrogen). The reference genes b- actin and elf1a were used for normalization and relative mRNA expression levels were calculated using the 2<sup>(-ΔΔC<sub>t</sub>)</sup> method. The primer sequences are described at Table 1

Target	Primer sequence	Accession number
<i>b-actin</i>	F= CGAGCAGGAGATGGGAACC R= CAACGGAAACGCTCATTGC	AF057040
<i>elf1a</i>	F=TGTCCTCAAGCCTGGTAT R=CATTACCACGACGGATGT	NM_131263.1
<i>adoraal</i>	F= ACTAAAGCTGGCCAAGTCCC R= AGGAACATTGGCTTCTCGCA	NM_001128584.1

Table1: Primer sequence of gene targets. Bp= base pairs.

## 2.5 Anticonvulsant responses of larvae and adult zebrafish to adenosine and its analogue N<sub>6</sub>-cyclopentyladenosine (CPA)

Pentylentetrazol (PTZ) was used to assess the anticonvulsant effect of adenosine or CPA in larvae (7-day-old) and adults (3-month-old). For evaluation of the adenosine impact in PTZ-induced seizures, larvae were individually exposed during 30 minutes to 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 250 and 500  $\mu$ M adenosine diluted in water for fish maintenance in a 24-well plate (3000  $\mu$ L). Adult animals were exposed to 1, 2, 4, and 6 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p) of adenosine also for 30 minutes. For evaluation of the CPA effects, we choose concentration/dose based on the first experiment, which were 50 and 75  $\mu$ M for larvae and 10 mg.Kg<sup>-1</sup> for adults. The exposure occurred during 30 minutes until the end of analysis.

The larvae and adult zebrafish were individually exposed to 10 mM PTZ (10 mM, pH 7-8) in a 24-well plate or an aquarium sized 13 cm x 11.5 cm x 8 cm (height X length X width) (500 mL), respectively. During PTZ exposure, larvae and adult fish were recorded during 6 or 10 minutes in an apparatus using a digital camera (Logitech, Romanel-sur-Morges, Switzerland) located at the top of the apparatus (for 24-well plate) or a lateral camera (for aquarium), respectively. Larvae had

its convulsive responses to PTZ analyzed considering the most characteristic stage of seizure, the stage II, when the fish display a rapid “whirlpool- like” circling behavior. For adult zebrafish, the most characteristic stage, the stage 4, when fish displays clonic seizure-like movements, was evaluated (20, 21). The number of animals reaching seizure stage IV, the latency (seconds) to reach stage IV, and the duration under this stage were registered after visual analysis of video recordings. Isolated convulsive-type state during less than 10 seconds were not considered. Video recordings were analyzed by two independent blinded evaluators and data extracted only when both were concordant.

## 2.6 Statistical analysis

Data analyses were performed using GraphPad Prism software version 9.4.1 (GraphPad Software, Inc.). Outliers were previously identified by ROUT (Q=1%) analysis. The data were checked for normality prior to further analysis using the Shapiro–Wilk normality test. Mann-Whitney test was used to compare locomotor parameters between control groups analyzed in different experimental days. Locomotor parameters were analyzed between different experimental groups by Kruskal-Wallis, or One-way ANOVA followed by the Dunn’s or Tukey’s post-hoc tests in accordance with the normality of data. When locomotor activity was assessed by time block, the statistical analysis used was Two-way ANOVA, considering time and drug dose as factors. One-way ANOVA followed by the Tukey’s post-hoc test was also used for gene expression analyses. Frequency was analyzed by Chi- Square test or Fisher’s exact test. Latency and duration of seizure stages were analyzed by One-way ANOVA followed by the Dunn’s for larvae and Unpaired T- test or Mann-Whitney’s test depending on normality analyses of data. The data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) or percentage for frequency of animals. For all comparisons, the significance level was set at  $p \leq 0.05$ . Statistical differences are graphically indicated as follows: \* represents significant differences at  $p \leq 0.05$ , \*\* at  $p \leq 0.01$ , and \*\*\* at  $p \leq 0.001$ , in relation to the corresponding control group.

## 3. RESULTS

### 3.1 Locomotor response to A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist (CPA) throughout development

As N<sub>6</sub>-cyclopentyladenosine (CPA) is one of the most used specific agonists of A<sub>1</sub> adenosine receptor in science, we evaluated the effect of acute exposure to CPA in 6-day, 8-months, and 24-months old zebrafish using a concentration/dose curve to evaluate locomotor parameters. The locomotor activity of larvae, analyzed by total distance travelled and mean velocity was not

significantly affected up to the concentration of 50  $\mu\text{M}$  (Figure 1). CPA at 100  $\mu\text{M}$  decreased total distance travelled but did not affect mean velocity (Figure 1), while 500  $\mu\text{M}$  decreased distance travelled and increased mean velocity (Figure 1A and B) of zebrafish larvae. To understand if these effects could also hinder the overall environment exploration, thigmotaxis was also analyzed, but no differences were detected between groups ( $p=0.2274$ ; Figure 1C). Two sets of experiments were performed in different days, as increased concentrations were included in the screening. On the first set of experiments, the CPA concentrations (0-5  $\mu\text{M}$ ) used were not sufficient to affect locomotor parameters, and additional experiments were performed with increasing CPA concentrations, but these concentrations also failed to affect locomotor parameter. As the Mann-Whitney comparison of controls' performances indicated a significant difference between mean velocity of controls from experimental day 1 and 2 ( $p=0.002$ ), the data from each day was independently analyzed and expressed as fold of their respective control group (Figure 1).

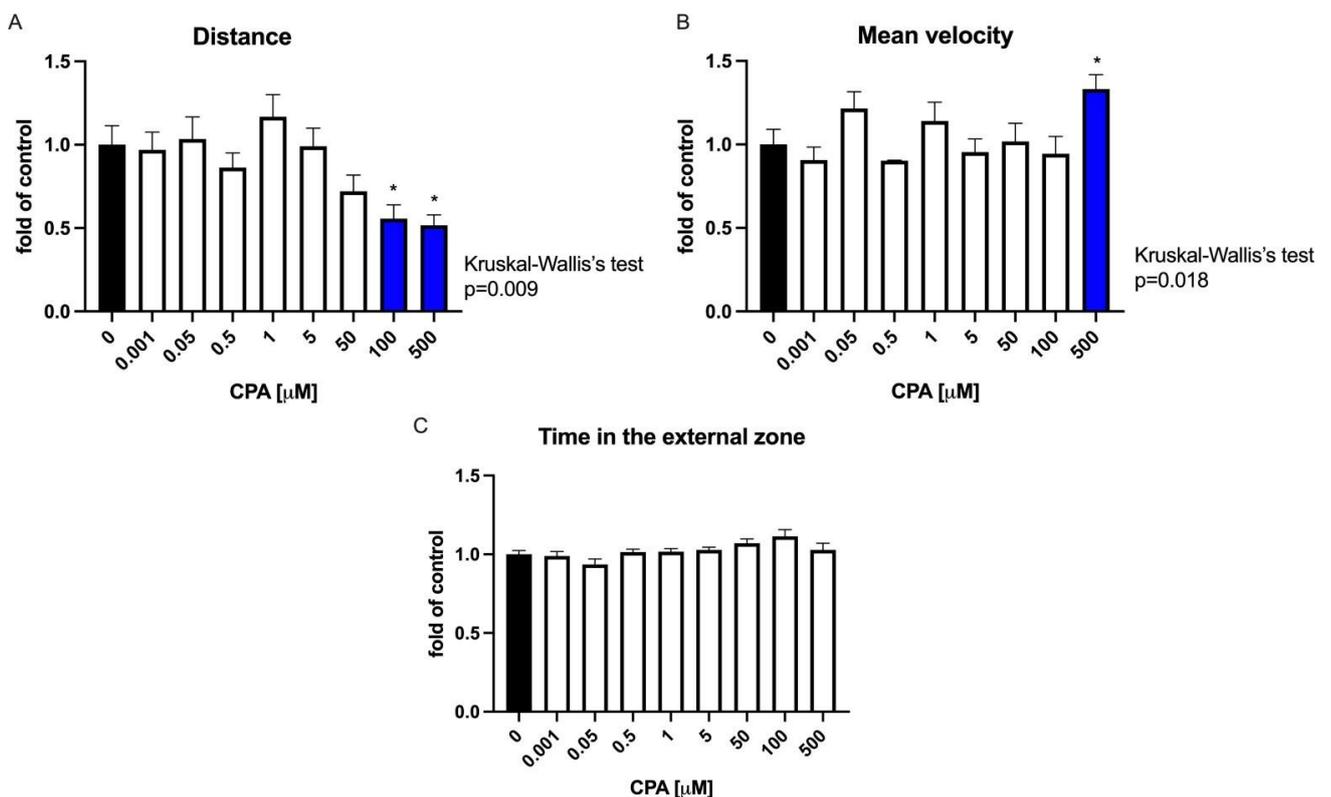


Figure 1: Concentration curve of A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist (CPA: N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine) in 6-day-old zebrafish. A: Distance travelled for 6 minutes, displayed as fold of control (mean  $\pm$  S.E.M); B: Mean velocity was calculated by total traveled distance by time in movement for 6 minutes, displayed as fold of control (mean  $\pm$  S.E.M). C: Time in the external zone of the well during 6 minutes evaluation, displayed as fold of control (mean  $\pm$  S.E.M). Fold of control was calculated determining the percentage of the mean of locomotor parameters of treated animals over the mean values of control animals. Animal

data were discharged when the video record had losses greater than 10%. Outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Data was analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Distance traveled of control animals were  $38.38 \pm 4.24$  cm (experimental day 1) and  $38.25 \pm 4.53$  cm (experimental day 2). Mean velocity of control animals were  $0.33 \pm 0.03$  cm.s<sup>-1</sup> (experimental day 1) and  $0.69 \pm 0.04$  cm.s<sup>-1</sup> (experimental day 2). Time in external zone of control animals were  $261.9 \pm 6.2$  s (experimental day 1) and  $222.8 \pm 10$  s (experimental day 2). Experiments were performed in two days with 3 separated experiments each, totalizing at least 19 animals per experimental group. Control animals were free of drug.

Adult zebrafish at 8-months of age were submitted to the dose response curve of CPA from 0.1 to 20 mg.Kg<sup>-1</sup> (i.p. injection). Distance traveled was significantly decreased in animals exposed to 20 mg.kg<sup>-1</sup>

CPA, a consistent effect throughout the consecutive minutes analyzed (Factor drug:p=0.014; Figure 2A), while no effect in mean velocity was detected by any of the doses used (p=0.31; Figure 2B). The animals showed a decreased time spent in the bottom zone of the tank when exposed to 20 mg.kg<sup>-1</sup> CPA (p=0.03; Figure 2C).

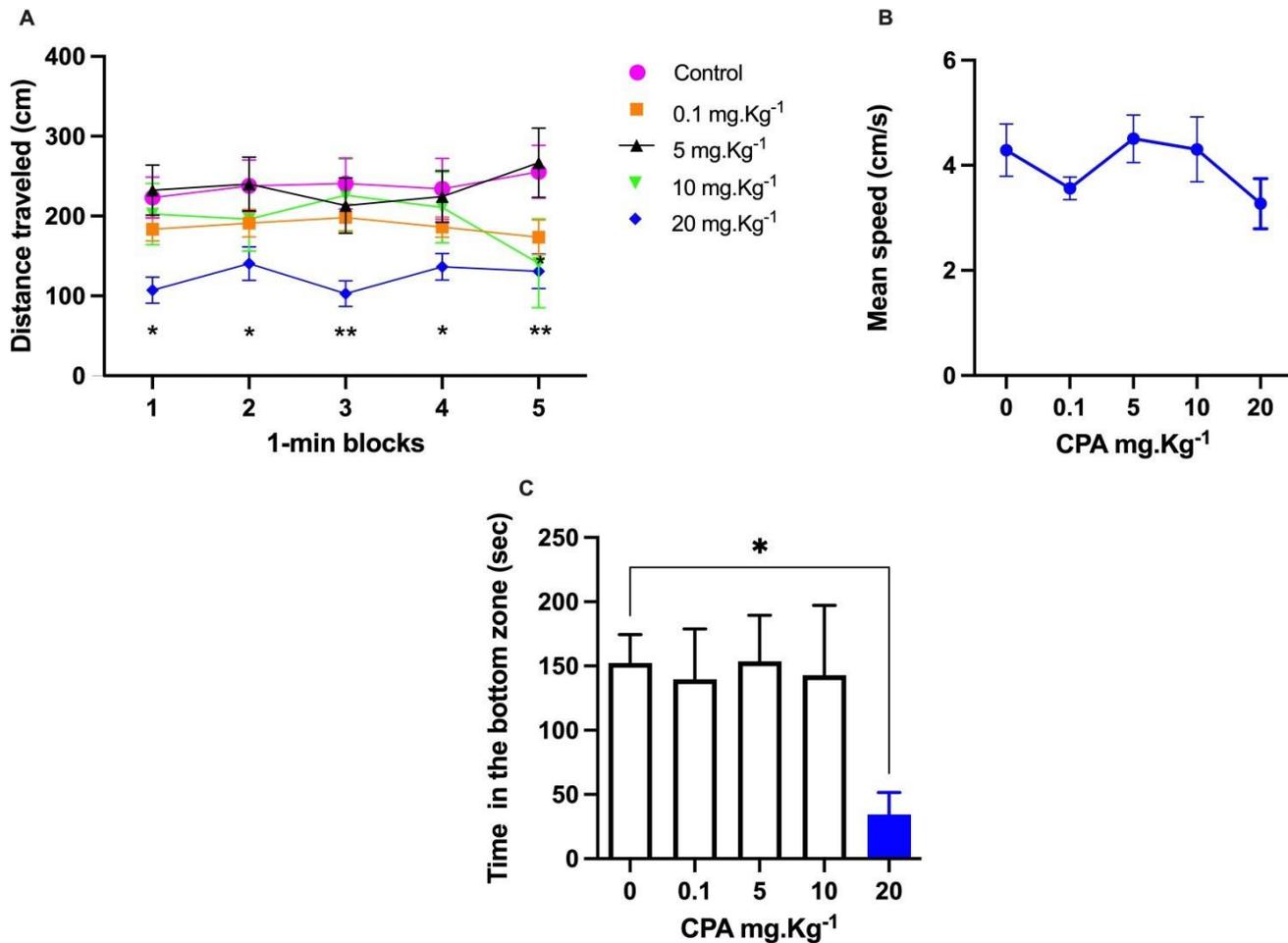


Figure 2: Dose curve of A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist (CPA: N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine) in 8-month-old zebrafish. A: Distance travelled displayed in 1-minute blocks (cm; mean ± S.E.M); B: Mean speed calculated by total traveled distance by time in movement for 6 minutes (cm.s<sup>-1</sup>; mean ± S.E.M); C: Time in the bottom zone for 6 minutes (s; mean ± S.E.M). Five to thirteen animals were used for each group. Animal data were discharged when animals spend less than 10 seconds swimming. No outliers were found by ROUT (Q=1%) analysis. Blocks of distance traveled data was analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. Mean speed data was analyzed by One-Way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. Time in the bottom zone data was analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. \* and \*\* represents p<0.05 and p<0.01, respectively.

The 24-month-old animals presented a profile of locomotor parameters similar to the 8-month-old animals, with minor differences, as follows. The 20 mg.kg<sup>-1</sup> CPA dose decreased the distance travelled throughout the experiment (Factor drug: p=0.0024; Figure 3A) and the mean velocity was also decreased in the animals receiving this high dose (p=0.013; Figure 3B). The time spent in the bottom zone was also decreased

significantly in the animals treated with 20 mg.kg<sup>-1</sup> CPA in comparison to control animals (p=0.0002; Figure 3C).

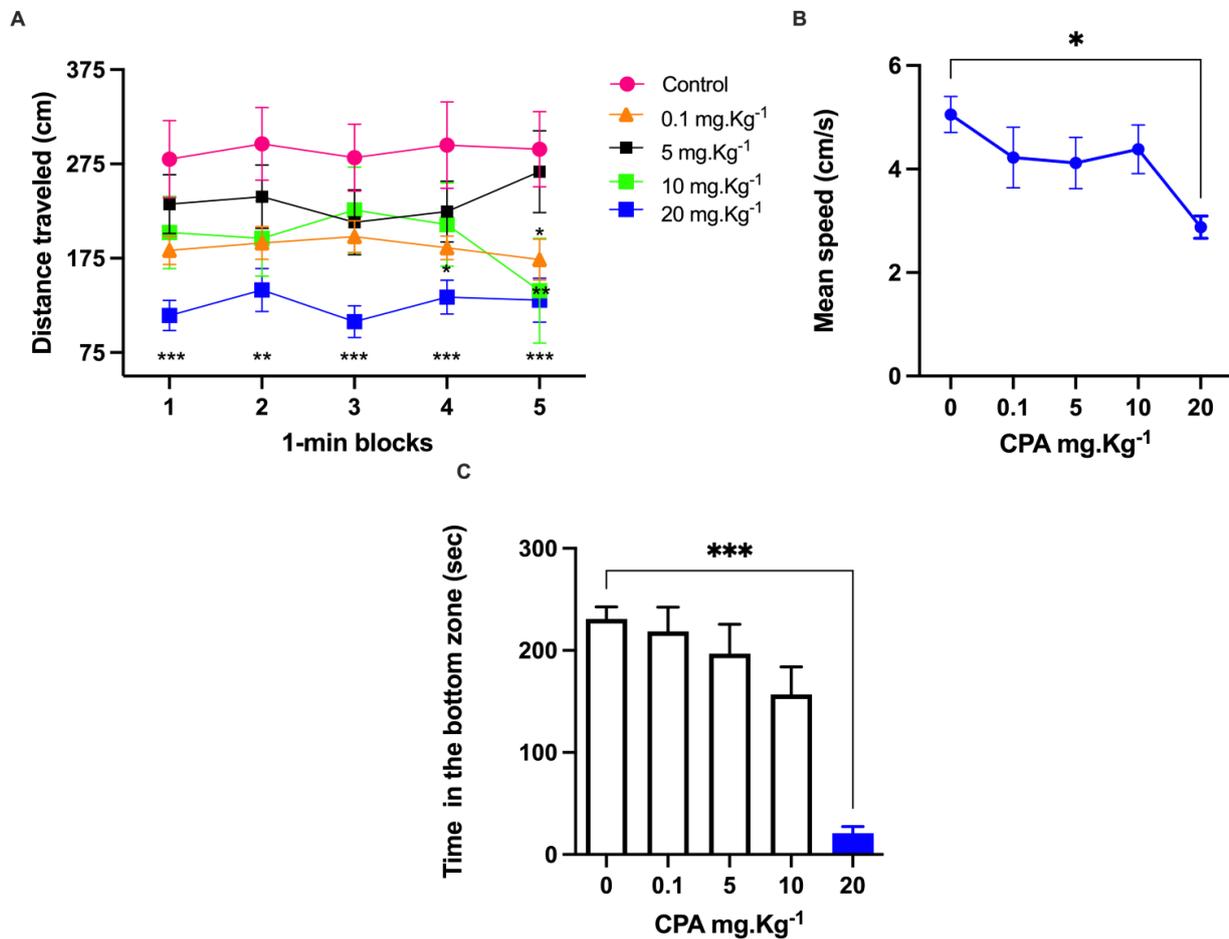


Figure 3: Dose curve of A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist (CPA: N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine) in 24-month-old zebrafish. A: Distance travelled displayed in 1-minute blocks (cm; mean ± SEM); B: Mean speed calculated by total traveled distance by time in movement for 6 minutes (cm.s<sup>-1</sup>; mean ± SEM); C: Time in the bottom zone for 6 minutes (s; mean ± SEM). Five to thirteen animals were used for each group. Animal data were discharged when animals expend less than 10 seconds swimming. Outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Blocks of distance traveled data was analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. Mean speed data was analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. Time in the bottom zone data was analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. \*, \*\*, and \*\*\* represents p<0.05, p<0.01, and p<0.001, respectively.

### 3.2 Gene expression of adenosine receptor adoraal throughout development

Next, we checked for the expression of adenosine receptor gene *adorea1* in larvae whole body samples (6 days post- fertilization) and adults' brains (8 and 24 months). The relative gene expression of *adorea1* was compared to naïve animals. The 8- and 24-month-old animals expressed 9.3 ( $p=0.0002$ ) and 8.4 ( $p=0.0003$ ) times the relative *adorea1* expression of 6-day-old larvae, respectively (Figure 4).

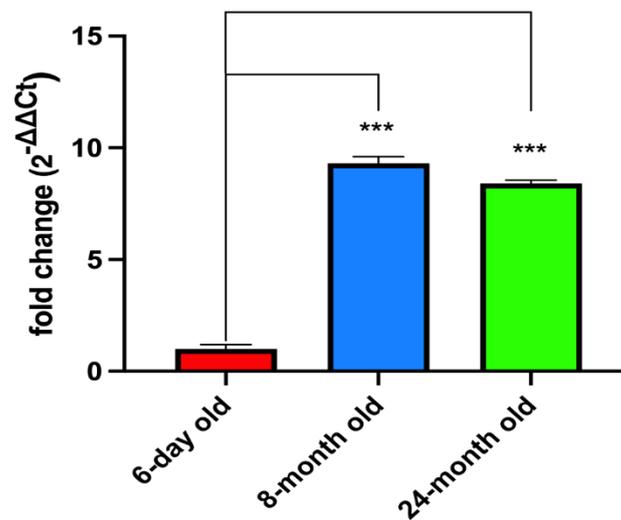


Figure 4: Relative gene expression of *adorea1* from entirely 6-day old larvae and brain from 8-, and 24-month- old adult zebrafish. Each group represents 4 pools of 20 larvae or 4 brain of adult animals. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc. Beta-actin and *elf1a* were used as reference genes \*\*\* represents  $p<0.001$ .

### 3.3 Anticonvulsant properties of CPA and adenosine throughout development

The anticonvulsant role of  $A_1$  adenosine receptor in the chemical-induced seizure model by PTZ exposure was assessed in larvae and adult zebrafish. Data from larvae exposed to adenosine ranging from 0.5 to 500  $\mu\text{M}$  showed no difference in the frequency of animals undergoing the most characteristic convulsive stage in larvae, the stage II, in comparison to controls ( $p=0.2590$ ) (Figure 5A). When latency to reach stage II and the duration of this stage were analyzed, only the adenosine concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$  were able to significantly increase the latency, while no effects were observed in the duration (Figure 5BC). Adult animals submitted to PTZ after adenosine treatment ( $1-6 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) had no effect in the frequency of animals to reach the tonic-clonic stage, stage IV (Figure 6A). The latency and duration spent to the stage IV were not affected by adenosine (Figure 6B and C).

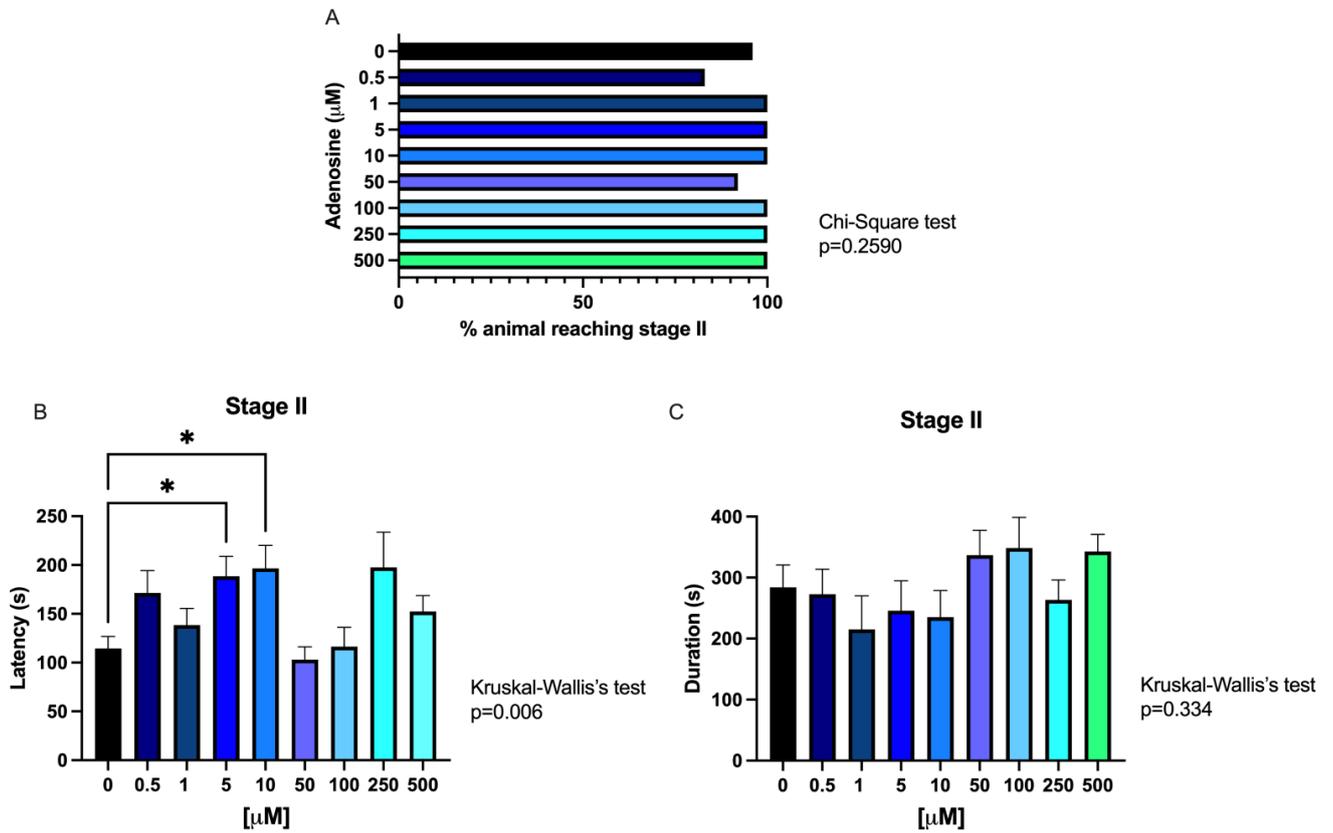


Figure 5: Zebrafish larvae (7-day old) undergoing PTZ-induced seizure (10 mM) after exposure to a curve dose of adenosine (0-500  $\mu\text{M}$ ). A: Frequency of animals reaching Stage II of seizure; B: Latency to reach stage II of seizure (mean  $\pm$  SEM); C: Duration of stage II of seizure (mean  $\pm$  SEM). Exposure to adenosine lasted 30 minutes. The latency to seizure was evaluated during 10 minutes of exposure. No outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Frequency was analyzed by Chi-square test, mean latency and duration data was analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. At least 12 animals were used in each group.

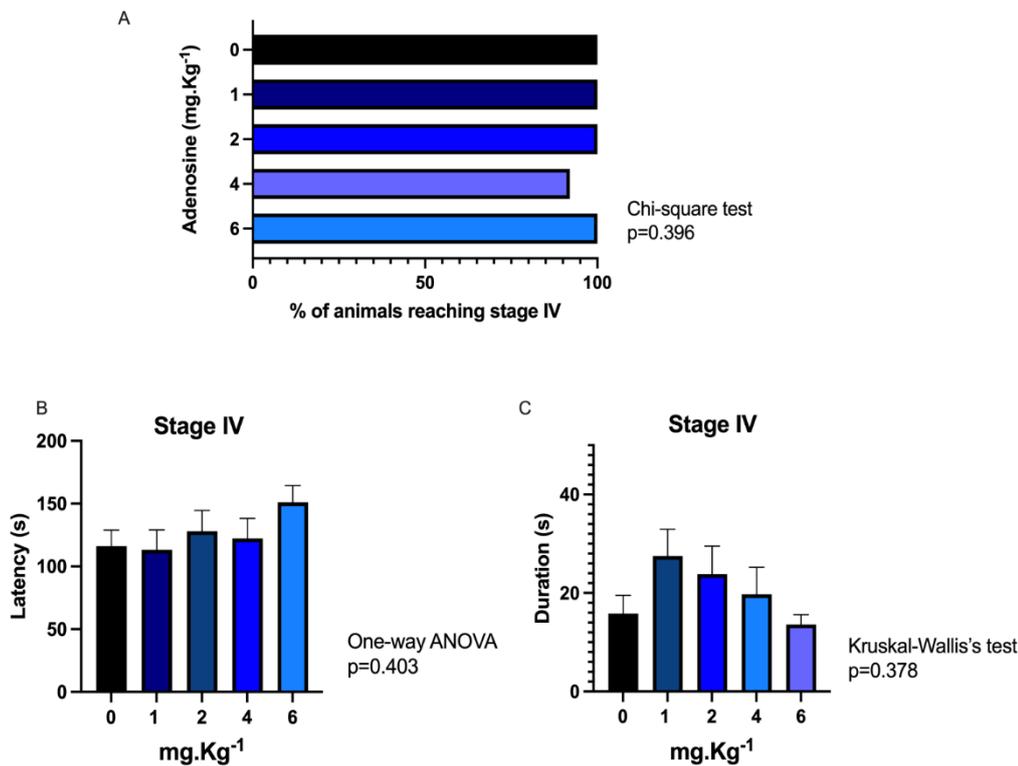


Figure 6: Adult zebrafish (3-month old) undergoing PTZ-induced seizure (10 mM) stages after exposure to a curve dose of adenosine (0-6 mg.Kg<sup>-1</sup>). A: Frequency of animals reaching Stage IV of seizure; B: Latency to reach stage IV of seizure (mean  $\pm$  SEM); C: Duration of stage IV of seizure (mean  $\pm$  SEM). Exposure to adenosine lasted 30 minutes. The latency to seizure was evaluated during 6 minutes of exposure. Outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Frequency was analyzed by Chi-square test. Mean latency data was analyzed by One-way ANOVA and duration data by Kruskal-Wallis test. At least 12 animals were used in each group.

At least 12 animals were used in each group.

CPA anticonvulsant properties were also tested in larvae and adult zebrafish using a concentration/dose with no effects on locomotor parameters, chosen from the data of this study (Figures 2 and 3). The frequency of larvae reaching stage II of seizure after exposure to 50 and 75  $\mu$ M CPA was not different from control (Figure 7A). However, at 75  $\mu$ M of adenosine, the latency to reach this strong stage of seizure increased and the duration of this stage decreased, both with statistical significance (p=0.03 and 0.02, respectively) (Figure 7B and C). The frequency of animals undergoing seizure stage IV after 10 mg.Kg<sup>-1</sup> CPA did not change (Figure 8A). However, the latency to reach stage IV was increased (p=0.04), while the seizure duration of this stage reported a non-statistically significant tendency to decrease (Figure 8BC). The increase in latency

and the decrease of duration under convulsive stages indicate anticonvulsant properties at these doses of CPA.

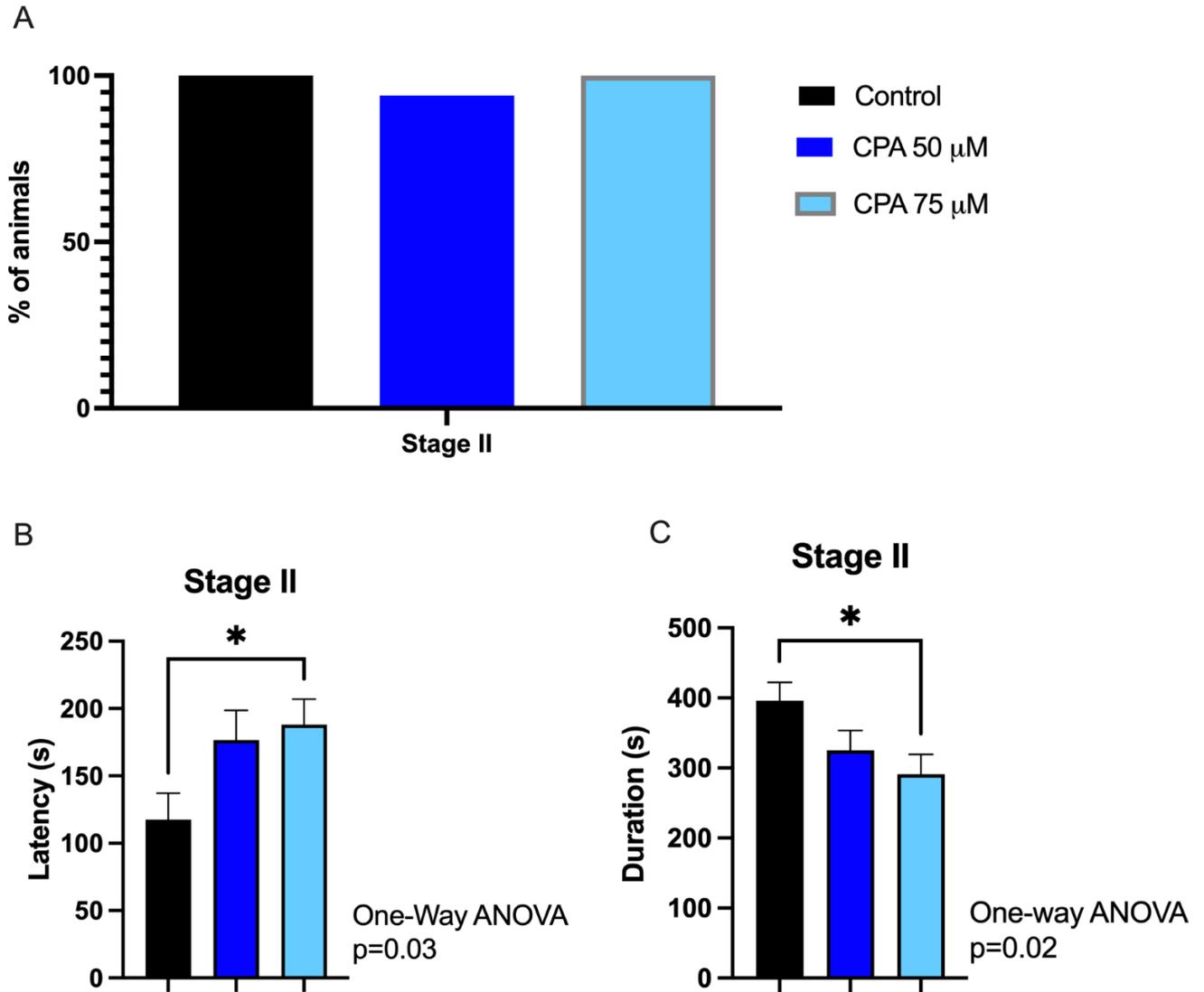


Figure 7: Zebrafish larvae (7-day old) undergoing PTZ-induced seizure (10 mM) after exposure to A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist CPA (N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine) at 50 and 75  $\mu$ M. A: Frequency of animals reaching Stage II of seizure; B: Latency to reach stage II of seizure (mean  $\pm$  SEM); C: Duration of stage II of seizure (mean  $\pm$  SEM). Exposure to adenosine lasted 30 minutes. The latency and duration were evaluated during 10 minutes of exposure. No outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Frequency was analyzed by Chi-square test, mean latency and duration data were analyzed by One-Way ANOVA test followed by Dunnett's post-hoc test. At least 12 animals were used in each group. \* represents  $p<0.05$ .

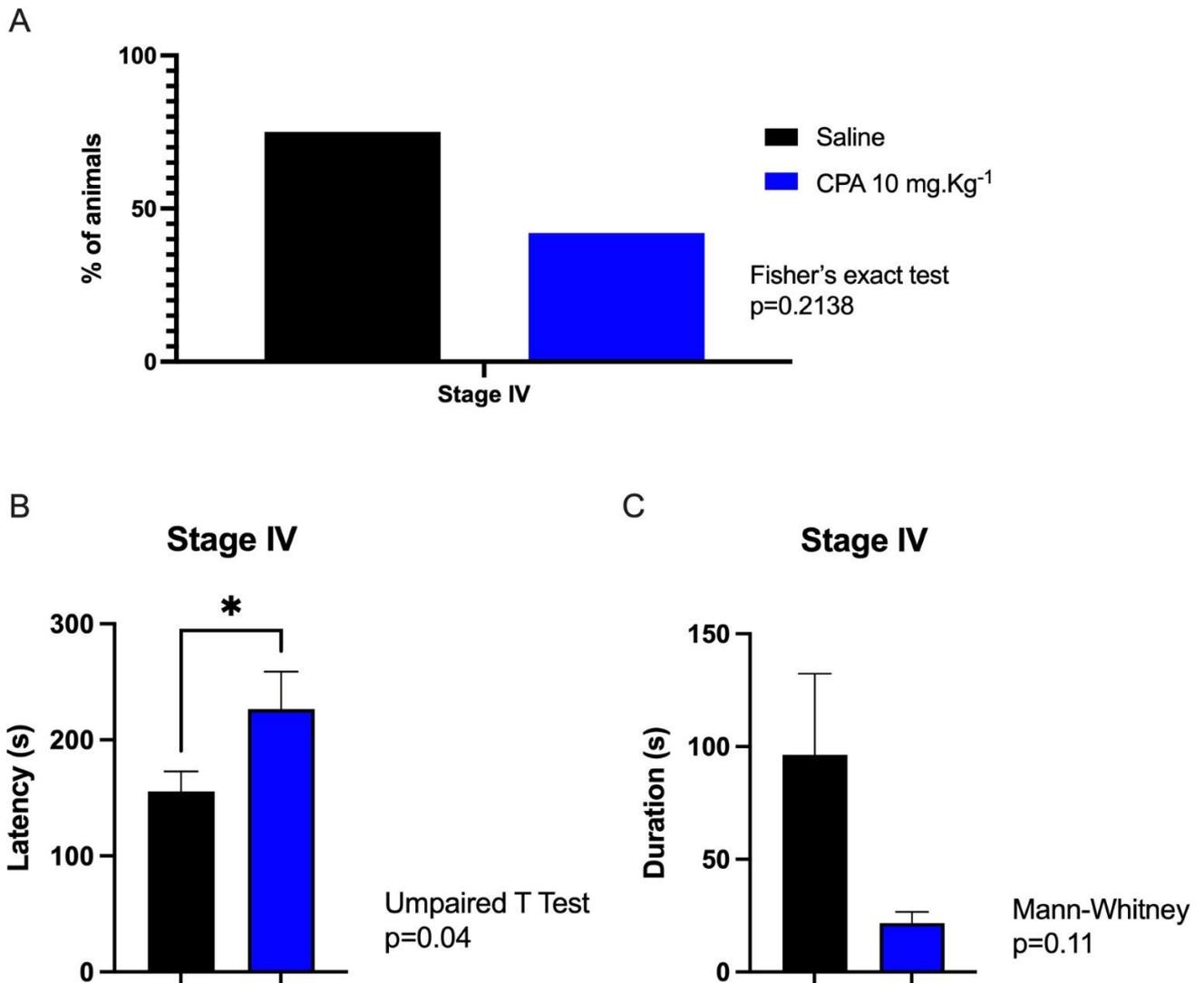


Figure 8: Zebrafish adult (3-month old) undergoing PTZ-induced seizure (10 mM) after exposure to A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist CPA (N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine) at 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. A: Frequency of animals reaching Stage II of seizure; B: Latency to reach stage II of seizure (mean ± SEM); C: Duration of stage II of seizure (mean ± SEM). Exposure to adenosine lasted 30 minutes. The latency to seizure was evaluated during 6 minutes of exposure. No outliers were identified by ROUT (Q=1%) analysis. Frequency was analyzed by Fisher exact test. Latency data was analyzed by Unpaired T test. Duration data was analyzed by Mann-Whitney. At least 12 animals were used in each group. \* represents p<0.05. At least 12 animals were used in each group.

#### 4. DISCUSSION

The main findings of this work can be summarized as (I) Zebrafish larvae and adults have predominant hipolocomotor effects after CPA exposure, such as mammals; (II) A<sub>1</sub> adenosine receptor relative gene expression increases throughout zebrafish development; and (III) adenosine per se has relative weak anticonvulsant effects in the concentrations/doses tested, while its rigid analogue, CPA, is able to decrease convulsive parameters in concentrations/doses free of locomotor effects.

The sedative effect of adenosine is attributed to A<sub>1</sub> adenosine receptor activation and its involvement is recognized in several mechanism of action of hypnotic drugs (22, 23). The decrease in total distance travelled and mean velocity by the CPA exposure occurred in adult animals but not in larvae, since for larvae at 500 μM CPA, the distance decreased significantly, while the mean velocity increased significantly. This could be a consequence of the specific type of larvae swimming characterized by more frequent and shorter episodes of locomotor activity, which can be kept even when the exploratory locomotion decrease (24, 25). The sedative effect of zebrafish can be assumed from 100 μM in transdermal exposure of larvae and 20 mg.Kg<sup>-1</sup> for adult animals. Considering these results, the use of zebrafish to study purinergic signaling in the context of behavior or other functions of nervous system externalized by the swimming of the fish should consider doses of CPA under 100 μM in transdermal exposure of larvae and under 20 mg.Kg<sup>-1</sup> for intraperitoneal exposure of adults. There is no specific study for zebrafish adenosine receptor binding to CPA, which increases the need for evidence about the physiological response to this rigid analogue (26).

The maturation of zebrafish is accompanied by changes in purinergic signaling. The presence of adenosine receptor was already described from the very beginning of zebrafish development (11, 12) presenting zebrafish embryos as an excellent proxy for purinergic signaling studies in early development. However, no study yet demonstrated the profile of developmental expression of A<sub>1</sub> adenosine receptor in zebrafish, despite the common use of this species in all life stages to study adenosine involvement in drug underlying mechanisms, diseases, and basic vertebrate physiology (27, 28, 29, 30). Here, we show that the A<sub>1</sub> adenosine receptor gene expression increases in adult life in comparison to larval stage. The ontogeny of A<sub>1</sub> adenosine receptor in rats shows heart as a main site of A<sub>1</sub> adenosine receptor expression during fetal development, while brain A<sub>1</sub> adenosine receptor expression increases greatly with maturation from fetal to early postnatal life (31). Studies using rats during postnatal period demonstrated the number of A<sub>1</sub> adenosine receptor to be almost 10 times lower at birth than in the mature animal (31). In the other hand, the ageing in mammals is associated to a decrease in A<sub>1</sub> adenosine receptor expression, which affect the balance of adenosine signaling between P<sub>1</sub> receptors (32). Here,

technical difficulties to separate brain structures throughout the study during larval stage and consequent scarcity of material, prevented the ideal comparison brain-to-brain between zebrafish developmental stages, which could contribute further to the differences of A<sub>1</sub> adenosine receptor expression larvae and adults. However, the binding, coupling, and trafficking properties of this receptor remain uncharacterized and possibly contribute to this panorama and mostly to the functional consequences of A<sub>1</sub> adenosine receptor maturation (33). Adenosine is the endogenous agonist of A<sub>1</sub> adenosine receptor, but as expected, its use in in vivo studies is limited because nucleoside degrading enzymes are present in abundance in all living tissues. Here, we tried to reach a classical anticonvulsant effect of adenosine in a pentylenetetrazol-induced seizure model, but even using a large concentration range (0.5-500 μM) of adenosine, no robust effect was observed. Zebrafish has been used as one of the most important animal models for the screening of anticonvulsant drugs (20, 34), and the rigid analogue CPA presented an anticonvulsant effect in the highest doses tested out of the range that interferes in the basal locomotion.

A proper animal model must offer face, predictivity and construct validities, although it is difficult to have a model perfectly adequate in these three domains (35). To achieve these goals, it is mandatory to further expand our in-depth understanding about the animal model in consideration, such as its metabolism and physiological responses to specific drugs or environmental changes, as well as the natural characteristics of its native environment. Thus, in conclusion, this work contributes to understand the ontogeny of A<sub>1</sub> adenosine receptor in zebrafish, helping in the planning of studies using this animal model and to know the physiological response of zebrafish based in adenosine functioning.

**Acknowledgments:** We are thankful to Professor Fernanda Morrone for technical support in molecular biology assays.

**Authors Contribution Statement** GCT: conceptualization (supporting), investigation (lead), formal analysis (supporting); GPS: investigation (equal), JSS: investigation (equal); LR: investigation (equal); HAC: investigation (equal); MV: resources (equal), writing – review and editing (equal); RSS: conceptualization (lead), resources (lead), data curation (lead), formal analysis (lead), writing - original draft (lead), writing – review and editing (equal).

**Authors Disclosure Statement:** None.

Funding Statement : This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001. GTC is recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/PROEX fellowship. GPS is the recipient of a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) fellowship. RSS and MV are Research Career Awardees of the CNPq/Brazil (Proc: CNPq/Brazil - 303971/2019-3 and 312599/2020-0, respectively).

## REFERENCES

1. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 2001;38(2):107-25.
2. Liu YJ, Chen J, Li X, Zhou X, Hu YM, Chu SF, et al. Research progress on adenosine in 42 central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(9):899-910.
3. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1315-23.
4. Stone TW. Adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Neurol Res.* 2005;27(2):161- 8.
5. Wardas J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol.* 2002;54(4):313-26.
6. Lauro C, Cipriani R, Catalano M, Trettel F, Chece G, Brusadin V, et al. Adenosine A1 receptors and microglial cells mediate CX3CL1-induced protection of hippocampal neurons against Glu-induced death. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(7):1550- 9.
7. 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.
8. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496(7446):498-503.
9. Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003;33(5):461- 8.
10. Mathur P, Guo S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):66-72.
11. Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, et al. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 2009;9(3):144-51.

12. Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GMT, Fazenda L, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*. 2011;33(6):680-5.
13. Nathan JR, Lakshmanan G, Michael FM, Seppan P, Rangunathan M. Expression of adenosine receptors and vegf during angiogenesis and its inhibition by pentoxifylline-A study using zebrafish model. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1406-18.
14. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J*. 2012;53(2):192-204.
15. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(6):785-9.
16. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4 th ed: University of Oregon Press; 2000.
17. CONCEA CNdCdEA. Normativas Do Concea Para Produção, Manutenção Ou Utilização de Animais Em Atividades de Ensino Ou Pesquisa Científica. 3 edition ed2016.
18. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim*. 2001;35(1):1-41.
19. Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Evaluation of Age-Dependent Response to NMDA Receptor Antagonism in Zebrafish. *Zebrafish*. 2015;12(2):137-43.
20. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*. 2005;131(3):759- 68.
21. 43 Mussulini BH, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, et al. Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One*. 2013;8(1):e54515.
22. Kim TH, Bormate KJ, Custodio RJP, Cheong JH, Lee BK, Kim HJ, et al. Involvement of the adenosine A 1 receptor in the hypnotic effect of rosmarinic acid. *Biomed Pharmacother*. 2022;146:112483.
23. Bruns RF, Katims JJ, Annau Z, Snyder SH, Daly JW. Adenosine receptor interactions and anxiolytics. *Neuropharmacology*. 1983;22(12B):1523-9.

24. Buss RR, Drapeau P. Synaptic drive to motoneurons during fictive swimming in the developing zebrafish. *J Neurophysiol.* 2001;86(1):197-210.
25. Li F, Lin J, Liu X, Li W, Ding Y, Zhang Y, et al. Characterization of the locomotor activities of zebrafish larvae under the influence of various neuroactive drugs. *Ann Transl Med.* 2018;6(10):173.
26. Martinez CS, Feas DA, Siri M, Igartúa DE, Chiaramoni NS, Del V Alonso S, et al. In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. *Neurotoxicol Teratol.* 2018;66:17-24.
27. Lutte AH, Nazario LR, Majolo JH, Pereira TCB, Altenhofen S, Dadda ADS, et al. Persistent increase in ecto-5'-nucleotidase activity from encephala of adult zebrafish exposed to ethanol during early development. *Neurotoxicol Teratol.* 2018;70:60-6.
28. Ventura ALM, Dos Santos-Rodrigues A, Mitchell CH, Faillace MP. Purinergic signaling in the retina: From development to disease. *Brain Res Bull.* 2019;151:92-108.
29. Menezes FP, Torresini FM, Nery LR, da Silva RS. Transient Disruption of Adenosine Signaling During Embryogenesis Triggers a Pro-epileptic Phenotype in Adult Zebrafish. *Molecular Neurobiology.* 2018;55(8):6547-57.
30. Nabinger DD, Altenhofen S, Bonan CD. Zebrafish models: Gaining insight into purinergic signaling and neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020;98:109770.
31. Rivkees SA. The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995;89(2):202-13.
32. Rodrigues R, Marques J, Cunha R. Purinergic signalling and brain development. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;95:34-41.
33. Daval JL, Werck MC, Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of adenosine A1 receptors and their coupling to G proteins in the rat brain. *Neuroscience.* 1991;40(3):841-51.
34. Bertencello KT, Bonan CD. Zebrafish as a tool for the discovery of anticonvulsant compounds from botanical constituents. *Eur J Pharmacol.* 2021;908:174342.
35. Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011;1(1):9.

# Capítulo 3

Manuscrito **Anticonvulsant role of adenosine is blunted during alcohol withdrawal syndrome in an adult zebrafish model**

(ID 41e6a0aa-0167-4701-a961-93b6948f8ca6)

Submetido ao periódico **Neurochemical Research** (ISSN: 0364-3190 | Online ISSN: 1573-6903)

Qualis CB1: A3

Status: publicado em 31/05/2023



## Anticonvulsant Role of Adenosine is Blunted During Alcohol Withdrawal Syndrome in an Adult Zebrafish Model

Giovanna Trevisan Couto<sup>1</sup> · Guilherme Pietro da Silva<sup>1</sup> · Liliana Rockenbach<sup>2,5</sup> · Jéssica Scheid da Silva<sup>1</sup> · Monica Ryff Moreira Roca Vianna<sup>3</sup> · Rosane Souza Da Silva<sup>1,4</sup>

Received: 6 October 2022 / Revised: 20 March 2023 / Accepted: 21 May 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

### Abstract

Alcohol (ethanol) dependence and related disorders are life-threatening conditions and source of suffering for the user, family members and society. Alcohol withdrawal syndrome (AWS) is a little-known dynamic process associated with a high frequency of relapses. A state of hyperglutamatergic neurotransmission and imbalanced GABAergic function is related to an increased susceptibility to seizures during alcohol withdrawal. Adenosine signaling display an important role in endogenous response to decrease seizure and related damages. Here, an intermittent alcohol exposure regimen (1 h daily of 0.5% ethanol solution) for 16 days or 8 days of the same ethanol exposure regimen followed by 1 or 8 days of ethanol withdrawal was used to assess adenosine signaling in the context of seizure susceptibility using adult zebrafish. In both abstainer groups, a sub-convulsant dose of pentylentetrazol (2.5 mM) was able to increase the frequency of animals reaching a clonic seizure-like state, while continuous-treated animals had no seizure, as did control animals. The total brain mRNA expression of A<sub>1</sub> adenosine receptor was decreased in animals with 1 day of ethanol withdrawal. The agonism of A<sub>1</sub> adenosine receptor induced an anticonvulsant effect in animals with 1 day of ethanol withdrawal after the injection of the specific agonist (N<sub>6</sub>-cyclopentyladenosine, 10 mg.Kg<sup>-1</sup>; i.p.). These findings reinforce A<sub>1</sub> adenosine receptor as a key target in acute alcohol withdrawal syndrome and zebrafish as an excellent platform to study biological mechanism of AWS.

**Keywords** Ethanol · Alcohol abstinence · Purinergic system · Adenosine receptors · Convulsion

### Introduction

Alcohol consumption is related to 5.3% of all global deaths and contributes to more than 200 diseases [1]. Alcohol use disorders (AUD) are attributable to 8.1% of adults aged 18 to 22, according to the 2019 National Survey in Drug Use and Health of USA [2]. Data from Europe indicates that injuries and AUD made up 93% of all alcohol-attributable years lived with disabilities, in 2016 [1]. The withdrawal syndrome (AWS) is a painful and challenging period for those heavy alcohol consumers suffering from AUD. The AWS is characterized by adaptative changes in major excitatory and inhibitory neurotransmitter systems after discontinuation or reduction of alcohol consumption [3]. Some of the main severe outcomes of AWS are the recurrent seizures and delirium, which account for around 20% of people suffering from AUD [4–6].

Direct and indirect targets of alcohol have been implicated in the adaptative changes during AWS. The GABA

✉ Rosane Souza Da Silva  
rosanesouzadasilva@gmail.com

<sup>1</sup> Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
<sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
<sup>3</sup> Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal Fluminense R. Prof. Marcos Waldemar de Freitas Reis, São Domingos, Niterói, RJ 24210-201, Brazil  
<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

system have long been linked to mediation of AWS and seizure induction, because GABA itself or its analogues produce withdrawal symptoms when discontinued [3]. Alcohol exposure is correlated to internalization, changes in expression and alteration in protein levels, trafficking, and subcellular localization of GABA<sub>A</sub> receptors [7, 8]. Chronic exposure to alcohol also increases NMDA receptor expression leading to an hyperexcitable state prone to develop seizure during acute alcohol withdrawal [9].

The neuromodulator adenosine is a purine nucleoside widely found in the central nervous system [10]. Adenosine levels at extracellular medium are tightly controlled by adenosine-producing enzymes, such as ecto-5'-nucleotidase, adenosine-degrading enzymes, such as adenosine deaminase, and equilibrative and concentrative nucleoside transporters [11, 12]. At normal physiological states, adenosine levels reach the high affinity P1 receptors, A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub>, promoting neuromodulation of all major neurotransmitter systems [13, 14]. Conversely, during pathological situations, increasing levels of adenosine act as a retaliatory molecule promoting tissue protection, mainly through inhibitory action of A<sub>1</sub> adenosine receptor activation [15].

Animal models of acute, subchronic and chronic exposure to alcohol demonstrated increase in extracellular adenosine levels, as a response to the inhibition of adenosine re-uptake through blockage of equilibrative nucleoside transporters and increase in ecto-5'-nucleotidase activity [16–19]. Furthermore, adenosine receptor functioning is affected by alcohol exposure [20, 21]. During AWS, adenosine neuromodulation displays adaptations to counteract the hyperglutamatergic scenario. So far, increased adenosine receptors expression have been demonstrated in rodents subjected to a model of alcohol disorder [22]. A proper response to hyperexcitability is dependent of a proper adenosine signaling, considering that adenosine is a major endogenous anticonvulsant [23]. However, the understanding about adenosine participation in the remaining aspects of AWS over brain activity is lacking.

Animal models have been crucial for AWS underlying mechanisms elucidation, especially the chronic intermittent ethanol rodent model of alcohol dependence, which indeed develops a kindling model of seizure [3]. In this model, the withdrawal which the animal experience can promote a persistent state of AWS with increased susceptibility of chemical-induced seizures [3]. Zebrafish is very suitable for use in AUD, as it has a highly conserved brain physiology compared to humans, and exposure to alcohol is easily done by dilution on water of fish aquarium. Zebrafish submitted to alcohol withdrawal exhibits anxiety behavior and increased susceptibility to chemical induced seizure [24].

Here we applied continuous and intermittent alcohol exposure regimens followed by withdrawal periods to

compare susceptibility to chemical-induced seizure in adult zebrafish. This approach was applied to evaluate brain adenosine receptor functionality and the expression of ecto-5'-nucleotidase and adenosine receptors in the context of AWS.

## Methods

### Chemicals

Ethanol (95%) was purchased from Neon (São Paulo, Brazil). Instant Ocean (marine salt) was purchased from Marine Enterprises International (Maryland, USA). CPA (N<sub>6</sub>-Cyclopentyladenosine), Pentyletetrazol and Tricaine (MSS-222) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were of analytical grade.

### Animals

The adult (12-month-old) wild-type AB zebrafish (*Danio rerio*) used in the experiments were produced and kept at the Center for Biological and Experimental Models (CEMBE) at Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) in an automatized aquarium system from Tecniplast (Buguggiate, VA, Italy). A probe of the Tecniplast system continuously check the pH and conductivity of water. A dispenser uses a marine salt solution (20 g.L<sup>-1</sup>) (Instant Ocean, USA) to keep the conductivity at 300–600 μS and a sodium bicarbonate solution (20 g.L<sup>-1</sup>) to keep pH 7. The temperature was kept at 26.5 ± 1.5 °C and the light/dark cycle was 14 h/10 h. At the end of experiments, the animals were euthanized by anesthetic overdose (buffered tricaine solution, 0.5 g.L<sup>-1</sup>), except for those that underwent tissue extraction for gene expression analysis, who were euthanized by hypothermal shock after being submerged inside a beaker in water with flocked ice [25, 26]. Sample sizes were based on literature references, otherwise calculated with expected data from pilot studies and considering an 80% power effect. A total of 140 adult animals were used to perform all the experiments.

All manipulations of the animals were in accordance with the procedures described by Westerfield [27] and followed the guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation for Use of Fish in Research [28]. All protocols performed in the experiments were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA-PUCRS) under registration number 9570.

### Ethanol Treatment and Withdrawal Regimen

Adult zebrafish (12-month-old) were assigned to 4 groups according to their treatment regimen: continuous ethanol, ethanol withdrawal 8 days, ethanol withdrawal 1 day and control (water free of ethanol). The exposure regimen is depicted in the Fig. 1. Animals were submerged individually in a glass Beaker cup (600 mL volume; 8 cm diameter) filled with 500 mL of 0.5% hydroalcoholic solution or water free of alcohol for 1 h every day around 8:30 AM. The continuous ethanol group received the drug for 16 days, both withdrawal groups received ethanol treatment for 8 days followed by 8 days or 1 day of withdrawal before experiments. Control underwent all manipulations only with water free of ethanol. At the end of 9 (Withdrawal 1 day group) or 16 days (control, continuous and withdrawal 8 days groups), the animals were exposed to Pentylentetrazol (PTZ) (Fig. 1). Each group was composed by 12 animals [24].

### Pentylentetrazol Exposure and Seizure Assessment

Animals were individually exposed to 500 mL of PTZ (2.5 or 5 mM, pH 7–8) solution reaching a 5.5 cm high column in an aquarium sized 13 cm x 11.5 cm x 8 cm (length X height

X width). Analyses occurred in two separated sets of experiments performed between 10:00AM-5:00PM. During PTZ exposure, four animals were filmed simultaneously by 6 min in an apparatus with a lateral camera (Logitech c920 HD Pro Webcam) distant by 65 cm. The walls of apparatus prevented animals to see each other during PTZ exposure. The placement of animals from each experimental group into the apparatus of seizure analysis alternated between the 4 available position to minimize unforeseen sources of interference. The sequence of animal exposure to PTZ was randomized and blinded to the experimenter.

PTZ main mechanism of action is a competitive antagonism of the GABA receptors, thus, exposure to PTZ induces to seizures. Zebrafish had its convulsive response to PTZ staged in increased swimming speed (Stage I), burst swimming with erratic movements (Stage II), circular movements (Stage III), clonic seizure-like movements (Stage IV) and fall to the bottom of the aquarium (Stage V) [29]. Here, we registered the number of animals reaching the most characteristic stage, the clonic seizure-like Stage IV, the latency (seconds) to reach this stage and the total duration of seizure (seconds). The analysis of video was performed by blinded independent evaluators.

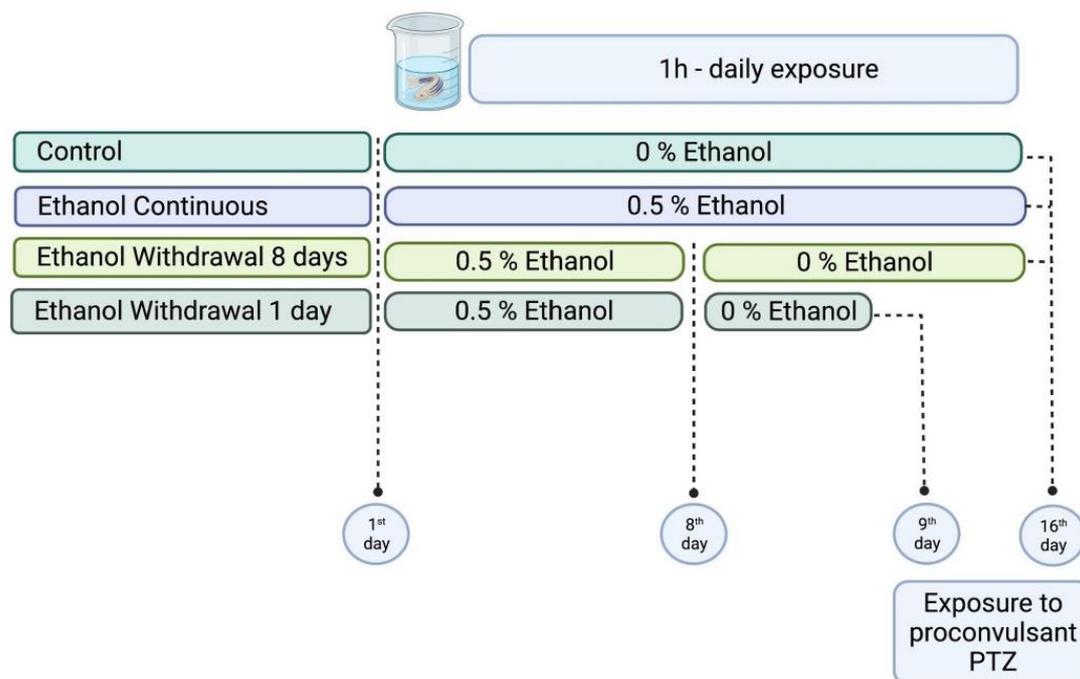


Fig. 1 Experimental design for ethanol and PTZ exposure

## Agonism of Adenosine Receptor and Seizure Response

To check the functionality of adenosine  $A_1$  receptors in the ethanol withdrawal context, animals daily exposed to 0.5% ethanol by 8 days followed by 1 day of withdrawal, as depicted in Fig. 2, received an intraperitoneal (i.p.) injection of  $N_6$ -cyclopentyladenosine (CPA 10 mg.Kg<sup>-1</sup>). The CPA solution was delivered using a microsyringe (Nano-Fil – World Precision) in a volume of 5  $\mu$ L (10 mL.Kg<sup>-1</sup>) [30] after anesthesia by immersion in a tricaine solution (0.1 g.L<sup>-1</sup>). Briefly, animals were acclimated in the experimentation room for 24 h before experiment. Anesthetized animals received an CPA or saline injection 30 min before PTZ exposure and were videorecorded, as described above. Each experimental group was composed by 16 animals (sample size calculated considering a power effect of 80%).

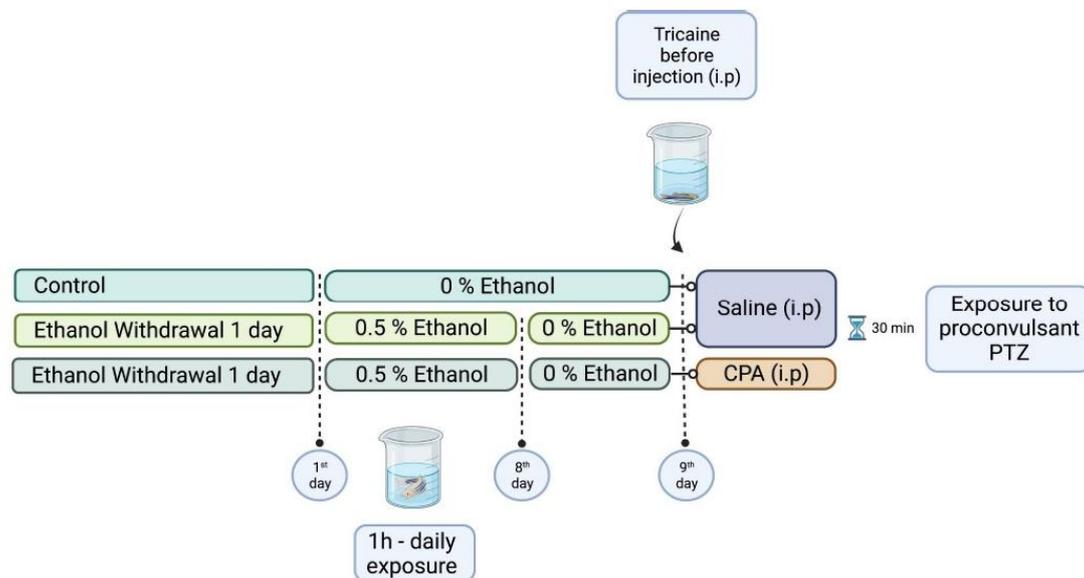
### Gene expression – Quantitative Realtime PCR

For evaluating gene expression of adenosine receptors and ecto-5'-nucleotidase, 4 samples composed by a pool of 3 encephala each of adult zebrafish from the experimental groups control, continuous ethanol, and 1 day ethanol withdrawal were used. No exposure to PTZ or any other intervention was done to these animals after ethanol regimen exposure. Immediately, the brain samples were kept

in microtubes containing 300  $\mu$ L of TRIzol reagent (Invitrogen) under  $-80$  °C, before total RNA extraction. The quantification of total RNA was measured using NanoDrop Lite Printer (Thermo Scientific) microvolume spectrophotometer. The cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA following the instruction of manufacturer (High capacity cDNA reverse transcription Kit - Thermo Fisher) in a final volume of 20  $\mu$ L. The expression of genes listed in Table 1 was determined by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), utilizing PowerUp SYBR® Green (Invitrogen). The reference gene beta-actin was used for normalization and relative mRNA expression levels were calculated using the  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  method.

### Statistical Analysis

Data analyses were performed using GraphPad Prism software version 9.4.1 (GraphPad Software, Inc.). The data were checked for normality prior to further analysis by the Shapiro–Wilk normality test. Frequency of animals reaching seizure stage IV from ethanol groups and their respective controls were compared by Chi-Square Test. Mann-Whitney test was used to compare latency to seizure stage and duration of seizure. One way ANOVA followed by the Tukey's *post-hoc* test was used for gene expression analyses. The data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M), except for frequency of animal



**Fig. 2** Experimental design to the exposure to  $A_1$  adenosine receptor agonist in adult zebrafish exposed 1 h daily during 8 days to ethanol (0.5%) followed by 1 day of ethanol withdrawal. CPA (10 mg.Kg<sup>-1</sup>)

was given intraperitoneally 30 min before PTZ exposure. Negative (Control – 0% ethanol) and Positive (0.5% ethanol) controls received intraperitoneal saline injection

**Table 1** Primer sequence of gene targets for quantitative real-time PCR

Target	Primer sequence	T °C	Accession number
<i>b-actin</i>	F = CGAGCAGGAGA-TGGGAACC R = CAACGGAAACGCT-CATTGC	51	AF057040
<i>adora1</i>	F = ACTAAAGCTGGC-CAAGTCCC R = AGGAACATTGGCTTCTC-GCA	60	NM001128584.1
<i>adora2a</i>	F = GCGAACTGTACGCCGAG-CAGAG R = TTATTCCAGTGAGCG-GCGACTC	60	NM001039815.1
<i>adora2b</i>	F = GGATTGGGTCATG-TACCTGGCCATC R = GCTGTTTCCAATGGC-CAGCCTG	60	NM001040036
<i>mt5e</i>	F = TGGACGGAGGAGACG-GATTCAAC R = GGAGCTGCTGAACTG-GAAGCGTC	60	NM200932.1

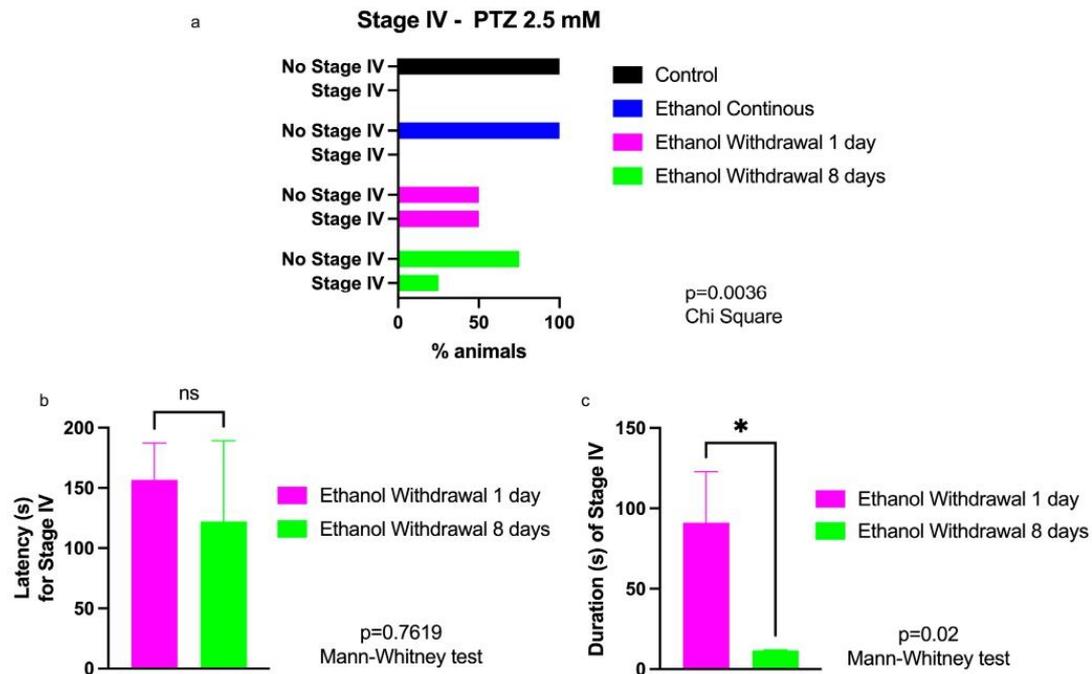
T °C: annealing temperature in °C

that is presented as percentage. For all comparisons, the significance level was set at  $p < 0.05$ . Statistical differences are graphically indicated as follows: \* represents significant differences at  $p < 0.05$ , \*\* at  $p < 0.01$ , in relation to the corresponding control group.

## Results

### PTZ Sub-convulsant Dose Selection and Seizure Susceptibility During Ethanol Withdrawal

After zebrafish has been exposed to PTZ at 5 mM, the number of animals reaching the most characteristic stage of seizure, the stage IV, was greater than animals exposed to 2.5 mM, presenting the low concentration of PTZ as a sub-convulsant dose for control animals (Supplementary material-Table 1). The frequency of animals reaching the stage IV under the sub-convulsant concentration of PTZ (2.5 mM) was statistically different (Fig. 3a;  $p = 0.0036$  – Chi-Square



**Fig. 3** Sensitivity of adult zebrafish to seizure induced by PTZ in different regimens of ethanol exposure and withdrawal. (A) Frequency of animals reaching Stage IV of seizure scale during 6 min of 2.5 mM PTZ exposure; (B) Latency in seconds to reach the stage IV during 6 min of 2.5 mM PTZ exposure; (C) Duration in seconds of the stage IV during 6 min of 2.5 mM PTZ exposure. Control animals were kept in standard fish maintenance throughout the experiment (16 days).

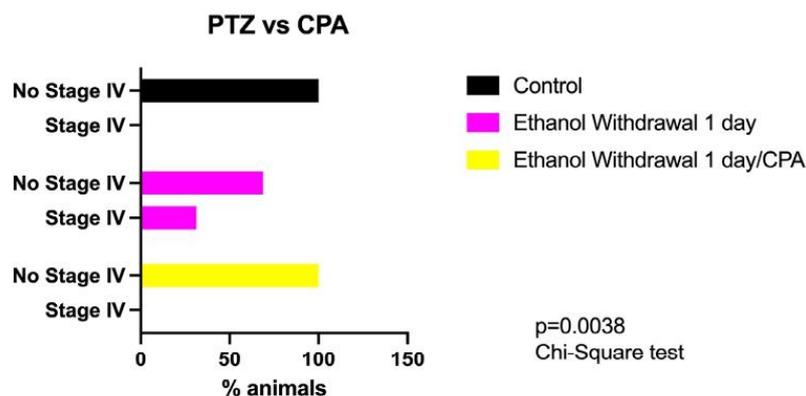
Continuous exposure to 0.5% ethanol was kept for 16 days. The 1 or 8 days of ethanol withdrawal was performed after 8 days of 0.5% ethanol exposure. Frequency data was expressed as percentage of animals by group and analyzed by Chi-Square test. Latency and duration data were expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed by Mann-Whitney test.  $n = 12$

test) between control group, continuous exposure to ethanol and withdrawal of ethanol by 1 or 8 days. Like control group, the group under continuous exposure to ethanol did not reach stage IV after the 2.5 mM PTZ (Fig. 3a). In the other hand, exposure to ethanol by 8 days followed by 1- or 8 days of ethanol withdrawal sensitized animals to the sub-convulsant PTZ concentration, presenting 50% and 25% of animals reaching the stage IV, respectively (Fig. 3a). The latency to reach stage IV did not differ between the two ethanol withdrawal regimen groups (Fig. 3b,  $p=0.7619$  - Mann-Whitney test), while the duration of the convulsive stage IV was significantly increased at 1-day of ethanol withdrawal when compared to 8 days of ethanol withdrawal (Fig. 3c,  $p=0.02$  - Mann-Whitney test).

#### Anticonvulsant Effect of A<sub>1</sub> Adenosine Receptor Agonist During Ethanol Withdrawal

Considering that 1 day of ethanol withdrawal was able to sensitize to seizure in a sub-convulsant concentration of PTZ, showing a high frequency of animals with seizure and longer duration of stage IV, we decided to check if adenosine anticonvulsant properties could interfere in this scenario. The activation of A<sub>1</sub> receptor by the rigid adenosine analogue, CPA, in the dose of 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, was able to blunt the increased sensitization to seizure of animals under the 1 day of ethanol withdrawal regimen (Fig. 4). The frequency of animals reaching the seizure score IV was null in the group of animals with 1 day of ethanol withdrawal pre-treated with CPA, while 31.2% of 1 day of ethanol withdrawal animals receiving saline reached seizure score IV (Fig. 4,  $p=0.0016$  - Chi Square test).

**Fig. 4** Anticonvulsant effect of A<sub>1</sub> receptor agonist. Number of animals reaching Stage IV of seizure scale after exposure to ethanol by 8 days followed by 1 day of ethanol withdrawal, and control (no ethanol exposure). Animals with ethanol withdrawal regimen received an acute dose of CPA (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) 30 min before the exposure to a sub-convulsant dose of PTZ (2.5 mM). Frequency data were expressed as percentage of animal by group and analyzed by Chi-Square test.  $n=16$  animal per group



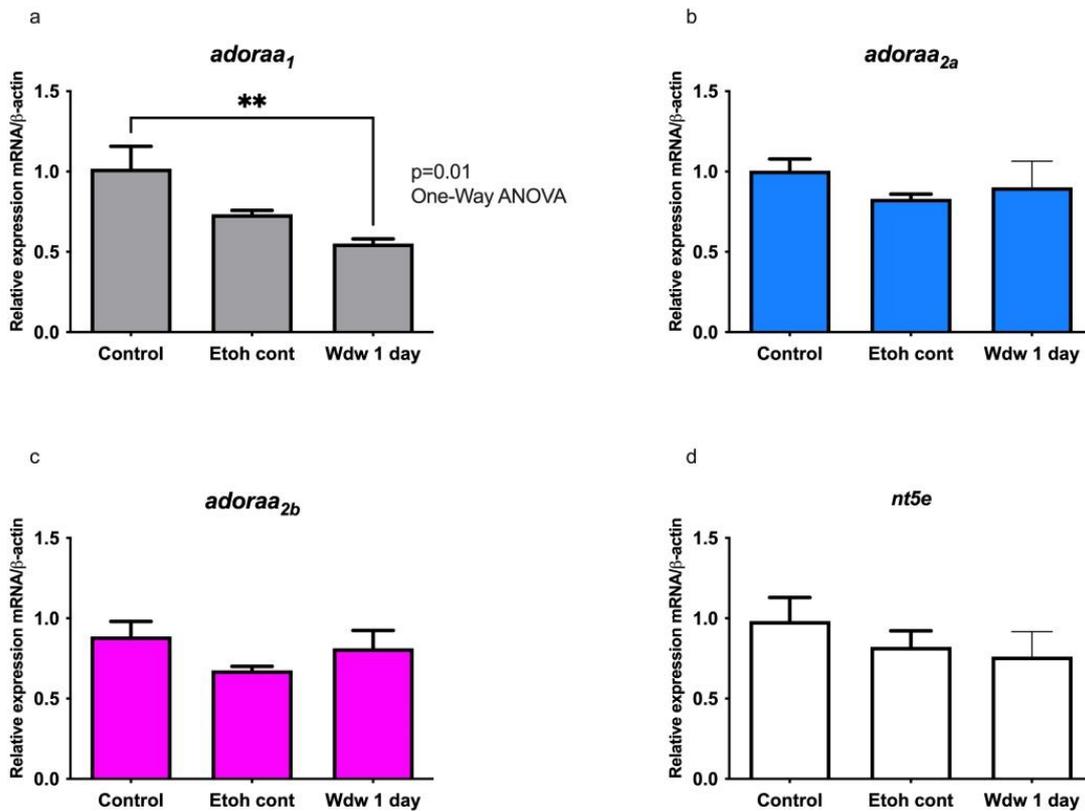
#### Adenosine Receptors and Ecto-5'-nucleotidase Brain Expression During Ethanol Withdrawal

Next, we checked the expression of components of adenosinergic system, the adenosine receptor genes *adorea1*, *adorea2a1* and *adorea2a2*, and the gene of the main enzyme responsible for adenosine production at the extracellular medium, the *nt5e* (ecto-5'-nucleotidase) in the continuous ethanol exposed and 1 day of ethanol withdrawal groups. The relative gene expression of *adorea1* was significantly decreased in the 1 day of ethanol withdrawal group when compared to control group (Fig. 5a -  $p=0.01$  - ANOVA - Tukey Post-hoc). The gene expression of *adorea2a1*, *adorea2a2*, and *nt5e* was not affected by ethanol exposure regimen (Fig. 5bcd).

#### Discussion

The proper maintenance of excitatory and inhibitory neurotransmission is lacking during seizure events. The abstinence of ethanol can induce seizure in heavy users, contributing to frequent failure in the therapy of ethanol dependence [31]. Here, we showed that the neurotransmission modulation exerted by adenosine is under distress in the context of ethanol withdrawal and adenosine A<sub>1</sub> receptor seems to be a key factor to understand purinergic signaling implication in AWS.

Zebrafish continuously exposed to ethanol solution 1 h a day did not have seizures when submitted to sub-convulsant doses of PTZ. This result is expected in the presence of ethanol, because a mimetic GABAergic effect is displayed by ethanol [3]. Additionally, is also possible to consider that adenosine anticonvulsant effect is triggered in this context mainly through blockage of equilibrative nucleoside transporter type 1 and consequent increase in adenosine concentration at the extracellular space [18, 19]. Our results



**Fig. 5** Gene expression of adenosine receptors and ecto-5'-nucleotidase after continuous ethanol exposure (Etoh cont.: 1 h daily exposure by 16 days), withdrawal regimen (Wdw 1 day: 8 days of 1 h daily ethanol exposure followed by 1 day of abstinence), and control (no

exposure to ethanol). A: Adora1 receptor; B: Adora2a receptor; C: Adora2b receptor; D: Ecto-5'-nucleotidase.  $n=3-4$  pools of 4 animals each. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc. \*\* represents  $p < 0.01$

showed preserved brain adenosine receptors and ecto-5'-nucleotidase mRNA expression in adult zebrafish submitted to continuous daily ethanol exposure, which could contribute to the maintenance of proper neurotransmission balance and absence of seizure.

The withdrawal of ethanol by 1 or 8 days increased the frequency of animals reaching the most characteristic stage of seizure in adult zebrafish, the clonic-seizure stage, when the animal has abnormal muscle contractions, jumping and shaking frantically [29]. This stage was reached in a sub-convulsant dose of PTZ, confirming the increase of sensitivity to convulsion in ethanol abstainer animals. Our results and others from literature support zebrafish as an excellent platform to study the biological mechanism underlying

AWS and the development of targets to improving its treatment and management [24, 32].

Although both withdrawal regimens applied during this study were able to increase frequency of animals reaching the clonic seizure-like stage, the animals under 1 day of ethanol abstinence displayed longer periods under this convulsive stage, being the regimen of choice to further experiments. Working with the hypothesis that adenosine function could be affected and being an important contributor of seizure susceptibility during ethanol withdrawal, the assessment of gene expression from components of adenosine function machinery showed a significant decrease in the expression of A<sub>1</sub> adenosine receptor. This result is in accordance with the contemporary work with rodents done by Bolewska and colleagues and bring light to the delaying or

failure of physiologic adjustment during acute ethanol withdrawal [22]. The orthologue two copies of  $A_{2a}$  receptors and the only copy of ecto-5'-nucleotidase genes were unaffected by ethanol withdrawal.

While gene expression gives us a hint about cellular adjustment in short and long-term, the specific possible impairment of adenosine action could be quite visible through the pharmacological activation using a rigid analogue of adenosine. This simple strategy can show adenosine receptor functionality. In fact, the use of the specific agonist of  $A_1$  adenosine receptor,  $N_6$ -cyclopentyladenosine, blunted seizure incidence in the animals submitted to ethanol withdrawal by 1 day, indicating that increasing adenosine function is enough to counteract the seizure development. Also, if the availability of  $A_1$  adenosine receptors is already affected, the functionality of inhibitory adenosine receptors remaining is preserved.

Besides the hyperglutamatergic state during early stages of ethanol abstinence [3, 22], the mismatched adenosine signaling probably work together with the puzzled adjustments in signaling networks involving corticotrophin release factor [33], dopamine signaling [34], and few other known molecules linked to crucial adjustments of early acute phase of AWS. Adenosine signaling is important for dopamine receptors functioning and dopamine synaptic release [35]. Several evidence demonstrated the affected dopamine signaling in AUD, briefly, acute ethanol withdrawal seems to induce decreased dopamine release and dopamine receptor expression [36], with is related to the increased level of anxiety experienced by ethanol abstainers. The cellular orchestration underlying seizure susceptibility in the context of AWS is under continuous investigation. Recently, the activation of mTOR signaling was suggested to contribute to the increased susceptibility to seizure after long-term alcohol exposure [37]. Additionally, adenosine can suppress the mTOR pathway [38], which draws attention to the fact that adenosine's involvement in increased susceptibility to seizures under AWS could involve mTOR and its targets, opening new perspectives to further investigation.

Summarizing, adenosine is a critical piece of nervous system functioning during the crucial period of acute ethanol withdrawal. AWS is a little-known dynamic sequence of events with an infinity of components acting in a specific functional and temporal way. Considering the beginning of AWS as a crucial period for the successful resolution of ethanol addiction, the contribution of a reliable scenario is important to choose targets for potential treatments and/or management. The  $A_1$  adenosine receptor has been presented as a prominent target of the purinergic system in the AWS context.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at [https://doi.org/10.1007/s11064-](https://doi.org/10.1007/s11064-023-03958-0)

023-03958-0.

**Acknowledgements** We are thankful to Professor Fernanda Morrone to technical support to molecular biology assays.

**Author Contributions** GTC and RSS designed the hypothesis and the experimental approach, analyzed the data, and wrote the manuscript. GTC, GPS, JSS and LR performed the experimental work. MRMRV participated in the writing and revision of the final work. All authors reviewed the manuscript.

**Funding Statement** This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001. GTC is recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/PROEX fellowship. GPS received a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) fellowship. RSS and MV are Research Career Awardees of the CNPq/Brazil (Proc: CNPq/Brazil – 303971/2019-3 and 312599/2020-0, respectively).

**Data availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

## References

1. Organization W-WH (2018) Global status report on alcohol and health 2018. WHO Press, Geneva, Switzerland
2. Substance Abuse and Mental Health Service Administration (2019) National survey on drug use and health, C.f.B.H.S.a. Quality. <https://www.samhsa.gov/data/release/2019-national-survey-drug-use-and-health-nsduh-releases>
3. Olsen RW, Liang J (2017) Role of GABA. *Mol Brain* 10(1):45
4. Basu S, Suh H (2020) Role of hippocampal neurogenesis in Alcohol withdrawal seizures. *Brain Plast* 6(1):27–39
5. Smalley CM et al (2021) The impact of COVID-19 on suicidal ideation and alcohol presentations to emergency departments in a large healthcare system. *Am J Emerg Med* 41:237–238
6. Berggren U et al (2009) Thrombocytopenia in early alcohol withdrawal is associated with development of delirium tremens or seizures. *Alcohol Alcohol* 44(4):382–386
7. Noebels JL et al (2012) Jasper's basic mechanisms of the epilepsies.
8. Sheela Rani CS, Ticku MK (2006) Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA(A) and NMDA receptor subunits. *Alcohol* 38(2):89–97
9. Tsai G, Coyle JT (1998) The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 49:173–184
10. Fredholm BB et al (2005) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 63:191–270
11. Zimmermann H (2021) History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochem Pharmacol* 187:114322
12. Vardas J (2002) Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol* 54(4):313–326
13. Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38(2):107–125

14. Sebastião AM, Ribeiro JA Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(193): p. 471–534
15. Liu YJ et al (2019) Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther* 25(9):899–910
16. Lutte AH et al (2015) Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae. *Reprod Toxicol* 53:82–91
17. Diamond I et al (1991) The role of adenosine and adenosine transport in ethanol-induced cellular tolerance and dependence. Possible biologic and genetic markers of alcoholism. *Ann N Y Acad Sci* 625:473–487
18. Sharma R et al (2010) 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* 34(5):813–818
19. Nagy LE et al (1990) Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem* 265(4):1946–1951
20. Choi DS et al (2004) The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci* 7(8):855–861
21. Nam HW, Bruner RC, Choi DS (2013) Adenosine signaling in striatal circuits and alcohol use disorders. *Mol Cells* 36(3):195–202
22. Bolewska P et al (2019) Sequential changes in brain glutamate and adenosine A1 receptors may explain severity of adolescent alcohol withdrawal after consumption of high levels of alcohol. *Neurosci J*, 2019: p. 5950818
23. Tescarollo FC et al (2020) Role of adenosine in epilepsy and seizures. *J Caffeine Adenosine Res* 10(2):45–60
24. da Silva Chaves SN et al (2018) Behavioral and biochemical effects of ethanol withdrawal in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 169:48–58
25. Matthews M, Varga ZM (2012) Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J* 53(2):192–204
26. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ (2009) Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48(6):785–789
27. Westerfield M (2000) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th edn. University of Oregon Press
28. CONCEA CN (2016) d.C.d.E.A., Normativas Do Conceia Para Produção, Manutenção Ou Utilização de Animais Em Atividades de Ensino Ou Pesquisa Científica.
29. Mussulini BH et al (2013) Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS ONE* 8(1):e54515
30. Morton DB et al (2001) Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/AVMA/FRAME/RSPCA/UFaw Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the replacement of animals in medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim* 35(1):1–41
31. Bayard M et al (2004) Alcohol withdrawal syndrome. *Am Fam Physician* 69(6):1443–1450
32. Holcombe A et al (2013) Reversed scototaxis during withdrawal after daily-moderate, but not weekly-binge, administration of ethanol in zebrafish. *PLoS ONE* 8(5):e63319
33. Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR (2004) Modulation of multiple ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior by CRF and CRF1 receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 77(2):405–413
34. Roberts BM et al (2022) Dopamine release in nucleus accumbens is under tonic inhibition by adenosine A. *J Neurosci* 42(9):1738–1751
35. Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7(7):575–590
36. Hirth N et al (2016) Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(11):3024–3029
37. Fu X et al (2016) Long-Term Alcohol-Induced activation of mammalian target of Rapamycin is a key risk factor of Epilepsy. *Med Sci Monit* 22:3975–3980
38. Wang Y et al (2017) Attenuation of pentylenetetrazole-induced acute status epilepticus in rats by adenosine involves inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Neuro Report* 28(15):1016–1021

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

# Capítulo 4

Manuscrito: Avaliação do papel da adenosina sobre a sensibilidade ao PTZ em um modelo de exposição ao etanol no início do desenvolvimento em peixe-zebra

*Status:* não submetido

# **Avaliação do papel da adenosina sobre a sensibilidade ao PTZ em um modelo de exposição ao etanol no início do desenvolvimento em peixe-zebra**

Autores: Giovanna Trevisan Couto<sup>1</sup>, Guilherme Pietro da Silva<sup>1</sup>, Liliana Rockenbach<sup>2</sup>, Jéssica Scheid da Silva<sup>1</sup>, Monica Ryff Moreira Roca Vianna<sup>3</sup>, Rosane Souza Da Silva<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

\*Autor correspondente:

Rosane Souza Da Silva

ORCID 000-0002-0592-008X

Programa de Pós-Graduação em Neurociências  
Universidade Federal Fluminense – Campus do  
Gragoatá

R. Alexandre Moura, 8 – Bloco M – Instituto de Biologia  
São Domingos, Niterói – Rio de Janeiro – CEP: 24210-200 E-mail: [rosanesouzadasilva@gmail.com](mailto:rosanesouzadasilva@gmail.com)

## Resumo

A exposição ao etanol no início do desenvolvimento pode impactar na formação e maturação do Sistema Nervoso trazendo à tona um problema de saúde pública. O conjunto de sintomas decorrentes do consumo de etanol na gravidez é chamado de FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*) e inclui desde alterações cognitivas leves até a forma mais grave chamada SAF (Síndrome Alcoólica Fetal). O desequilíbrio provocado pelo etanol na formação da arquitetura cerebral afeta diretamente o sistema de neuromodulação da Adenosina. Neste trabalho, um regime único de exposição de 24 a 26 hpf a 1% de etanol via transdermal foi usado como modelo para avaliar a sinalização de adenosina no contexto de suscetibilidade à convulsão em larvas e adultos de peixe-zebra. Para testar a sensibilidade, foi usada a dose subconvulsiva de 2,5mM de pentilenotetrazol (PTZ), que foi capaz de aumentar os eventos convulsivos dos estágios mais característicos (larvas em estágio II e adultos em estágio IV) no grupo de exposição comparado aos controles larval e adulto. A expressão do mRNA dos receptores de adenosina e ecto 5' nucleotidase não apresentaram diferenças significativas em ambas as idades testadas sugerindo fortemente a existência de mecanismos subjacentes. Já o efeito anticonvulsivo do receptor de adenosina A<sub>1</sub> foi alcançado com a administração transdermal do CPA 75µM em larvas e injeção intraperitoneal a 10mg/Kg em adultos. Essas descobertas servem como base para entender melhor os reflexos da exposição ao etanol no início do desenvolvimento e o papel da adenosina em reverter esses efeitos, usando o peixe-zebra como um modelo bem caracterizado para estudo com exposição de etanol e convulsão.

Palavras-chave: convulsão - etanol - desenvolvimento - adenosina

## 1. Introdução

O Distúrbio do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) é um importante desafio para a gestão em saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos (Urban et al., 2015; Lange et al., 2017). Estima-se que mais de 1.700 novos casos de FASD são identificados globalmente por dia (Lange et al., 2017). O FASD inclui formas graves, como a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), que se caracteriza por alterações morfológicas na face, tamanho corporal reduzido, problemas auditivos, visuais entre outros, a qual é facilmente diagnosticada (Wattendorf e Muenke, 2005). As formas mais brandas, denominadas de distúrbios do neurodesenvolvimento relacionados ao etanol (*ARND* do inglês *Alcohol related neurodevelopment disorders*), exibem alterações cognitivas mesmo quando as sequelas morfológicas estão ausentes (Hoyme et al., 2016, Stratton et al., 1996). Hiperatividade, dificuldade de atenção e prejuízos ao aprendizado e a memória são algumas destas alterações (Streissguth et al., 2004).

Adicionalmente, estudos apontam que de 3 a 21% dos indivíduos com SAF desenvolvem algum tipo de estado convulsivo variando de alterações eletroencefalográficas à epilepsia (Boronat et al., 2017). O desenvolvimento de tais sequelas podem ser dependente do período gestacional e da dose de exposição. Estudos em humanos, sugerem que ingestas de grande volume de etanol em curto período durante as semanas gestacionais 11–16 aumentam o risco de convulsões neonatais e o risco de desenvolvimento de epilepsia (Sun et al., 2009).

A exposição ao etanol é um fator de risco para o desenvolvimento de anormalidades estruturais e funcionais, impactando a sobrevivência neuronal, migração, diferenciação celular e sinaptogênese (Goodlett, Horn e Zhou, 2005; De la Monte e Kril, 2014). Subsídios para o entendimento destes impactos incluem a capacidade do etanol interagir com várias proteínas, como receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos, glicinérgicos, gabaérgicos e purinérgicos, além de canais iônicos (Olsen e Llang, 2017). Dentre estes alvos, o sistema purinérgico se destaca, dada a importância da adenosina para a neuromodulação, para

o desenvolvimento cerebral e para a resposta à convulsão (Cunha et al., 2001; Mendez et al., 2020).

Estudos indicam que o etanol eleva os níveis extracelulares de adenosina, estimulando os receptores P1 de adenosina de forma indireta (Choi et al., 2004). A elevação da concentração extracelular de adenosina na presença de etanol parece estar envolvida com a inibição dos transportadores de nucleosídeos equilibrativos (ENT1) e com o aumento da hidrólise de AMP, o que pode levar a um acúmulo de adenosina extracelular (Dunwiddie e Masino, 2001; Choi et al., 2004; Lutte et al., 2015). Dados anteriores de nosso grupo, indicaram que em um modelo de FASD em peixe-zebra há uma elevação da atividade da enzima ecto-5'- nucleotidase encefálica a qual é persistente à vida adulta (Lutte et al., 2018). Ainda, este modelo de FASD em peixe-zebra é capaz de promover alterações cognitivas que mimetizam as sequelas humanas, tais como déficits de memória e prejuízo à sociabilidade, as quais foram prevenidas pela administração de inibidores da ecto-5'- nucleotidase (Haab Lutte et al., 2018; Lutte et al., 2020). Sendo assim, buscamos neste trabalho investigar a participação da modulação adenosinérgica nos possíveis efeitos de longo prazo do etanol dado no início do desenvolvimento sobre a sensibilidade a convulsões através da análise da expressão gênica dos receptores P1 de adenosina e da enzima ecto-5'-nucleotidase e da sensibilidade à convulsão mediada por pentilenotetrazol e resposta ao efeito anticonvulsivante de um agonista de receptor A<sub>1</sub> de adenosina.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Drogas**

Etanol foi obtido da Neon (São Paulo). CPA (Sigma Aldrich - referência: C8031) Pentilenotetrazol (Sigma Aldrich - referência P6500) e Tricaina (MSS-222) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O trizol foi Life technologies USA (Referência - 15596026).

### **2.2 Animais e manutenção**

Foram utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*) da linhagem selvagem AB criados e mantidos no biotério institucional Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CEMBE – PUCRS) em sistema recirculador automatizado (Zebtec,

Tecniplast, Itália) e com água filtrada por osmose reversa sob temperatura de  $26,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , pH 7-7,5, oxigenação (7,20 mg O<sub>2</sub>/L) e condutividade monitorados (300–700 µS) e um ciclo claro/escuro de 14h/10h. Os animais foram alimentados a partir de 6 dias pós-fertilização (dpf) com paramécio e ração moída (TetraMin Tropical Flakes Fish) e a partir de 13 dpf com introdução de artêmias (Westerfield, 2000). Os adultos receberam alimentação com ração e artemia três vezes ao dia.

Para obtenção dos animais usados nestes experimentos, foi realizada reprodução de animais adultos utilizados como matrizes de acasalamento do CEMBE-PUCRS. Um dia antes do acasalamento os animais foram separados na proporção 10 machos : 5 fêmeas e mantidos separados por uma partição em um mesmo tanque durante à noite. Na manhã seguinte a barreira foi removida e em 30 minutos os ovos fertilizados foram coletados para que seu desenvolvimento fosse sincronizado temporalmente e utilizados nos experimentos.

Para avaliar o efeito a exposição ao etanol 1% sobre a expressão dos genes *aduraa1*, *aduraa2a1* e *aduraa2a2* e da *nt5e*, animais de 7 dpf e 3 mpf, livres da interferência ao PTZ, foram eutanasiados em banho de gelo (Jorge et al., 2022). Para larvas foi utilizado um número amostral de 4 por grupo experimental (controle e etanol). Cada amostra foi consertada por um pool de 20 larvas, totalizando 80 larvas por grupo experimental. Animais adultos tiveram seus encéfalos dissecados. Cada amostra foi consertada de um pool de 3 cérebros totalizando 12 animais adultos por grupo experimental. Em microtubos plásticos (1,5 mL), cada amostra recebeu 300 µl de trizol e estas foram armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  até o dia da realização da análise.

Todos estes protocolos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA/PUCRS 9570/2019).

### **2.3 Exposição embrionária ao etanol**

Embriões foram divididos aleatoriamente em grupo controle e tratado. Os embriões foram tratados via transdermal com solução de etanol 1% (v/v) diluída em água do sistema durante 24 a 26 horas pós-fertilização (hpf) em uma placa Petri 8,7cm de diâmetro. Os animais controle sofreram as mesmas manipulações, exceto pela exposição ao etanol, sendo expostos exclusivamente à água do sistema. Após este

período, os embriões foram transferidos para a estufa BOD contendo água do sistema  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  até serem utilizados para os experimentos aos 7 dpf ou transferidos para aquários de crescimento em estantes automatizada com água de sistema recirculante até atingirem 3 meses pós-fertilização (mpf) em condições semelhantes às descritas no item 2.1.

## **2.4 Avaliação da suscetibilidade à convulsão induzida por PTZ**

### **2.4.1 Suscetibilidade na fase larval:**

Aos 7 dpf, larvas de peixe-zebra de ambos os grupos experimentais foram submetidas a uma dose-subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) (2,5 mM; Couto et al; no prelo) para verificar a sensibilidade à convulsão. A exposição ao PTZ foi realizada individualmente em uma placa de de cultivo celular 24 poços (1,6 cm de diâmetro de poço com capacidade para 3 mL) e cada poço continha 3 mL de solução de PTZ. A filmagem foi realizada durante a exposição ao PTZ (10 minutos) por uma câmera acoplada do Ethovision XT.

### **2.4.2 Suscetibilidade na fase adulta:**

Aos 3 mpf, os animais foram ambientados em sala de experimento 24h antes das análises e sem alimentação. A exposição individual ao PTZ (2,5 mM) ocorreu em aquários (13 x 11,5 x 8 cm; altura x comprimento x largura) contendo 500 mL da solução de PTZ, perfazendo uma coluna de água de 5,5 cm de altura. Imediatamente, a filmagem foi iniciada com imagem frontal na distância de 65cm por 6 minutos com câmera digital (Logitech, Romanel-sur-Morges, Switzerland).

Todos os experimentos foram realizados entre 10 horas da manhã e 15 horas da tarde. Os estágios convulsivos considerados para a análise das larvas foram: estágio I: aumento drástico da atividade de natação; estágio II: nado em círculo; e estágio III: convulsões semelhante a clônus com perda de postura e imobilidade (Baraban et al, 2005). Os estágios convulsivos considerados para os animais adultos foram: estágio II: aumento de velocidade, movimentos erráticos para direita e esquerda; estágio III: aumento da velocidade e movimentos circulares; e estágio IV: aumento abrupto de velocidade, contrações musculares com saltos e

movimentos abruptos e estágio V perda de postura, queda para o fundo do aquário e rigidez corporal (Kundap et al, 2017; Mussolini et al; 2013). Foram registrados o número de animais alcançando cada estágio convulsivo e a duração (segundos) e latência (segundos) para alcançar cada estágio convulsivo. As análises das gravações foram feitas de forma cega por dois observadores. O número amostral foi de 16 para a fase larval e 12 para a fase adulta (Da silva chaves et al, 2018)

#### **2.4.3 Ação anticonvulsivante do agonista de receptor A<sub>1</sub> de adenosina (CPA)**

Concomitantemente à análise de sensibilidade ao PTZ, um grupo experimental adicional foi utilizado para avaliar a ação anticonvulsivante do CPA. Previamente à exposição ao PTZ, este grupo experimental, o qual foi mantido nas condições descritas nos itens 2.4.2 e 2.4.3 foi exposto ao CPA. As larvas de 7 dpf foram expostas durante 30 minutos a uma solução de CPA 75 µM em placa de 24 poços com 3ml em cada (Couto et al., no prelo). A exposição ao CPA para animais adultos foi feita 30 minutos antes da exposição ao PTZ por injeção intraperitoneal. Os animais foram previamente anestesiados em grupos de 4 em béquer com 300ml de solução contendo 0,03g de triclaína e imediatamente após a identificação de comportamentos que demonstram a efetividade da anestesia, como diminuição do nado, estagnação, perda de tônus muscular e a barriga voltada para cima, receberam a injeção CPA (10 mg.Kg<sup>-1</sup>) ou salina.

#### **2.5 Análise da expressão gênica relativa de receptores P1 e da enzima ecto-5'- nucleotidase por qPCR**

Para a extração de RNAm, as amostras congeladas foram previamente maceradas e homogeneizadas com vórtex. Foi adicionado clorofórmio para separação das fases. Após precipitação com isopropanol, foram homogeneizadas e centrifugadas, tiveram o sobrenadante descartado, conservando apenas o *pellet*. Para lavagem foi utilizado etanol 75%, homogeneizado e centrifugado e novamente conservado apenas o *pellet*. Por fim, as amostras foram ressuspensas em água livre de RNase e adicionado RNase OUT para conservação em volume final.

A quantificação de RNA foi realizada espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific - NanoDrop Lite Printer) a partir da determinação da razão das

absorbâncias a 260 nm e 280 nm utilizando uma alíquota de 1 µL de cada amostra para leitura. Após feita a digestão com DNase I (Kit Sigma 1002268809) para purificar o RNA, foi utilizado o *kit High – Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher)* para síntese de cDNA com 1 µg de RNA, seguindo todas as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes listados na tabela 1 foi determinada pela reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR), utilizando PowerUp SYBR® Green (Invitrogen). Beta actina e EF1-alfa foram usados como genes de referência para normalização e e determinação de níveis relativos de expressão de mRNA. Os genes *elf1a* e *adoraa1* foram desenhados usando a sequência disponível no NIH (*National Library of Medicine*) e os demais foram sequências já utilizadas nos trabalhos do nosso laboratório.

Target	Primer sequence	T°	Accession number
<i>elf1a</i>	F=TGTCCTCAAGCCTGGTAT R=CATTACCACGACGGATGT	58	NM_131263.1
<i>b-actin</i>	F= CGAGCTGTCTTCCCATCCA R= TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	51	ENSDART55194
<i>adoraa1</i>	F= ACTAAAGCTGGCCAAGTCCC R= AGGAACATTGGCTTCTCGCA	60	NM001128584.1
<i>adoraa2a1</i>	F= GCGAACTGTACGCCGAGCAGAG R= TTATTCCCAGTGAGCGGCGACTC	60	NM001039815.1
<i>adoraa2a2</i>	F= GGATTGGGTCATGTACCTGGCCATC R= GCTGTTTCCAATGGCCAGCCTG	60	NM001040036
<i>nt5e</i>	F= TGGACGGAGGAGACGGATTACC R= GGAGCTGCTGAACTGGAAGCGTC	60	NM200932.1

Tabela 1: Sequência de primers dos genes alvo (Capiotti et al., 2016; Lutte et al, 2018)

## 2.6 Análise estatística:

Os dados em Graphpad são apresentados como frequência de animais atingindo os estágios específicos de convulsão. A comparação entre frequências foi

realizada pelo teste do Chi-quadrado. Para aqueles grupos com número de animais maior que 3 atingindo os estágios convulsivos, foi feita a análise das médias de latência e duração dos estágios convulsivos por teste de Kruskal-Wallis e os dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A expressão gênica relativa foi comparada entre os grupos controle e tratado pelo teste Mann-Whitney. Diferenças estatísticas foram atribuídas quando  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados**

#### **3.1 Sensibilidade a dose subconvulsivante de PTZ após exposição embrionária ao etanol**

A frequência de larvas atingindo os estágios convulsivos I e II não diferiu entre os animais do grupo controle e do grupo tratado com etanol, da mesma forma que o pré-tratamento com CPA não modificou este desfecho ( $p=0,4096$ , Teste do Qui- quadrado) (Figura 1A e 2A). No entanto, a maioria dos animais atingiu o estágio I em relação à latência para estágio I (Fig. 2B), o grupo etanol atingiu latências significativamente menores do que aqueles que receberam o pré-tratamento com CPA ( $p=0.046$ , Teste Kruskal-Wallis), embora estes grupos não difiram dos animais controle (Figura 1B e C). A duração do estágio convulsivo I para larvas submetidas na fase embrionária ao etanol foi significativamente maior que os animais controle, enquanto o tratamento prévio com CPA não foi capaz de alterar este efeito significativo ( $p=0.006$ ; Teste Kruskal-Wallis). A latência para atingir o estágio II foi significativamente menor nos animais expostos ao etanol na fase embrionária do que nos controles enquanto o tratamento com CPA foi incapaz de alterar este desfecho (Figura 2B) ( $p=0.03$ , Teste Kruskal-Wallis). A duração do estágio II não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 2C) ( $p=0.6845$ , Teste Kruskal-Wallis). Não houve larvas atingindo o estágio III de convulsão.

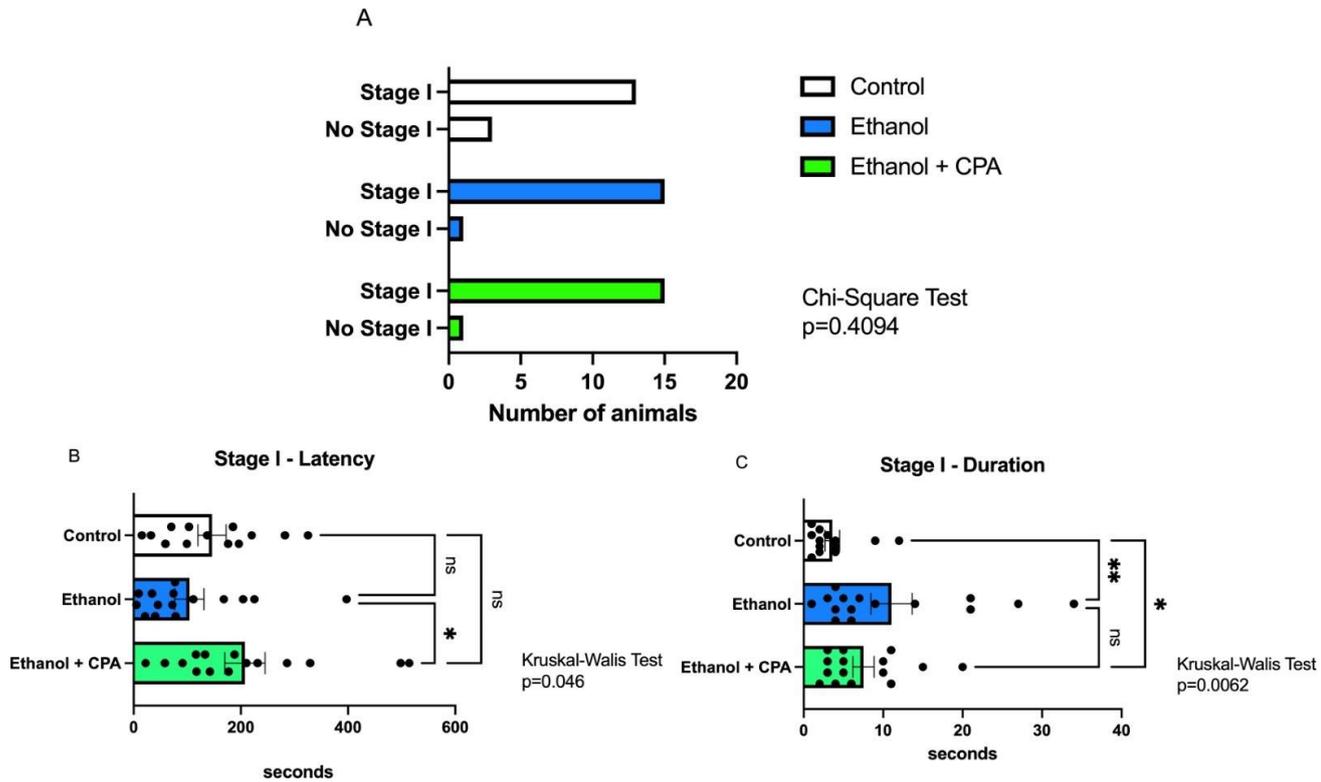


Fig.1. Avaliação da suscetibilidade ao estágio I de convulsão mediada pelo PTZ em larvas de 7 dpf expostas ao etanol (1% v/v) na fase embrionária (24-26 hpf). A) Frequência de larvas que atingiram o estágio I na escala de convulsões para os grupos controle, tratado com etanol 1% e tratado com etanol 1% + CPA. B) Latência em segundos para atingir o estado I de convulsão; C) Duração em segundos no estágio I. O CPA foi dado de forma transdermal na concentração de 75  $\mu$ M, 30 minutos antes da exposição ao PTZ (2,5 mM; 10 minutos). Os controles foram expostos apenas à água. Número amostral=16 larvas por grupo experimental.

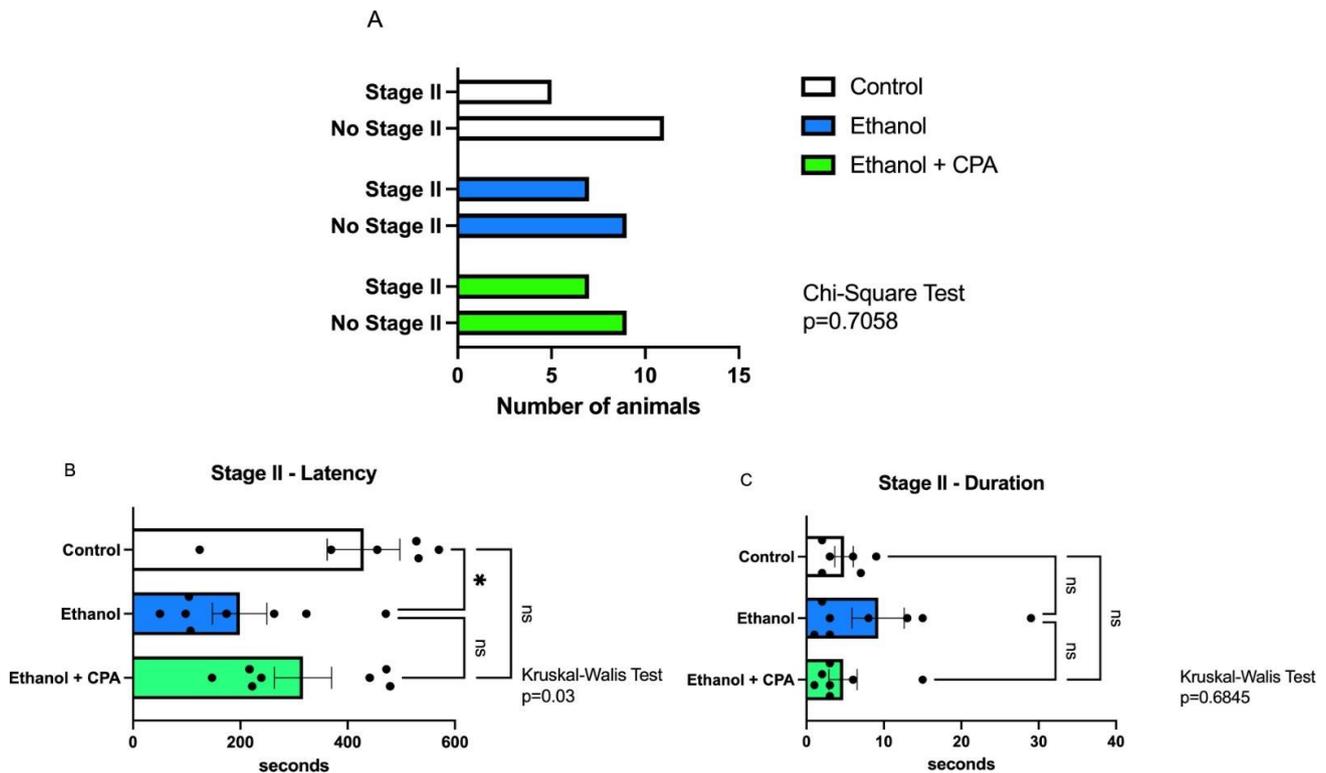


Fig.2. Avaliação da suscetibilidade ao estágio II de convulsão mediada pelo PTZ em larvas de 7 dpf expostas ao etanol (1% v/v) na fase embrionária (24-26 hpf). A) Frequência de larvas que atingiram o estágio II na escala de convulsões para os grupos controle, tratado com etanol 1% e tratado com etanol 1% + CPA. B) Latência em segundos para atingir o estado I de convulsão; C) Duração em segundos no estágio I. O CPA foi dado de forma transdermal na concentração de 75  $\mu$ M, 30 minutos antes da exposição ao PTZ (2,5 mM; 10 minutos). Os controles foram expostos apenas à água. Número amostral=16 larvas por grupo experimental

A maioria dos animais adultos atingiu o estágio II de convulsão, enquanto a minoria atingiu os estágios III e IV, porém a frequência de animais adultos atingindo estes estágios não diferiu entre os grupos experimentais (II: p=0.1019; III: p=0.1286; IV: p=0.225, Teste do Qui-quadrado) (Figura 3A, B, C). Para os animais que atingiram o estágio II, tanto a latência quanto a duração deste estágio não diferiram entre os grupos experimentais (p=0.1954; p=0.6158, respectivamente, Teste Kruskal-Wallis) (Figura 3D e E).

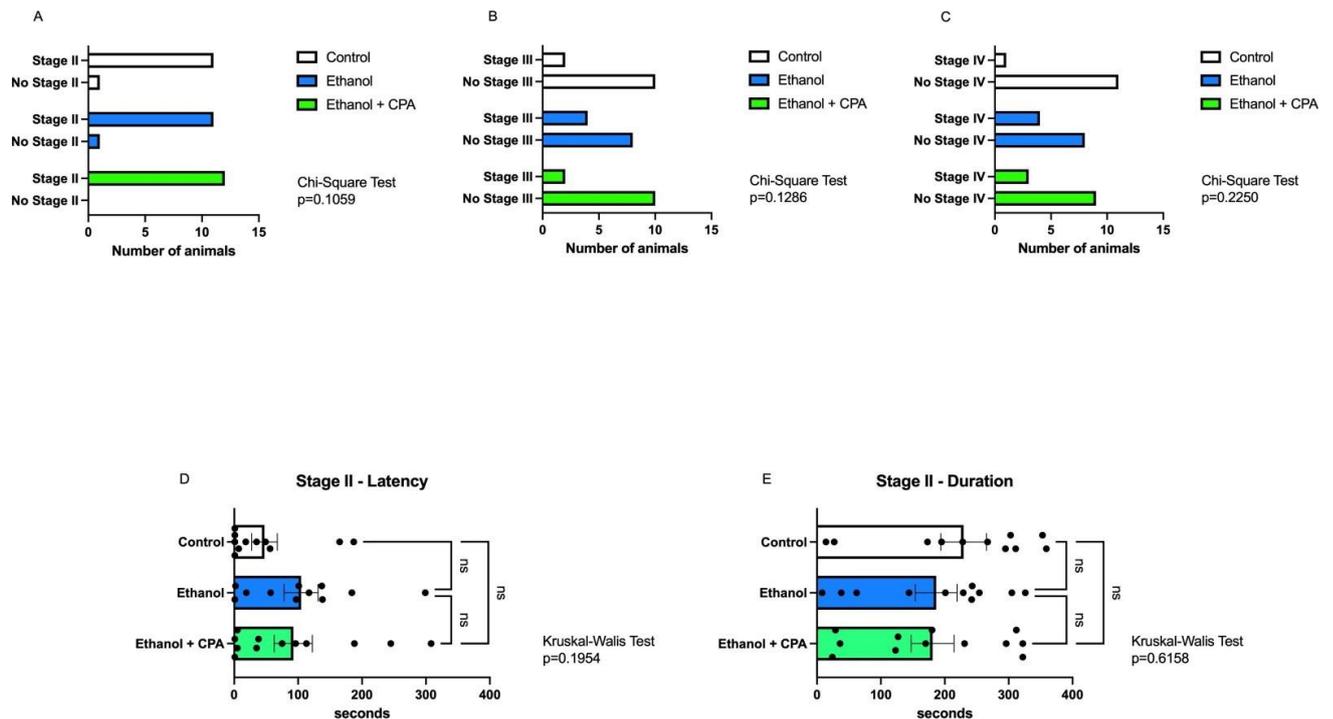


Fig.3. Avaliação da suscetibilidade aos estágios II, III e IV de convulsão mediada pelo PTZ em peixe-zebra adulto (3 mpf) expostos ao etanol (1% v/v) na fase embrionária (24-26 hpf). A, B e C) Frequência de animais que atingiram os estágios II, III e IV na escala de convulsões, respectivamente, para os grupos controle, tratado com etanol 1% e tratado com etanol 1% + CPA. D) Latência em segundos para atingir o estado II de convulsão; E) Duração em segundos no estágio II. O CPA foi dado intraperitonealmente na dose de 10 mg. Kg<sup>-1</sup>, 30 minutos antes da exposição ao PTZ (2,5 mM; 6 minutos). Os controles foram expostos apenas à água. Número amostral=12 animais por grupo experimental.

### 3.2 Análise da expressão gênica relativa de receptores de adenosina e da ecto- 5'-nucleotidase por qPCR

Foi analisada a expressão dos genes que codificam para os receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2AA</sub> e A<sub>2AB</sub> (*adoraa1*, *adoraa2a1*, *adoraa2a2*) juntamente com a principal enzima produtora de adenosina no meio extracelular, a ecto-5'-nucleotidase (*nt5e*) em animais de 7 dpf e 3mpf expostos ao etanol na fase embrionária (24-26 hpf). Tanto a avaliação da expressão em larva total quanto em encéfalo de peixe-zebra adulto não diferiu nos grupos experimentais para nenhum dos genes avaliados (Larvas: *adoraa1*:  $p=0,7429$ , *adoraa2a1*:  $p=0,9714$ , *adoraa2a2*:  $p=0,6857$ ; *nt5e*:  $p=0.8857$ ;

Adultos: *adoraa1*:  $p= 0,4857$ , *adoraa2a1*:  $p=0,4$ , *adoraa2a2*:  $p=0,8571$ ; *nt5e*:  $p=0.6286$ , Teste de Mann-Whitney) (Figuras 4 e 5).

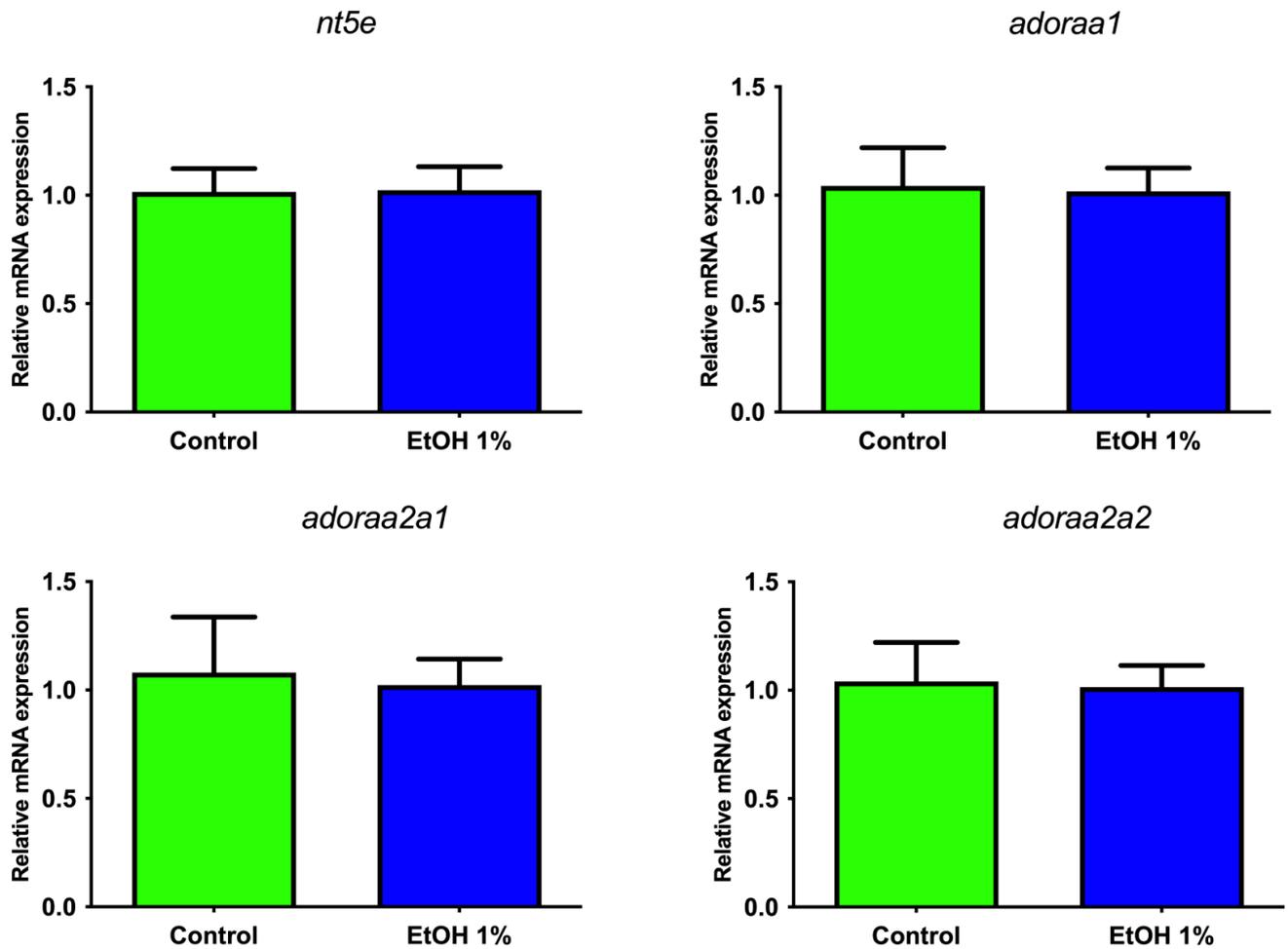


Fig.4. Expressão gênica relativa de RNAm dos receptores de adenosina e da ecto-5'-nucleotidase em larvas totais (7dpf) após exposição embrionária (24-26 hpf) ao etanol 1% (v/v). Os controles foram expostos apenas à água. *nt5e*= ecto-5'-nucleotidase; *adoraa1*- receptor A<sub>1</sub>; *adoraa2a1*: receptor A<sub>2A1</sub>; e *adoraa2a2*: receptor A<sub>2A2</sub>. Número amostral = 4 por grupo experimental. Análise estatística Mann-Whitney.

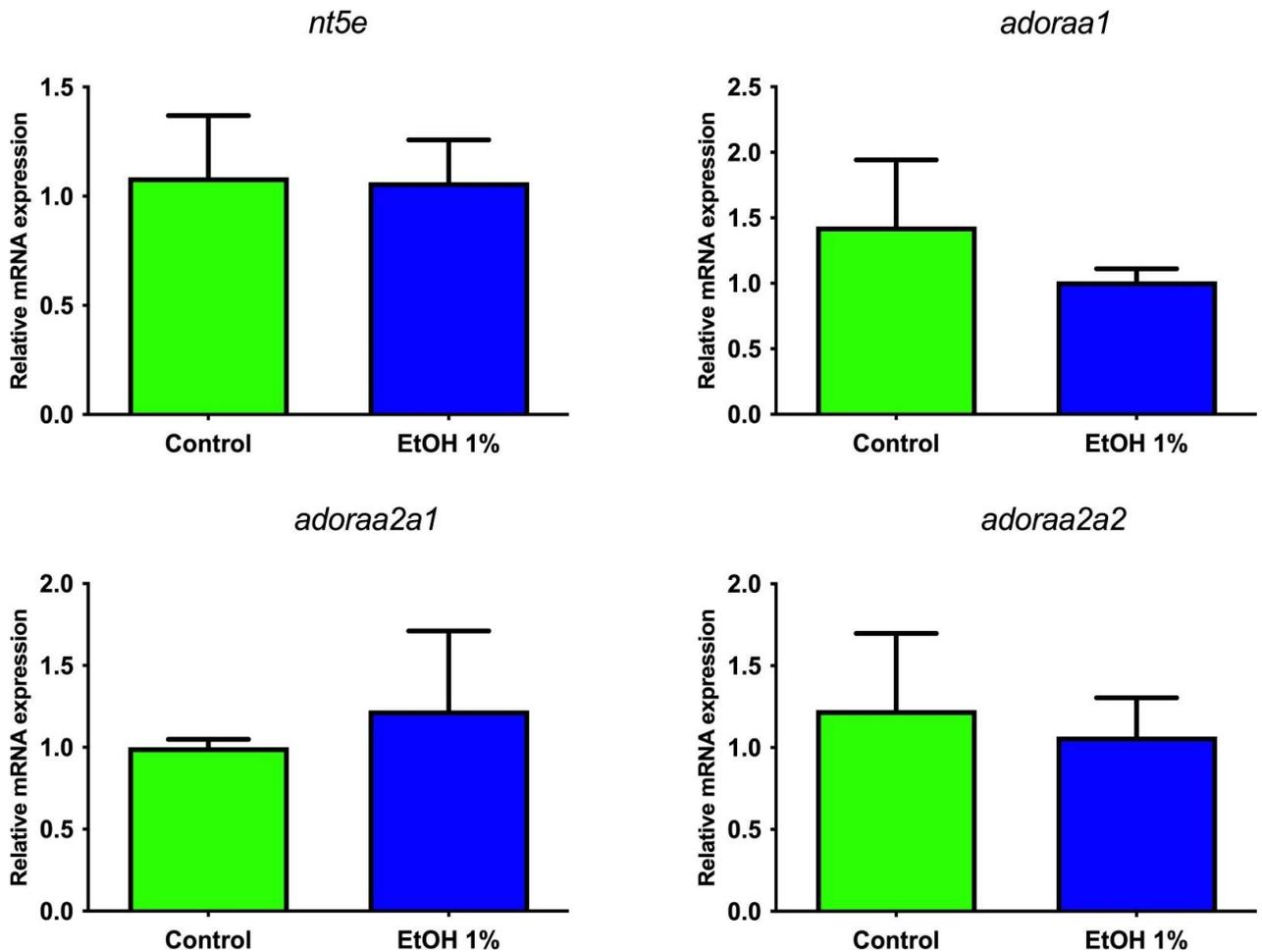


Fig. 5. Expressão gênica relativa de RNAm dos receptores de adenosina e da ecto-5'-nucleotidase em encéfalo de peixe zebra adulto (3mpf) após exposição embrionária (24-26 hpf) ao etanol 1% (v/v). Os controles foram expostos apenas à água. *nt5e*= ecto-5'-nucleotidase; *adora1*- receptor A<sub>1</sub>; *adora2a1*: receptor A<sub>2A1</sub>; e *adora2a2*: receptor A<sub>2A2</sub>. Número amostral = 4 por grupo experimental. Análise estatística Mann-Whitney.

## Discussão

O consumo de etanol durante a gravidez é um fator de risco para desfechos desfavoráveis ao neonato, incluindo risco de morte, nascimento prematuro, retardo do crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer, além de alterações morfológicas crânio-faciais e cognitivas (Henriksen et al., 2004; Patra et al., 2010). Mesmo naqueles indivíduos que não desenvolvem as sequelas mais graves do FASD há muitos transtornos do neurodesenvolvimento relacionados ao etanol (Stratton, Howe e Battaglia, 1996). O aumento da incidência de crises convulsivas tem sido

sugerido em estudos com humanos submetidos ao etanol durante a gestação e em modelos animais para o FASD (Sun et al., 2009; Nicita et al., 2014; Cho et al., 2017; Wang et al., 2018). Embora estudos indiquem que a exposição ao etanol é capaz de alterar a disponibilidade de adenosina no meio extracelular e a funcionalidade de seus receptores específicos (Dunwiddie e Masino 2001; Choi et al., 2004; Lutte et al., 2015), ainda não se sabe se estas alterações, quando no início do desenvolvimento, podem afetar de forma duradoura o funcionamento do SNC, em especial contribuindo para a suscetibilidade às convulsões, dado o papel anticonvulsivante natural da adenosina.

Aqui realizamos a exposição de embriões de peixe-zebra ao etanol no período de 24 a 26 hpf, o qual está inserido na fase de faríngula (24- 48 hpf). Nesse estágio do desenvolvimento do peixe-zebra, o corpo começa a se organizar dorsalmente, se vascularizar e tem início a organização para formação do Sistema Nervoso (Kimmel et al., 1995). Podemos correlacionar este com a faixa entre o 2º e 3º trimestre. Onde acontece um intenso período de migração e diferenciação celular até o início do desenvolvimento cerebral (Andersen et al., 2003; Dobbing et al., 1979). A concentração de 1%, utilizada neste estudo, é prevalente entre pesquisas com exposição do peixe-zebra ao etanol, pois consegue reproduzir impactos neuroquímicos sem afetar a morfologia do animal (Schaidhauer et al., 2022). A barreira exercida pelo córion em embriões de peixe-zebra deve ser considerada, uma vez que a concentração de etanol dentro do ovo é 2,7 a 6,2 vezes menor que a concentração externa utilizada (Lovely et al., 2014).

Nossos resultados sobre suscetibilidade ao pentilenotetrazol, indicaram que em todos os estágios convulsivos investigados, incluindo os mais característicos, tanto para larva (estágio II), quanto para adultos (estágio IV), não houve diferença na frequência de animais entre os grupos estudados. Embora este resultado possa indicar que de fato as possíveis alterações mediadas pela exposição ao etanol nas condições descritas aqui não surtiram efeitos sobre a sensibilidade à convulsão. É possível também considerar que, pelo menos para o estágio larval, a concentração de PTZ tenha sido insuficiente. De fato, as larvas têm sido consideradas mais resistentes ao PTZ, e concentrações como 15 mM são frequentemente utilizadas para alcançar a convulsão (Baraban et al., 2015).

Para os estágios I e II de convulsão de larvas foi possível explorar os parâmetros de latência para atingir tais estágios e a duração destes. A duração do estágio I se mostrou maior e a latência para o estágio II se mostrou menor em larvas que receberam o etanol na fase embrionária quando comparadas aos controles. Isto pode sugerir uma maior sensibilidade à convulsão, visto que utilizamos doses subconvulsivantes. Já os demais dados, latência para o estágio I e duração do estágio II para larvas, mesmo não tendo mostrado uma significância estatística, apontaram para uma tendência para os mesmos resultados acima.

Ainda, nos resultados de longo prazo, os grupos experimentais não tiveram diferença na frequência de animais adultos alcançando os estágios convulsivos II, III e IV, além de não se diferenciarem quanto à latência e a duração do estágio II, o único estágio com número suficiente de animais para a análise destes parâmetros.

Achados da literatura revelam que a exposição ao etanol na fase embrionária do peixe-zebra aumenta a atividade da ecto-5-nucleotidase (Lutte et al., 2015), promovem redução robusta em níveis de serotonina e dopamina (Mahabir et al., 2014), número aumentado de células apoptóticas e diminuição dos transportadores de glutamato de forma persistente (Ramlan et al., 2017, Baggio et al., 2017). Estas alterações têm sido relacionadas com déficits cognitivos que se assemelham ao encontrado em indivíduos humanos que possuem FASD (Lutte et al., 2018; Lutte et al., 2020; Schaidahuer et al., 2022; Fernandes et al., 2015 a; Fernandes et al., 2009; Fernandes et al., 2015 b).

No entanto, nossos resultados indicam que a exposição ao etanol na fase embrionária (24-26 hpf) do peixe-zebra não promove efeitos contundentes sobre a sensibilidade à convulsão em larvas e animais adultos. Entretanto, é possível que o menor tempo de exposição ao etanol utilizado neste trabalho possa também contribuir para a ausência de efeitos. Adicionalmente, esta exposição não foi capaz de alterar a expressão gênica dos receptores P1 de alta afinidade e da enzima ecto-5'- nucleotidase, tanto em larvas quanto em encéfalo de indivíduos adultos.

Embora os dados para sensibilidade ao PTZ não tenham se diferenciado de forma contundente entre os animais tratados com etanol e os animais controle, o uso do agonista rígido de adenosina, CPA, mostrou efeitos significativos no aumento da latência para estágio I em larvas em comparação ao grupo tratado com etanol.

Por fim, nas condições estudadas aqui, a exposição embrionária ao etanol não contribuiu de forma contundente com a suscetibilidade à convulsão e os receptores e a ecto-5'-nucleotidase não tiveram sua expressão gênica afetadas em curto e longo prazo. Isto pode estar em consonância com o fato de o presente estudo ter mimetizado uma forma branda dentro do espectro da síndrome alcoólica fetal. Ainda resta investigar, se em modelos mais próximos a formas mais severas do FASD, estes e outros mecanismos subjacentes à disponibilidade de adenosina e a funcionalidade dos receptores P1, tais como a atividade enzimática da adenosina deaminase, mecanismos de transportes de nucleosídeos, e a capacidade de ligação entre ligante e receptor de adenosina, contribuam para uma maior suscetibilidade a convulsões.

## Referências

1. Andersen, S.L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2003, 27(1-2), 3-18.
2. Baggio, S., Zenki, K., Martins Silva, A., dos Santos, T. G., Rech, G., Lazzarotto, G., ... de Oliveira, D. L. (2020). Fetal alcohol spectrum disorders model alters the functionality of glutamatergic neurotransmission in adult zebrafish. *NeuroToxicology*.
3. Baraban, S. C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and cfos expression. *Neuroscience*, v. 131, n. 3, p. 759–768, 2005.
4. Boronat, S., Vicente, M., Lainez, E., Sánchez-Montañez, A., Vázquez, E., Mangado, L., del Campo, M. (2017). Seizures and electroencephalography findings in 61 patients with fetal alcohol spectrum disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 60(1), 72–78.
5. Capiotti, K. M., Siebel, A. M., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D., & Da Silva, R. S. (2016). Hyperglycemia alters E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, and ectosolic and cytosolic adenosine deaminase activities and expression from encephala of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Purinergic Signalling*, 12(2), 211–220.
6. Cho SJ, Lovinger DM, N'Gouemo P. Prenatal alcohol exposure enhances the susceptibility to NMDA-induced generalized tonic-clonic seizures in developing rats. *CNS Neurosci Ther.* 2017 Oct;23(10):808-817

7. Choi, D.-S., Cascini, M.-G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., ... Messing, R. O. (2004). The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nature Neuroscience*, 7(8), 855–861.
8. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator I the nervous system: different roles, diferent sources and different receptors. *Neurochem int.* 2001; 38(2): 107-25.
9. Da Silva Chaves, S.N., et al., Behavioral and biochemical effects of ethanol withdrawal in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*, 2018. 169: p. 48-58.
10. De la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuro- pathol.* 2014; 127(1):71-90.
11. Dobbing, J.; Sands, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.*, 1979, 3(1), 79-83
12. Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 31–55.
13. Fernandes, Y., Gerlai, R., 2009. Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33 (4), 601–609.
14. Fernandes, Y.; Rampersad, M.; Gerlai, A.R. Impairment of social behaviour persists two years after embryonic alcohol exposure in zebrafish: A model of fetal alcohol spectrum disorders. *Behav. Brain Res.*, 2015a
15. Fernandes, Y.; Rampersad, M.; Gerlai, R. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2015b
16. Franke, H., Illes, P., 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol. Ther.* 109, 297–324
17. Gerlai, R.; Lahav, M.; Guo, S.; Rosenthal, A. Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem.*
18. Gerlai R. Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Mar;178:30-38.
19. Goodlett, C. R., Horn, K. H., & Zhou, F. C. (2005). Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 394–406.
20. Haab Lutte, A., Huppes Majolo, J., Reali Nazario, L., & Da Silva, R. S. (2018). Early exposure to ethanol is able to affect the memory of adult zebrafish: possible role of adenosine. *NeuroToxicology*.
21. Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503 (2013).

22. Hoyme H.E., Kalberg W.O., Elliott A.J., Blankenship J., Buckley D., Marais A.S., Manning M.A., Robinson L.K., Adam M.P., Abdul-Rahman O., Jewett T., Coles C.D., Chambers C., Jones K.L., Adnams C.M., Shah P.E., Riley E.P., Charness M.E., Warren K.R., May P.A. Updated clinical guidelines for diagnosing fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics*. 2016;138(2):e20154256.
23. Jorge M. Ferreira, Luís Félix, Sara Jorge, Sandra M. Monteiro, I. Anna S. Olsson, and Ana M. Valentim. Anesthesia Overdose Versus Rapid Cooling for Euthanasia of Adult Zebrafish. *Zebrafish*. Aug 2022. 148-159.
24. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 1995, 203(3), 253-310.
25. Krauss, S. W., Ghirnikar, R. B., Diamond, I. & Gordon, A. S. Inhibition of adenosine uptake by ethanol is specific for one class of nucleoside transporters. *Mol. Pharmacol.* 44, 1021–1026 (1993).
26. Kundap, U. P. et al. Zebrafish as a Model for Epilepsy-Induced Cognitive Dysfunction: A Pharmacological, Biochemical and Behavioral Approach. *Frontiers in pharmacology*, v. 8, p. 515, 2017.
27. Lange, S., Probst, C., Gmel, G., Rehm, J., Burd, L., & Popova, S. (2017). Global Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorder Among Children and Youth . *Jama Pediatrics*, 171(10), 948.
28. Liu, H., & Xia, Y. (2015). Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal of Applied Physiology*, 119(10), 1173–1182.
29. Lovely, C.B.; Nobles, R.D.; Eberhart, J.K. Developmental age strengthens barriers to ethanol accumulation in zebrafish. *Alcohol*, 2014, 48(6), 595-602.
30. Lutte, A. H., Capiotti, K. M., Silva, N. L. G. da, Silva, C. S. de O. da, Kist, L. W., Bogo, M. R., & Silva, R. S. D. (2015). Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae. *Reproductive Toxicology*, 53, 82–91.
31. Lutte, A. H., Majolo, J. H., & Da Silva, R. S. (2020). Inhibition of ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase is able to reverse long-term behavioural effects of early ethanol exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*, 10(1).
32. Lutte, A. H., Nazario, L. R., Majolo, J. H., Pereira, T. C. B., Altenhofen, S., da Silva Dadda, A., ... Da Silva, R. S. (2018). Persistent increase in ecto-5'-nucleotidase activity from encephala of adult zebrafish exposed to ethanol during early development. *Neurotoxicology and Teratology*.
33. Mahabir, S.; Chatterjee, D.; Gerlai, R. Strain dependent neurochemical changes induced by embryonic alcohol exposure in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2014, 41, 1-7.
34. Menéndez Méndez, A., Smith, J., & Engel, T. (2020). Neonatal Seizures and Purinergic Signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7832.

35. Mussulini, B. H. M. et al. Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PloS one*, v. 8, n. 1, p. e54515, jan. 2013.
36. Nicita, F.; Verrotti, A.; Pruna, D.; Striano, P.; Capovilla, G.; Savasta, S.; Spartà, M.V.; Parisi, P.; Parlapiano, G.; Tarani, L.; Spalice, A. Seizures in fetal alcohol spectrum disorders: Evaluation of clinical, electroencephalographic, and neuroradiologic features in a pediatric case series. *Epilepsia*, 2014, 55(6), e60-e66.
37. Novotný J. Adenosin a jeho role ve fyziologii [Adenosine and its role in physiology]. *Cesk Fysiol.* 2015;64(1):35-44. Slovak.
38. Olsen, R.W., Liang, J. Role of GABA<sub>A</sub> receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. *Mol Brain* 10, 45 (2017).
39. Pinheiro-da-Silva, J.; Agues-Barbosa, T.; Luchiari, A.C. Embryonic exposure to ethanol increases anxiety-like behavior in fry zebrafish. *Alcohol Alcohol.*, 2020, 55(6), 581-590.
40. Ramlan, N.F.; Sata, N.S.A.M.; Hassan, S.N.; Bakar, N.A.; Ahmad, S.; Zulkifli, S.Z.; Abdullah, C.A.C.; Ibrahim, W.N.W. Time dependent effect of chronic embryonic exposure to ethanol on zebrafish: *Morphology, biochemical and anxiety alterations*. *Behav. Brain Res.*, 2017, 332, 40-49.
41. Rivkees SA, Wendler CC. Long-term consequences of disrupting adenosine signaling during embryonic development. *Mol Aspects Med.* 2017 Jun;55:110-117
42. Schaidhauer FG, Caetano HA, da Silva GP, da Silva RS. Contributions of Zebrafish Studies to the Behavioural Consequences of Early Alcohol Exposure: A Systematic Review. *Curr Neuropharmacol.* 2022 Mar 4;20(3):579-593.
43. Stratton, K., Howe, C., and Battaglia, F. (eds.) Fetal Alcohol Syndrome: Diagnosis, Epidemiology, Prevention, and Treatment. The Institute of Medicine Report. Washington, DC, *National Academy Press*, 1996.
44. Streissguth, A.P.; Bookstein, F.L.; Barr, H.M.; Sampson, P.D.; O'Malley, K.; Young, J.K. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *J. Dev. Behav. Pediatr.*, 2004, 25(4), 228-238.
45. Sun, Y., Strandberg-Larsen, K., Vestergaard, M., Christensen, J., Nybo Andersen, A.-M., Gronbaek, M., & Olsen, J. (2008). Binge Drinking During Pregnancy and Risk of Seizures in Childhood: A Study Based on the Danish National Birth Cohort. *American Journal of Epidemiology*, 169(3), 313–322.
46. Urban, M.F.; Olivier, L.; Viljoen, D.; Lombard, C.; Louw, J.G.; Drotsky, L.M.; Temmerman, M.; Chersich, M.F. Prevalence of fetal alcohol syndrome in a South African

city with a predominantly Black African population. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2015, 39(6), 1016-1026.

47. Wang, K.; Chen, X.; Liu, J.; Zou, L.P.; Feng, W.; Cai, L.; Wu, X.; Chen, S.Y. Embryonic exposure to ethanol increases the susceptibility of larval zebrafish to chemically induced seizures. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 1845.

48. Wattendorf DJ, Muenke M. Fetal alcohol spectrum disorders. *Am Fam Physician*. 2005 Jul 15;72(2):279-82, 285.

49. Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A guide for the Laboratory Use Zebrafish (Danio rerio), th Edition*. University of Oregon Press, Eugene. 2000

# Capítulo 5

## Considerações finais

O etanol é uma substância lícita cujo consumo abusivo pode levar a uma série de doenças evitáveis. Como substância psicoativa, o álcool tem um complexo mecanismo de resposta fisiológica dependendo da dose, via e regime de administração (Vengeliene et al., 2008). Por meio de mecanismos complexos e, em parte, ainda desconhecidos, o etanol em baixas doses se comporta como estimulante e em altas doses como depressor do Sistema Nervoso Central (Hendler et al., 2011). Em modelos experimentais, a exposição ao etanol leva a uma alteração na disponibilidade extracelular de adenosina, dependendo do regime de exposição e concentração empregada (Hughes et al., 2018; Sharma et al., 2010). Os possíveis mecanismos para estas alterações parecem envolver desde a recaptação deste nucleosídeo, sua produção extracelular, até sua liberação em situação de convulsão (Lutte et al., 2015; Choi et al., 2004; Hughes et al., 2018). Desta forma, independente da forma de exposição, o sistema adenosinérgico parece estar envolvido na neurotoxicidade do etanol, incluindo efeitos sobre a habilidade de resposta às convulsões.

Na tentativa de elucidar melhor os danos causados pelo etanol e entender os mecanismos pelos quais estes danos ocorrem, abordamos neste trabalho a toxicidade do etanol sob dois aspectos: a Síndrome da Abstinência Alcoólica e a Síndrome Alcoólica Fetal. Para isso, o presente trabalho aplicou um modelo de abstinência ao etanol em peixe-zebra adultos e um modelo de exposição embrionária ao etanol levando em consideração e adaptando parâmetros como (1) concentração de etanol, (2) duração da exposição e (3) idade da exposição para o estudo das possíveis alterações na modulação adenosinérgica e suas repercussões sobre o controle da excitabilidade neural.

O consumo crônico de etanol pode provocar neuroadaptações (Tambour e Quertemont, 2007 algumas adaptações podem permanecer por meses (Littleton et al., 2001). A administração crônica de etanol regula positivamente o número de receptores NMDA (Gulya et al., 1991). Durante a abstinência o aumento destas sinalizações está associado a tremores, ansiedade, ataxia e até convulsões (Gulya et al., 1991) e são agravados pelo aumento de liberação de glutamato associado ao início da abstinência (Rosseti et al., 1995).

Visto que o etanol age como um agente perturbador das vias neuronais, podendo levar ao desenvolvimento de convulsões nesse desbalanço elétrico, testamos a sensibilidade à exposição ao pentilenotetrazol em dose subconvulsivante e o potencial do agonista de receptores  $A_1$  de adenosina (CPA) em reverter estes efeitos no modelo de Síndrome de Abstinência. Nossos achados revelam que a sensibilidade a crises convulsivas foi aumentada e animais abstidos de etanol. A abstinência ao etanol (por 1 dia ou 8 dias) levou os animais a alcançarem o estágio IV, o mais característico dos estágios na escala das convulsões, em doses de PTZ subconvulsivantes, enquanto os animais controle e continuamente exposto ao etanol não desenvolveram este estágio. O tempo de duração do estágio IV foi aumentado naquelas animais abstidos por 1 dia, em relação aos abstidos por 8 dias. A maior sensibilidade à convulsão em animais abstidos de etanol pode ser um efeito relacionado à modulação adenosinérgica prejudicada, visto que os receptores  $A_1$  de adenosina possuem menos transcritos nesta condição. Entretanto, a funcionalidade destes receptores parece preservada, visto que a adição de um agonista destes receptores reverteu o desenvolvimento do estágio convulsivo.

Estudos pré-clínicos mostram que até mesmo baixos níveis de exposição fetal ao etanol podem produzir disfunção comportamental na prole (Baley et al., 2020), corroborando com a recomendação de que nenhuma quantidade de etanol é segura durante a gestação. A literatura demonstra efeitos da exposição de etanol no início do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em diferentes concentrações e tempos de exposição com reflexos sobre o controle da excitabilidade neural. Dentre os efeitos estão a supressão da divisão celular e retardo no crescimento neural causando morte celular (Joya et al., 2014), redução de células na formação do hipocampo (Wang et al., 2018), deslocamento assimétrico de neurônios, redução na velocidade migração neuronal (Collier et al., 2019) e redução dependente da dose na captação de glutamato no encéfalo (Baggio et al., 2020).

Os achados em relação aos grupos que receberam etanol no início do desenvolvimento, não indicaram diferenças na frequência de animais ingressando nos diferentes estágios da escala de convulsão, seja na fase larval quanto na fase adulta. Entretanto, na fase larval, aqueles grupos que receberam etanol diferenciaram-se em menor latência em segundos e maior duração para o estágio II, em relação aos controles. A expressão gênica relativa dos receptores  $A_1$  e  $A_2$  de adenosina, bem como da enzima ecto-5'-nucleotidase não foi alterada pela exposição embrionária ao etanol. Desta forma, a exposição empregada nesta investigação, a qual foi de apenas 2h no início do estágio de farínghula, não promove alterações identificáveis na sensibilidade a convulsão, e não parece promover alterações na sinalização adenosinérgica, pelo menos ao que se refere ao número de transcritos dos alvos avaliados.

A expressão precoce e predominante de receptores purinérgicos ao longo do desenvolvimento do SNC sugere que essa sinalização purinérgica é realizada nos diferentes estágios do neurodesenvolvimento quando é conhecido o envolvimento da sinalização purinérgica na proliferação, migração e diferenciação de células precursoras neurais (Menéndez et al., 2020). Nossos resultados demonstraram que a expressão gênica do receptor  $A_1$  de adenosina varia ao longo do desenvolvimento, sendo mais expresso na fase larval do que na fase adulta, embora neste trabalho a fase larval tenha sido avaliada através da expressão total corporal, enquanto na fase adulta, somente o encéfalo tenha sido considerado. Nossos achados também revelam que a ativação dos receptores  $A_1$  de adenosina por meio do CPA causa letargia em concentrações muito altas, assim como em mamíferos, contribuindo para a definição de concentrações adequadas para o uso desta droga em estudos nas diferentes fases de desenvolvimento do peixe-zebra. Ainda, concentrações menores, livres de efeito locomotor, se contrapuseram aos estímulos convulsivos provocados pelo PTZ.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a observação de interferência do etanol nos sistemas neuromodulatórios, como já foi testado em outros modelos, e coloca a adenosina como uma peça-chave nos mecanismos de neurotoxicidade do etanol, afetando diretamente a modulação da atividade neuronal e alterando o limiar convulsivo. Nesse contexto, a manipulação dos receptores purinérgicos poderiam ser alvos farmacológicos terapêuticos potenciais, como por exemplo, através do aumento de adenosina como um agente

terapêutico endógeno por mecanismos eficientes como o controle da expressão de enzimas do metabolismo da adenosina (Boison et al., 2012), estratégias para aumentar as concentrações locais de Adenosina através da transformação metabólica seja pela inibição de Adenosina desaminase (ADA) ou aumento de Adenosina endógena através da Adenosina quinase (ADK) (Matulenko et al., 2007).

Além disso, este trabalho reforça a contribuição do peixe-zebra como animal modelo na investigação de mecanismos de convulsões com potencial translacional, e sua já conhecida utilidade em estudos de investigação farmacológica (Baraban et al., 2005; Bailey et al., 2020, Siebel et al., 2015).

Por fim, este trabalho traz um alerta sobre o consumo abusivo do etanol a fim de evitar o desenvolvimento de patologias evitáveis ao longo do desenvolvimento e na vida adulta.

## Referências Bibliográficas (Capítulos 1 e 5)

1. Alfaro, J. M.; Ripoll-Gómez, J.; Burgos, J. S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *The European journal of neuroscience*, v. 33, n. 7, p. 1252–5, abr. 2011
2. Augusto, E. et al. Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Formation of Adenosine Is Critical for the Striatal Adenosine A2A Receptor Functions. *Journal of Neuroscience*, 2013.
3. Baggio, S., Zenki, K., Martins Silva, A., dos Santos, T. G., Rech, G., Lazzarotto, G., ... de Oliveira, D. L. (2020). Fetal alcohol spectrum disorders model alters the functionality of glutamatergic neurotransmission in adult zebrafish. *NeuroToxicology*.
4. Bailey, C. D. C., Gerlai, R., Cameron, N. M., Marcolin, M. L., & McCormick, C. M. (2020). Preclinical methodological approaches investigating of the effects of alcohol on perinatal and adolescent neurodevelopment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.
5. Barbosa C, Dowd WN, Barnosky A, Karriker-Jaffe KJ. Alcohol Consumption During the First Year of the COVID-19 Pandemic in the United States: Results From a Nationally Representative Longitudinal Survey. *J Addict Med*. 2023 Jan-Feb 01;17(1):e11-e17.
6. Baraban, S. C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and cfos expression. *Neuroscience*, v. 131, n. 3, p. 759–768, 2005.
7. Bertoncello, K. T., & Bonan, C. D. (2021). Zebrafish as a tool for the discovery of anticonvulsant compounds from botanical constituents. *European Journal of Pharmacology*, 908, 174342.
8. Bianchi, V., & Spychala, J. (2003). Mammalian 5'-Nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46195–46198.
9. Boison, D. (2013). Adenosine and Seizure Termination: Endogenous Mechanisms. *Epilepsy Currents*, 13(1), 35–37.5
10. Boison, D. (2016). Adenosinergic signaling in epilepsy. *Neuropharmacology*, 104,

11. Boison, detlev. Adenosine dysfunction in epilepsy. *PMC. Glia*. 2012 Aug;60(8):1234-43.
12. Boronat, S., Vicente, M., Lainez, E., Sánchez-Montañez, A., Vázquez, E., Mangado, L., del Campo, M. (2017). Seizures and electroencephalography findings in 61 patients with fetal alcohol spectrum disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 60(1), 72–78.
13. Bukiya AN, Dopico AM. Fetal Cerebral Circulation as Target of Maternal Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018 Jun; 42(6):1006-1018. Epub 2018 May 9.
14. Bukiya, A. N. (2019). Fetal Cerebral Artery Mitochondrion as Target of Prenatal Alcohol Exposure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(9), 1586.
15. Cacciari B., Pastorin G., Bolcato C., Spalluto G., Bacilieri M., Moro S. Antagonistas dos receptores de adenosina 2B : desenvolvimentos recentes. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2005; 5 : 1053-1060
16. Cachat, J., Canavello, P., Elegante, M., Bartels, B., Hart, P., Bergner, C., ... Kalueff, A. V. (2010). Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 371–376.
17. Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667–685.
18. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) Disponível em: <<https://www.cdc.gov/>>
19. Choi, D.-S., Cascini, M.-G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., ... Messing, R. O. (2004). The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nature Neuroscience*, 7(8), 855–861.
20. Cieślak, M., Wojtczak, A., & Komoszyński, M. (2017). Role of the purinergic signaling in epilepsy. *Pharmacological Reports*, 69(1), 130–138.
21. Clark H. Denny, PhD<sup>1</sup>; Cristian S. Acero, MPH<sup>1,2</sup>; Timothy S. Naimi, MD<sup>3</sup>; Shin Y. Kim, MPH<sup>1</sup> Consumption of Alcohol Beverages and Binge Drinking Among Pregnant Women Aged 18–44 Years — United States, 2015–2017 Weekly / April 26, 2019 /
22. Collier, A. D., Halkina, V., Min, S. S., Roberts, M. Y., Campbell, S. D., Camidge, K., & Leibowitz, S. F. (2019). Embryonic ethanol exposure affects the early development, migration and location of hypocretin/orexin neurons in zebrafish. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.
23. Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., & Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 21(2), 105–128.

24. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator I the nervous system: different roles, diferent sources and different receptors. *Neurochem int.* 2001; 38(2): 107-25
25. Cunha, R. A., Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A., 1992. Ecto-5'-nucleotidase is associated with cholinergic nerve terminals in the hippocampus but not in the cerebral cortex of the rat. *J Neurochem* 59, 657-666
26. Da Silva Chaves, S. N., Felício, G. R., Costa, B. P. D., de Oliveira, W. E. A., Lima-Maximino, M. G., Siqueira Silva, D. H. de, & Maximino, C. (2018). Behavioral and biochemical effects of ethanol withdrawal in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 169, 48–58.
27. De la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuro- pathol.* 2014; 127(1):71-90.
28. Li, Yan, and Hui Wang. "In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress." *Pharmacological research* 49.5 (2004): 467-473
29. Drabwell, L.; Eng, J.; Stevenson, F.; King, M.; Osborn, D.; Pitman, A. Perceptions of the Use of Alcohol and Drugs after Sudden Bereavement by Unnatural Causes: Analysis of Online Qualitative Data. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020, 17, 677. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030677>
30. Dunwiddie, T. V., 1980. Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 21, 541-548.
31. Förstera B, Castro PA, Moraga-Cid G, Aguayo LG (2016). Potentiationof gamma aminobutyric acid receptors (GABAAR) by ethanol: howare inhibitory receptors affected? *Front Cell Neurosci.* 10: 114.
32. Fredholm B.B., AP I.J., Jacobson K.A., Linden J., Muller C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—*An update. Pharmacol. Rev.* 2011;63:1–34
33. Fredholm BB; Chen JF; Cunha RA; Svenningsson P; Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology.* 2005;63(1):191-270.
34. Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:1165–1172
35. Garcia, L. P., & Sanchez, Z. M.. (2020). Consumo de álcool durante a pandemia da COVID-19: uma reflexão necessária para o enfrentamento da situação. *Cadernos De Saúde Pública*, 36(10), e00124520. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00124520>
36. Gerlai, R. (2014). Fish in behavior research: Unique tools with a great promise! *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 54–58.

37. Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M., & Cunha, R. A. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: *Neuroprotection and neurodegeneration. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(5), 1380–1399.
38. Grant KA, Lovinger DM. Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes. *Clin Neurosci* 1995;3:155–164.
39. Gulya K, Grant KA, Valverius P, et al. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991;547: 129–134
40. Haab Lutte, A., Huppés Majolo, J., Reali Nazario, L. & Da Silva, R. S. Early exposure to ethanol is able to affect the memory of adult zebrafish: Possible role of adenosine. *Neurotoxicology* 69, 17–22.
41. Haab Lutte, A., Huppés Majolo, J., Reali Nazario, L., & Da Silva, R. S. (2018). Early exposure to ethanol is able to affect the memory of adult zebrafish: possible role of adenosine. *NeuroToxicology*.
42. Hendler, R.A., Ramchandani, V.A., Gilman, J., Hommer, D.W. (2011). Stimulant and Sedative Effects of Alcohol. In: Sommer, W., Spanagel, R. (eds) Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction. Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg.
43. Hoffman PL, Rabe CS, Grant KA, Valverius P, Hudspith M, Tabakoff B(1990). Ethanol and the NMDA receptor. *Alcohol* 7: 229–231
44. Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503 (2013).
45. Hughes, V., Richardson, M. J. E., & Wall, M. J. (2018). Acute ethanol exposure has bidirectional actions on the endogenous neuromodulator adenosine in rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology*, 175(9), 1471–1485.
46. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional da Saúde do Escolar 2015. Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/educacao/9134-pesquisa-nacional-de-saude-do-escolar.html?=&t=destaques>
47. Jeon, S.J.; Rhee, S.Y.; Ryu, J.H.; Cheong, J.H.; Kwon, K.; Yang, S.I.; Park, S.H.; Lee, J.; Kim, H.Y.; Han, S.H.; et al. Activation of adenosine A2A receptor up-regulates BDNF expression in rat primary cortical neurons. *Neurochem. Res.* 2011, 36, 2259–2269.
48. Joya, X., Garcia-Algar, O., Vall, O., & Pujades, C. (2014). Transient Exposure to Ethanol during Zebrafish Embryogenesis Results in Defects in Neuronal Differentiation: An Alternative Model System to Study FASD. *PLoS ONE*, 9(11), e112851.
49. Kaiser, S.M., Quinn, R.J., 1999. Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discov. Today* 4 (12), 542–551

50. Kalueff, A. V., Echevarria, D. J., & Stewart, A. M. (2014). Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 1–6.
51. Kiese, K., Jablonski, J., Boison, D., & Kobow, K. (2016). Dynamic Regulation of the Adenosine Kinase Gene during Early Postnatal Brain Development and Maturation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9.
52. Kundap, U. P. et al. Zebrafish as a Model for Epilepsy-Induced Cognitive Dysfunction: A Pharmacological, Biochemical and Behavioral Approach. *Frontiers in pharmacology*, v. 8, p. 515, 2017.
53. Li Y, Wang H. In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral
54. Littleton, J. M., Lovinger, D., Liljequist, S., Ticku, R., Matsumoto, I., & Barron, S. (2001). Role of Polyamines and NMDA Receptors in Ethanol Dependence and Withdrawal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(s1), 132S–136S.
55. Lutte, A. H., Nazario, L. R., Majolo, J. H., Pereira, T. C. B., Altenhofen, S., da Silva Dadda, A., ... Da Silva, R. S. (2018). Persistent increase in ecto-5'-nucleotidase activity from encephala of adult zebrafish exposed to ethanol during early development. *Neurotoxicology and Teratology*.
56. Mattson, S. N., Crocker, N., & Nguyen, T. T. (2011). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Neuropsychological and Behavioral Features. *Neuropsychology Review*, 21(2), 81–101.
57. Matulenko, M. A., Paight, E. S., Frey, R. R., Gomtsyan, A., DiDomenico, S., Jiang, M., ... Bhagwat, S. S. (2007). 4-Amino-5-aryl-6-arylethynylpyrimidines: Structure–activity relationships of non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(4), 1586–1605.
58. Meghji, P., Newby, A. C., 1990. Sites of adenosine formation, action and inactivation in the brain. *Neurochem Int* 16, 227-232.
59. Menéndez Méndez, A., Smith, J., & Engel, T. (2020). Neonatal Seizures and Purinergic Signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7832.
60. Michaelis EK, Freed WJ, Galton N, et al. Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem Res* 1990;15:1055–1063
61. Mihic SJ (1999). Acute effects of ethanol on GABAA and glycinereceptor function. *Neurochem Int* 35: 115–123.
62. Mottahedin, A. Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Front. Cell Neurosci.* 2017, 11, 190.
63. Möykkynen T, Korpi ER (2012). Acute effects of ethanol on glutamatereceptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 111: 4–13

64. Mussulini, B. H. M. et al. Seizures induced by pentylene-tetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PloS one*, v. 8, n. 1, p. e54515, jan. 2013.
65. Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S. Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Comm*. 2005; 334:1343-50.
66. Nam, H. W., Lee, M. R., Zhu, Y., Wu, J., Hinton, D. J., Choi, S., ... Choi, D.-S. (2011). Type 1 Equilibrative Nucleoside Transporter Regulates Ethanol Drinking Through Accumbal N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling. *Biological Psychiatry*, 69(11), 1043-1051
67. Olsen, R. W., and J. Liang. 2017. "Role of Gaba." *Mol Brain* 10, no. 1 (09 20): 45.
68. OMS - WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mental Health, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>>
69. R. Gerlai; D. Chatterjee; T. Pereira; T. Sawashima; R. Krishnannair (2009). Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. , 8(6), 586–599.
70. Rakhade, S.N.; Jensen, F.E. Epileptogenesis in the immature brain: Emerging mechanisms. *Nat. Rev. Neurol.* 2009, 5, 380–391.
71. Ramlan, N.F.; Sata, N.S.A.M.; Hassan, S.N.; Bakar, N.A.; Ahmad, S.; Zulkifli, S.Z.; Abdullah, C.A.C.; Ibrahim, W.N.W. Time dependent effect of chronic embryonic exposure to ethanol on zebrafish: Morphology, biochemical and anxiety alterations. *Behav. Brain Res.*, 2017, 332, 40-49.
72. Rathlev, N. K., Ulrich, A. S., Delanty, N., & D'Onofrio, G. (2006). Alcohol-related seizures. *The Journal of Emergency Medicine*, 31(2), 157–163
73. Ribeiro, F.F.; Neves-Tome, R.; Assaife-Lopes, N.; Santos, T.E.; Silva, R.F.; Brites, D.; Ribeiro, J.A.; Sousa, M.M.; Sebastiao, A.M. Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. *Brain Struct. Funct.* 2016, 221, 2777–2799.
74. Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Senger, M. R., Arizi, M. de B., Dias, R. D., Souto, A. A., Bonan, C. D. (2008). Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochemistry International*, 52(1-2), 290-296.
75. Rivkees, S. A., & Wendler, C. C. (2017). Long-term consequences of disrupting adenosine signaling during embryonic development. *Molecular Aspects of Medicine*, 55, 110–117.
76. Rivkees, S. A., Zhao, Z., Porter, G., & Turner, C. (2001). Influences of Adenosine on the Fetus and Newborn. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(1-2), 160–171

77. Rodrigues, R. J., Marques, J. M., & Cunha, R. A. (2018). Purinergic signalling and brain development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*
78. Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1995;283:177–183
79. Ruby, L. christina; ADAMS, chelsea; KNIGHT, J. emily; NAM, W. hyung; CHOI, doo-sup. An Essential Role for Adenosine Signaling in Alcohol Abuse. *Curr Drug Abuse Rev.* 2010 September ; 3(3): 163–174.
80. Russo, E., Citraro, R., De Fazio, S., Torcasio, G., De Sarro, G., & Di Paola, E. D. (2008). Effects of ethanol on the development of genetically determined epilepsies in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(7), 739–744.
81. S da Silva, Rosane, Carla D Bonan, and Monica RM Vianna. "Zebrafish as a Platform for Studies on Seizures and Epilepsy." *Current Psychopharmacology* 5.2 (2016): 211-220.
82. Sachdeva, S., & Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(3), 245–253.
83. Sattler ,R, Rothstein, J. D., 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 277-303
84. Sharma, R., Engemann, S. C., Sahota, P., & Thakkar, M. M. (2010). Effects of Ethanol on Extracellular Levels of Adenosine in the Basal Forebrain: An In Vivo Microdialysis Study in Freely Behaving Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(5), 813–818.
85. Siebel AM, Menezes FP, Capiotti KM, Kist LW, da Costa Schaefer I, Frantz JZ, Bogo MR, Da Silva RS, Bonan CD (2015). Role of adenosine signaling on pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. *Zebrafish*.12(2):127-36
86. Skagerström, J., Chang, G., & Nilsen, P. (2011). Predictors of Drinking During Pregnancy: A Systematic Review. *Journal of Women's Health*, 20(6), 901–913.
87. Stewart, A. M. et al. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? *Brain research bulletin*, v. 87, n. 2–3, p. 135–43, 10 fev. 2012.
88. Stratton, K., Howe, C., and Battaglia, F. (eds.) Fetal Alcohol Syndrome: Diagnosis, Epidemiology, Prevention, and Treatment. *The Institute of Medicine Report*. Washington, DC, National Academy Press, 1996.
89. Streissguth A, Barr H, Kogan J, Bookstein F. Primary and secondary disabilities in fetal alcohol syndrome. University of Washington Press; Seattle: 1997;25-39.
90. Tambour, S. & Quertemont, E. (2007) Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *Fundam Clin Pharmacol* 21, 9– 28.
91. Tran, Steven; Chatterjee, Diptendu; Gerlai, Robert (2015). An integrative analysis of ethanol tolerance and withdrawal in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 276(), 161–170.

92. Trudell JR, Messing RO, Mayfield J, Harris RA. Alcohol dependence: molecular and behavioral evidence. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35 (7): 3
93. Turner, C. P., Yan, H., Schwartz, M., Othman, T., & Rivkees, S. A. (2002). A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Neuroreport*, 13(9), 1199–1204.
94. V Vengeliene; A Bilbao; A Molander; R Spanagel (2008). *Neuropharmacology of alcohol addiction.* , 154(2), 299–315.
95. Velisek L, Kusa R, Kulovana M, Mares P (1990) Excitatory amino acid antagonists pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis. I: The effects of 2-amino-7-phosphonoheptanoate. *Life Sci* 46:1349 –1357.
96. Velisek L, Veresova S, Pobisova H, Mares P (1991) Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis. II: The effects of MK-801. *Psychopharmacology (Berl)* 104:510 –514.
97. Wang, K., Chen, X., Liu, J., Zou, L.-P., Feng, W., Cai, L., ... Chen, S. (2018). Embryonic exposure to ethanol increases the susceptibility of larval zebrafish to chemically induced seizures. *Scientific Reports*, 8(1).
98. Wei, C. J., Li, W., & Chen, J.-F. (2011). Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(5), 1358–1379.
99. Weltha L, Reemmer J, Boison D. The role of adenosine in epilepsy. *Brain Res Bull.* 2019 Sep;151:46-54. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.008. Epub 2018 Nov 20

# Anexos

## Anexo A - Homologação do projeto e aprovação CEUA

---



ESCOLA DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE E DA VIDA

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Porto Alegre, 16 de setembro de 2019.

### HOMOLOGAÇÃO PROJETO DE PESQUISA

Prezada Profa. Rosane,

Informo que, em 16 de setembro de 2019 o Projeto de Pesquisa da aluna de mestrado Giovanna Trevisan Couto, intitulado "Investigação do papel da Adenosina na suscetibilidade a crises convulsivas induzidas pela exposição ao etanol no início do desenvolvimento", sob sua orientação, foi APROVADA pela Comissão Examinadora, composta pelas professoras Mônica Ryff Moreira Vianna e Profa. Patrícia Fernanda Schuck, e homologado, ad referendum, pela Comissão Coordenadora.

Para que o projeto seja avaliado pela Comissão Científica é necessário que o orientador realize o cadastro no SIPESQ e após a avaliação, a carta de aprovação estará disponível nesse sistema.

Somente projetos que estiverem cadastrados no SIPESQ serão avaliados pela Comissão Científica e, posteriormente, pelos Comitê de Ética em Pesquisa – CEP e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

Atenciosamente,

**Cristiano Valim Bizarro**  
Coordenador  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular



# SIPESQ

## Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9570

Porto Alegre, 22 de novembro de 2019

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA SUSCEPTIBILIDADE A CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL NO INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO" coordenado por ROSANE SOUZA DA SILVA.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 22/11/2019 - 22/12/2020

Nº de Animais	Espécie
2162	Danio rerio
Total de Animais: 2162	

## Anexo B - Trabalho realizado durante o curso que não compõe a tese



### ORIGINAL ARTICLE

## Prevalence and factors associated with no intention to exclusively breastfeed for the first 6 months of life<sup>☆</sup>



Rita Mattiello , Aline Kotoski , Camila Ospina Ayala , Carine Lucena Recha ,  
Carolina Villanova Quiroga , Cátia Regina Machado ,  
Cristiano de Oliveira Roxo , Fernanda Hammes Varela ,  
Giovanna Trevisan Couto , Gisele Cassão , Jéssica Blatt Lopes ,  
João Ismael Budelon Gonçalves , Juliana Fernandes da Silva ,  
Mariana Barth de Barh , Natalie Duran Rocha ,  
Nathalia Saraiva de Albuquerque , Ricardo Arlindo Dalla Corte ,  
Rossana Bernardes , Samanta Andresa Richter , Tainá Rossi , Ina S. Santos \*

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Escola de Medicina, Programa Pós-graduação Pediatria e Saúde da Criança, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 12 January 2021; accepted 19 February 2021  
Available online 26 March 2021

### KEYWORDS

Breastfeeding;  
Exclusive  
breastfeeding;  
Postpartum period;  
Intention

### Abstract

**Objective:** To investigate the prevalence and factors associated with no intention to exclusively breastfeed for the first 6 months of life in a sample of women in the first 24 h postpartum during the hospital stay.

**Methods:** Cross-sectional study with data from screening phase of a birth cohort. The proportion of mothers who did not intend to breastfeed exclusively for 6 months (primary outcome) derived from a negative response to the question "Would you be willing to try to breastfeed exclusively for the first 6 months?", in an interview conducted by previously trained interviewers. Crude and adjusted prevalence ratios (PR) with 95% confidence intervals were obtained by Poisson regression with robust variance.

**Results:** A total of 2964 postpartum women were interviewed. The overall prevalence of mothers who did not intend to breastfeed exclusively for 6 months was 17.8% (16.4–19.1%). After adjusting for maternal age and type of pregnancy (singleton or multiple), no intention to exclusively breastfeed was higher in mothers with a monthly household income < 3 minimum wages

# Anexo C – Comprovante de submissão do Manuscrito 1 (Cap.2)

ScholarOne Manuscripts™ Rosane Da Silva Instructions & Forms Help Log Out

## Zebrafish

Home Author Review

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- Start New Submission >
- Legacy Instructions >
- 5 Most Recent E-mails >

## Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Ekker, Stephen	ZEB-2023-0002	Functioning and gene expression of adenosine A1 receptor during zebrafish (Danio rerio) development <a href="#">View Submission</a>	11-Jan-2023	19-Jan-2023
• Under Review				

[Contact Journal](#)



# Anexo D – Comprovante de submissão do Manuscrito 2 (cap.3)

researcher.nature.com

SPRINGER NATURE  
SNAPP

My account

## Your submissions

### Track your submissions

**What do we know about the sleep effects of caffeine given to treat apnea of prematurity? A Systematic Review of the Literature**

Corresponding Author: Rosane Souza Da Silva  
*Molecular and Cellular Pediatrics*  
995ba9be-48ca-483a-868b-ed5a80309aa9 | v.1.0

[View submission details](#)

**Technical check passed** 27 Feb 23

Ready to be assigned to an editor.

**Anticonvulsant role of adenosine is blunted during alcohol withdrawal syndrome in an adult zebrafish model**

Corresponding Author: Rosane Souza Da Silva  
*Neurochemical Research*  
41e6a0aa-0167-4701-a961-93b6948f8ca6 | v.1.0

[View submission details](#)

**Revision requested** 22 Feb 23

An email has been sent to [rosanesouzadasilva@gmail.com](mailto:rosanesouzadasilva@gmail.com) with more details.  
To support the continuity of the peer review process, please return your revision within 14 days

[Submit revision](#)

If you have submitted any articles to us via any other submissions system, e.g. Editorial Manager or eJournalPress, please log in to, or use notification emails from that system for article tracking information. Still have a question? [Contact us](#)

[Give Feedback](#)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo  
Porto Alegre – RS – Brasil  
Fone: (51) 3320-3513  
E-mail: [propesq@pucrs.br](mailto:propesq@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)

