



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOTELE FONTANA AGOSTINI BERTELI

**ESTUDO DE EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO ÁCIDO GÁLICO NA REVERSÃO DE
LESÕES NEUROQUÍMICAS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
PELA EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO ETANOL EM CÉREBRO DE PEIXE-
ZEBRA**

Recife
2021

JOTELE FONTANA AGOSTINI BERTELI

**ESTUDO DE EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO ÁCIDO GÁLICO NA REVERSÃO DE
LESÕES NEUROQUÍMICAS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
PELA EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO ETANOL EM CÉREBRO DE PEIXE-
ZEBRA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Coorientador Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

B537e Berteli, Jotele Fontana Agostini.
Estudo de eficácia pré-clínica do ácido gálico na reversão de lesões neuroquímicas e alterações comportamentais induzidas pela exposição prolongada ao etanol em cérebro de peixe-zebra / Jotele Fontana Agostini Berteli.– 2021.
75 f: il.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Ácido gálico. 2. Etanol. 3. Estresse Oxidativo. 4. Comportamento. 5. Sistema colinérgico. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-166)

JOTELE FONTANA AGOSTINI BERTELI

**ESTUDO DE EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO ÁCIDO GÁLICO NA REVERSÃO DE
LESÕES NEUROQUÍMICAS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
PELA EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO ETANOL EM CÉREBRO DE PEIXE-
ZEBRA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 09/07/2021.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wilson da Costa Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Germana Freire Rocha Caldas (Examinadora Externa)
Centro Universitário Dr. Leão Sampaio

Prof^a. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Pernambuco, bem como, todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela ajuda e apoio ao longo do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha colega de laboratório Gláucia Dal Santo pela amizade e parceria que levarei eternamente no meu coração.

Aos engenheiros Josef (marido da Gláucia) e Jankiel (meu marido) por organizarem toda a estrutura hidráulica e elétrica necessária para os experimentos.

À equipe do Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Samira, Henrique e Ana Caroline) por toda ajuda e dedicação nos experimentos de comportamento.

Ao meu orientador professor Almir Gonçalves Wanderley por ter me recebido com carinho em seu laboratório e por ter aceitado trabalhar com o peixe-zebra. Obrigado pela confiança e por tantos ensinamentos farmacológicos. Foi uma honra ser sua aluna.

Ao meu coorientador professor Eduardo Pacheco Rico por ter me dado a oportunidade de crescer em conhecimento. Obrigado por toda dedicação, amizade e confiança. Serei eternamente grata.

Aos meus pais, José e Tere, por não medirem esforços para me ver feliz. Por me mostrarem desde a infância que a constante busca do conhecimento me tornaria melhor.

Ao meu marido Jankiel por todo amor, carinho e companheirismo que tem me dedicado ao longo dos nossos 15 anos de casados e por incentivar as minhas escolhas.

Aos meus filhos Pedro e Lucas por me inspirarem e impulsionarem a ser melhor a cada dia. Meus presentes de Deus.

À Deus porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

RESUMO

A implicação do estresse oxidativo na toxicidade do etanol está associado a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante seu metabolismo e na redução do potencial antioxidante. O ácido gálico (AG) é um composto polifenólico com ação antioxidante. Neste contexto, o estudo investigou a eficácia pré-clínica do AG *per se* e sobre as alterações neuroquímicas e comportamentais em tecido cerebral de peixe-zebra exposto ao etanol. Para análise do AG *per se*, os animais foram divididos em oito grupos: os que foram expostos por 24 e 48h (controle e AG 5, 10 e 20 mg/L). Após, os animais foram divididos em quatro grupos: controle, exposto ao etanol 0,5% por 7 dias e 24h após na presença de AG 5 e 10 mg/L. No final do período de exposição, os animais passaram por teste comportamental locomotor/exploratório e ansiolítico-símile por meio dos testes *novel tank* e claro/escuro, em seguida foram submetidos a eutanásia e o cérebro total dissecado para as análises bioquímicas: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), grupamentos sulfidril (SH), oxidação de diclorofluoresceína (DCFH), os níveis de nitrato e nitrito, glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE). Os resultados mostraram que, o grupo AG 20 mg/L nos dois tempos testados, induziram aumento nos níveis de TBA-RS, SH, DCFH, da atividade exploratória dos animais no teste *novel tank* e diminuição da atividade da AChE. Os grupos AG 5 e 10 mg/L, independente do tempo de exposição, induziram aumento da atividade da SOD e CAT e não alteraram os demais parâmetros avaliados. Após a exposição ao etanol, foi verificado que o AG 5 e 10 mg/L reverteram os danos gerado pelo etanol nos níveis de TBA-RS, DCFH, na atividade da SOD, na perda cinética da enzima ChAT, bem como recuperou a característica tipo ansiolítica gerada pelo etanol verificado no teste comportamental. Em conclusão, o estudo demonstrou que a exposição ao AG 20 mg/L confere um caráter tóxico ao cérebro de peixe-zebra verificado por meio do perfil pró-oxidante, comportamental e colinérgico. Além disso, que o AG 5 e 10 mg/L reverteram as alterações comportamentais e colinérgicas geradas pelo etanol possivelmente associadas a sua ação antioxidante.

Palavras-chave: ácido gálico; etanol; estresse oxidativo; comportamento; sistema colinérgico.

ABSTRACT

The oxidative stress implication on ethanol toxicity is associated with reactive oxygen species (ROS) formation during their metabolism and in the antioxidant potential reduction. Gallic acid (AG) is a polyphenolic compound with antioxidant action. In this context, the study investigated the preclinical efficacy of GA *per se* and on neurochemical and behavioral changes in brain tissue from zebrafish exposed to ethanol. For AG analysis *per se*, the animals were divided into eight groups: those that were exposed for 24 and 48 hours (control and AG 5, 10 and 20 mg/L). Subsequently, the animals were divided into four groups: control, exposed to 0.5% ethanol for 7 days and 24 hours after in the presence of AG 5 and 10 mg/L. At the end of the exposure period, the animals underwent locomotor/exploratory and anxiolytic-like behavioral tests through novel tank and light/dark tests, after which they were euthanized and the whole brain dissected for biochemical analyzes: levels of thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS), sulfhydryl groups (SH), dichlorofluorescein oxidation (DCFH), nitrate and nitrite levels, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, acetyltransferase choline (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) activity. The results showed that, the AG 20 mg/L group in the two tested times, induced an increase in the TBA-RS, SH, DCFH levels, increase in exploratory activity of animals in the novel tank test and a decrease in the AChE activity. The concentrations of 5 and 10 mg/L, regardless of exposure time, showed an increase in SOD and catalase activity and showed no changes in the other parameters evaluated. Regarding the results after exposure to ethanol, it was found that GA in the 5 and 10 mg / L concentrations reversed the damage generated by ethanol on TBA-RS levels, DCFH oxidation and SOD activity, in the kinetic damage of the ChAT enzyme, as well as recovering the type characteristic anxiolytic generated by ethanol verified in the behavioral test. In conclusion, the study demonstrated that exposure to AG 20 mg/L confers a toxic character to the zebrafish brain, verified through the pro-oxidant, behavioral and cholinergic profile. Furthermore, that AG 5 and 10 mg/L reverse the behavioral and cholinergic damage generated by ethanol possibly associated with its antioxidant action.

Key-words: gallic acid; ethanol; oxidative stress; behavior; cholinergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do metabolismo hepático e cerebral do etanol	17
Figura 2 -	Representação da sinalização colinérgica	20
Figura 3 -	Representação de fontes endógenas de espécies reativas e sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	22
Figura 4 -	Estrutura química do ácido gálico	24
Figura 5 -	Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	27
Figura 6 -	Protocolo experimental de exposição ao ácido gálico	31
Figura 7 -	Protocolo de exposição ao etanol e ácido gálico	32
Figura 8 -	Representação das dimensões e zonas determinadas no aparato utilizado no teste <i>novel tank</i>	33
Figura 9 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila (A) e os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS; B) em cérebro total de peixe-zebra	39
Figura 10 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre a oxidação de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH; A) e os níveis de nitratos e nitritos (B) em cérebro total de peixe-zebra	40
Figura 11 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD; A), catalase (B) e sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH; C) em cérebro total de peixe-zebra	41
Figura 12 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre a distância percorrida (A), velocidade média (B) e número de cruzamentos (C) no aparato <i>novel tank</i>	42
Figura 13 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre o tempo imóvel (A), episódios de freezing (B), tempo na parte superior (C), entradas na parte superior (D), tempo na parte inferior (E) e entradas na	43

	parte inferior (F) no aparato <i>novel tank</i>	
Figura 14 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre o número de cruzamentos (A) e tempo na área clara (B) no teste claro/escuro	44
Figura 15 -	Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h sobre a atividade das enzimas colinérgicas acetilcolinesterase (AChE; A) e colina acetiltransferase (ChAT; B) em cérebro total de peixe-zebra	44
Figura 16 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre a atividade das enzimas colinérgica acetilcolinesterase (AChE; A) e colina acetiltransferase (ChAT; B) em cérebro total de peixe-zebra	45
Figura 17 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre a distância percorrida (A) e velocidade média (B) no aparato <i>novel tank</i>	46
Figura 18 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre o tempo imóvel (A), episódios de freezing (B), tempo na parte superior (C), entradas na parte superior (D), tempo na parte inferior (E) e entradas na parte inferior (F) no aparato <i>novel tank</i>	47
Figura 19 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre o número de cruzamentos (A) e tempo na área clara (B) no teste claro/escuro	48
Figura 20 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS; A) e o conteúdo de grupamentos sulfidríla (B) em cérebro total de peixe-zebra	48
Figura 21 -	Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre a oxidação de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH; A) e os níveis de nitratos e nitritos (B) em cérebro total de peixe-zebra	49

Figura 22 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 50 50
10 mg/L após exposição ao etanol sobre a atividade das
enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD; A), catalase
(B) e sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH; C) em
cérebro total de peixe-zebra

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-PDS	4'4 ditiopiridona
4-TP	4-tiopiridona
6-OHDA	6-hidroxidopamina
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AcSCh	iodeto de acetilcolina
ADH	álcool desidrogenase
ADP	adenosina difosfato
AG	ácido gálico
ALDH	aldeído desidrogenase
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barreira hematoencefálica
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChAT	colina acetiltransferase
CH ₃ CHOH	radical hidroxietil
CoA	coenzima A
COX 1 e 2	ciclo-oxigenase 1 e 2
DAG	diacilglicerol
DCF-DA	diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DCFH - 2,7	diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTNB	ácido ditionitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	ácido gama-aminobutírico

GCL	γ-glutamilcisteína ligase
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona reduzida
GST	glutathiona-S-transferase
LPS	lipopolissacarídeo
MEOS	sistema microsomal de oxidação do etanol
NAD ⁺	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NADP ⁺	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NaOH	hidróxido de sódio
NMDA	N-metil D-aspartato
NOX	NADPH oxidase
PBS	tampão fosfato-salina
pH	potencial hidrogeniônico
Pi	fosfato inorgânico
RNA	ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
SH	grupo tiol
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TNB	2-nitro-5-tiobenzóico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	ETANOL	16
2.2	NEUROQUÍMICA	18
2.2.1	Sistema Colinérgico	19
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	21
2.4	ÁCIDO GÁLICO	24
2.5	PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
4.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	32
4.3.1	Avaliação da atividade exploratória e locomotora com o teste <i>novel tank</i>	32
4.3.2	Avaliação do perfil ansiolítico-símile com o teste claro/escuro	33
4.4	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	34
4.4.1	Homogeinização dos tecidos	34
4.4.2	Níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)	34
4.4.3	Conteúdo de grupos sulfidríla	34
4.4.4	Oxidação de DCFH	35
4.4.5	Níveis de nitratos e nitritos	35
4.4.6	Atividade da SOD	35
4.4.7	Atividade da catalase	36
4.4.8	Níveis de glutatona (GSH) reduzida	36
4.5	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DO SISTEMA COLINÉRGICO	37
4.5.1	Atividade da ChAT	37

4.5.2	Atividade da AChE	37
4.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA	39
5.2	AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA EXPOSTO DE FORMA PROLONGADA AO ETANOL	45
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NEUROSCIENCE	73
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (UFPE)	74
	ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (UNESC)	75

1 INTRODUÇÃO

O etanol é uma substância lícita cujo consumo excessivo está relacionado a doenças como cardiomiopatia e arritmia cardíaca, esteatose, cirrose hepática, pancreatite e cânceres hepático, cerebral, do pescoço e da cavidade oral (WHO, 2018). O etanol é uma molécula facilmente distribuída na corrente sanguínea e absorvida pelo trato gastrointestinal que por meio da circulação portal chega ao fígado onde é metabolizado (PENG, 2009). O acetaldeído, produto do metabolismo hepático do etanol, e o próprio etanol são moléculas simples que atravessam facilmente as membranas celulares, inclusive a barreira hematoencefálica (BHE), alterando a química cerebral e desta forma, o comportamento. A implicação do estresse oxidativo na toxicidade do etanol está associado a formação de espécies reativas de oxigênio durante seu metabolismo e na influência do etanol e seus metabólitos na diminuição do potencial antioxidante (COMPORTI et al., 2010).

A busca pelo entendimento de compostos naturais com propriedades antioxidantes vem se tornando alvo de estudos. O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um composto fenólico derivado do metabolismo secundário de plantas por meio da via do ácido chiquímico (BADHANI et al., 2015). Possui uma estrutura composta de um anel aromático com três grupos hidroxila (OH) e um grupo carboxila (COOH), onde a formação estrutural fenólica em arranjos planares conferem a propriedade de eliminação de radicais livres ao ácido gálico (SROKA; CISOWSKI, 2003). Um estudo de MONU YADAV et al. (2018) em cérebro de ratos com psicose induzida por cetamina, demonstrou efeitos neuroprotetores associados a ação antioxidante do ácido gálico. Adicionalmente, ABDEL-MONEIM et al. (2017) observaram que o ácido gálico inibiu a neurodegeneração hipocampal em ratos com Diabetes tipo 2 devido a suas propriedades antioxidantes.

O peixe-zebra, conhecido também como paulistinha ou *zebrafish*, foi introduzido na pesquisa biomédica pela primeira vez em 1981 por George Streisinger. O genoma do peixe-zebra está totalmente sequenciado e possui uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano (BARBAZUK et al., 2000; STERN; ZON, 2003). Sua aplicabilidade como modelo animal em estudos científicos vem sendo expandida para diversas áreas do conhecimento, tais como bioquímica, neurociência, farmacologia, toxicologia e comportamento, devido a semelhança com os sistemas de neurotransmissores, estrutura encefálica, padrões

comportamentais, organização e funcionamento de seu sistema regulador de estresse (HOWE et al., 2013; DAL SANTO et al., 2014; KALUEFF et al., 2017). Outro aspecto importante que contribui para a utilização deste modelo é o fato de que esta espécie absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais, o sistema nervoso central (BLANK et al., 2009; YANG et al., 2009).

1.1 JUSTIFICATIVA

Há evidências que os efeitos nocivos no cérebro, devido ao consumo de etanol, estejam relacionados a capacidade do etanol modular uma série de mecanismos e vias, como alterações nos sistemas de neurotransmissão e ativação de vias pró-oxidantes, que podem levar a alterações comportamentais. Sabe-se que o ácido gálico possui uma ação antioxidante e até o momento nada há descrito na literatura a respeito de seu efeito em cérebro de peixe-zebra. Desta forma, este trabalho teve o intuito de demonstrar os efeitos do ácido gálico no cérebro do peixe-zebra, bem como, de analisar sua capacidade de reverter os efeitos neurotóxicos do etanol. Considerando que o peixe-zebra possui receptores e enzimas do sistema nervoso central previamente descritos e que possui defesas antioxidantes semelhantes a dos mamíferos, este peixe se torna um importante e consolidado modelo experimental para este estudo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ETANOL

O etanol é uma substância psicoativa, obtido por meio de fermentação, utilizado em muitas culturas em rituais festivos e religiosos durante séculos (MCGOVERN, 2009). Com a Revolução Industrial, pôde ser observado um grande aumento na oferta e, conseqüentemente, na popularidade do consumo de bebidas alcoólicas, principalmente porque estas, antes produzidas artesanalmente, passaram a ser feitas por técnicas e em escala industrial devido ao advento do processo de destilação (GOUVEIA et al., 2009). Com isso, o padrão de consumo do etanol vem mudando ao longo dos anos e o seu uso nocivo é um dos fatores de risco de maior morbidade, mortalidade e incapacidades em todo o mundo (WHO, 2018).

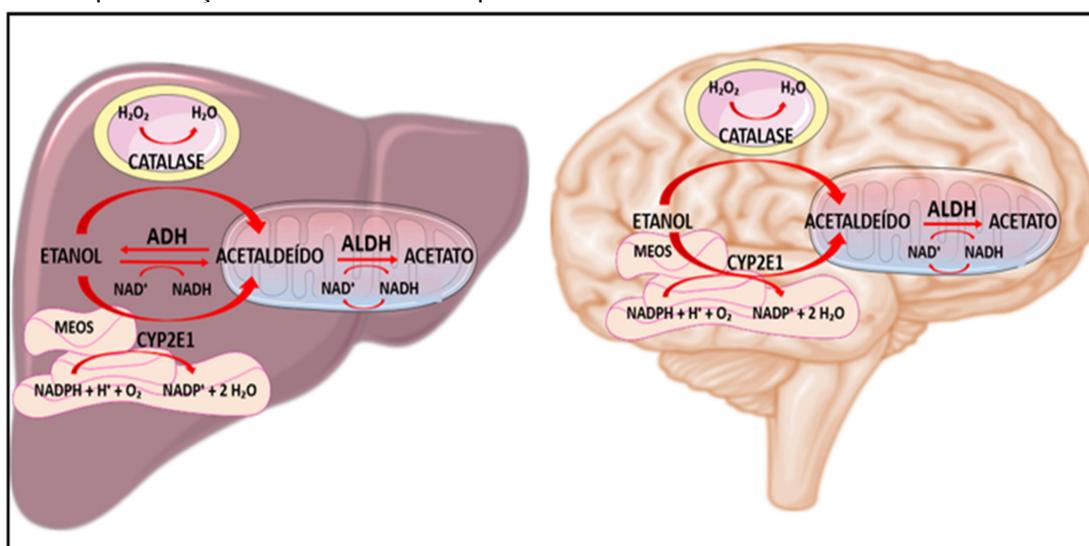
Estudos têm demonstrado que o consumo de etanol é fator importante na patogenia de diversas doenças como insuficiência cardíaca congestiva (RALEVSKI et al., 2019), infarto do miocárdio (GOEL et al., 2018), hipertensão (YEDLAPATI et al., 2016; PUDDEY et al., 2019), diabetes (KNOTT et al., 2015; TETZSCHNER et al., 2018), câncer colorretal (BAGNARDI et al., 2015), câncer de mama (BAGNARDI et al., 2001), câncer gástrico (TRAMACERE et al., 2012; NA; LEE, 2017) e principalmente câncer hepático (CAO; GIOVANNUCCI, 2016; GANNE-CARRIÉ; NAHON, 2019). Ademais, o consumo crônico do etanol tem efeitos tóxicos e degenerativos sobre o sistema nervoso central (SNC), impactando na saúde do indivíduo, seu comportamento e a capacidade de interação social (NIAAA, 2019).

O etanol é uma molécula facilmente distribuída na corrente sanguínea para a maioria dos órgãos e sistemas devido a sua alta solubilidade. A maior parte do etanol consumido (cerca de 90%) é absorvido pelo trato gastrointestinal e transportado por meio da circulação portal ao fígado onde é oxidado (PENG, 2009). No hepatócito, há três vias metabólicas com a capacidade de oxidação do etanol em acetaldeído: via enzima álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) na matriz citoplasmática, via enzima catalase nos peroxissomos e via do sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso (QUERTEMONT et al., 2005) (Figura 1).

A enzima ADH é a principal via metabólica de oxidação do etanol em acetaldeído nos hepatócitos (PANG, 2003). Nesta via ocorre a transferência de íons

de hidrogênio do etanol para o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD^+), sendo convertido para sua forma reduzida NADH (PAQUOT, 2019). A ADH possui quatro isoformas (I, II, III e IV) sendo que a ADH I é uma variante de maior eficiência na oxidação do etanol em humanos (LEE et al., 2006). Estudos têm demonstrado que a ADH difere de indivíduo para indivíduo, e que este polimorfismo está relacionado ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas e no desenvolvimento da doença hepática (LEE et al., 2006; HASEBA et al., 2012).

Figura 1: Representação do metabolismo hepático e cerebral do etanol



Fonte: A autora (2021)

O etanol é também metabolizado pela catalase, uma enzima que possui grupamentos heme em sua estrutura e expressa particularmente nos peroxissomos (KARAHANIAN et al., 2011). Comumente esta enzima catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, mas também pode catalisar a redução de peróxido de hidrogênio para água se doadores de elétrons estiverem presentes (reação peroxidativa) (RHOADS et al., 2012). O etanol, que atua como um doador de elétrons, é oxidado a acetaldeído por meio da reação peroxidativa da catalase. O peróxido de hidrogênio necessário para a reação é produzido pela oxidação do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADPH) pela enzima NADPH oxidase (NOX; EC 1.6.3.1) presente no sistema microsomal (KARAHANIAN et al., 2011). O MEOS é um complexo enzimático, composto pelo citocromo P450 (EC 1.14.14.1) na sua isoforma CYP2E1 (EC 1.14.13.n7). Na oxidação do etanol, esta enzima utiliza como cofator o NADPH que durante a reação

é oxidado a NADP^+ . Estudos demonstraram que o consumo prolongado de etanol aumenta a atividade da enzima CYP2E1, favorecendo a forma de metabolização via MEOS no alcoolismo (PAQUOT, 2019). Independente da via metabólica de conversão do etanol em acetaldeído, o próximo evento metabólico é a conversão do acetaldeído em acetato. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH; EC 1.2.1.3) é responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do acetaldeído formado pelo metabolismo do etanol (PANG, 2003). Assim como a ADH, a ALDH utiliza o NAD^+ como cofator e o reduz a NADH. No consumo prolongado de etanol, há excesso de NADH na matriz citoplasmática do hepatócito, alterando-se a homeostase celular (PAQUOT, 2019). O acetato produzido é lançado na corrente sanguínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água (PEANA et al., 2016).

O acetaldeído, produto do metabolismo hepático do etanol, e o próprio etanol são moléculas simples que atravessam facilmente as membranas celulares, inclusive a barreira hematoencefálica (BHE) (FEIN; MEYERHOFF, 2000). No SNC, uma fração do etanol presente no cérebro, pode ser oxidado a acetaldeído (PEANA et al., 2016) (Figura 1). As isoformas I e IV da enzima ADH encontradas em neurônios não possuem alta eficiência na metabolização do etanol, sendo que a via da enzima catalase parece ser a mais utilizada no cérebro para a oxidação do etanol, seguida da via CYP2E1 (QUERTEMONT et al., 2005; HIPÓLITO et al., 2007). Além do que, a isoforma II da enzima ALDH, presente em diversos neurônios, oxida o acetaldeído em acetato e sua eficiência é fundamental, visto que o acetaldeído, assim como o etanol, possui características neurotóxicas (HERNÁNDEZ et al., 2016; PEANA et al., 2016).

2.2 NEUROQUÍMICA

Há evidências crescentes que o etanol pode afetar o SNC interferindo nos sistemas de neurotransmissão, incluindo os aminoácidos neurotransmissores excitatórios (aspartato e glutamato), que ativam as células pós-sinápticas, e os inibitórios, tais como γ -ácido aminobutírico (GABA) e taurina, que deprimem a atividade das células pós-sinápticas (BROUSSE et al, 2012). As regiões mais acometidas pelas lesões neuroquímicas geradas pelo consumo do álcool são a

corticolímbica, onde danos no hipocampo e córtex entorrinal levam a uma variedade de déficits cognitivos (OBERNIER et al., 2002), e no lobo frontal, região responsável por funções executoras e comportamentais (KELSO et al., 2011).

Sabe-se que o etanol é um agonista dos receptores γ -ácido aminobutíricos (GABAA) (QUERTEMONT et al., 2005; BROUSSE et al., 2012), favorecendo a atividade inibitória pós-sináptica. Durante a exposição prolongada ao etanol, os receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) são estimulados como uma resposta fisiológica aos efeitos depressores do etanol, afim de reestabelecer o equilíbrio na neurotransmissão inibitória/excitatória (RAO; SARI, 2012). Além deste mecanismo, os sistemas opióide (HARSHBERGER et al. 2016), purinérgico (RICO et al., 2011) e dopaminérgico (ALEXANDRE, 2019) apresentam alterações em seus efeitos neuroquímicos diante da exposição ao etanol. Outro sistema de neurotransmissão afetado pelo consumo de etanol é o colinérgico. Estudo em roedores tratados cronicamente com etanol (ingestão de etanol 20% v/v por 12 semanas) apresentou perda de neurônios colinérgicos no córtex, hipocampo e amígdala cerebral, além da redução do conteúdo de acetilcolina (ACh) e diminuição da atividade da colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) e acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), enzimas responsáveis pela transmissão colinérgica (ARENDDT et al., 1988).

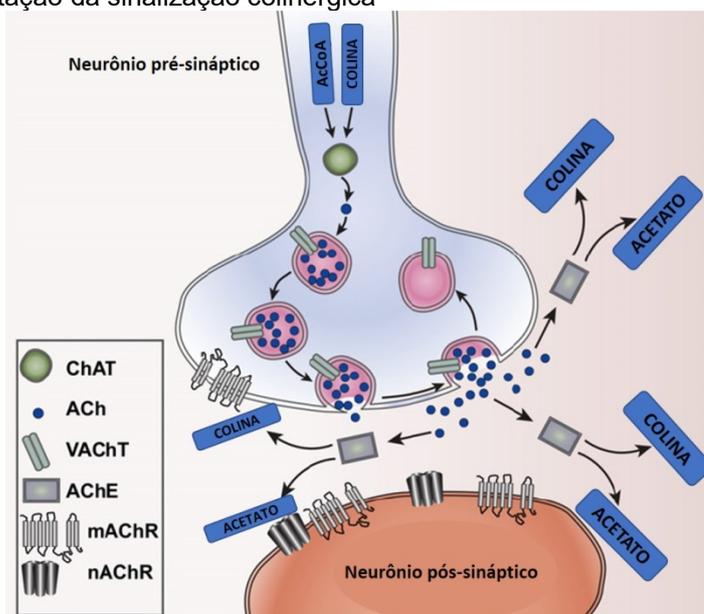
2.2.1 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico desempenha funções essenciais no SNC tais como o desenvolvimento das estruturas cerebrais, no processamento de aprendizagem e memória e nas funções sensoriais por meio do controle do fluxo sanguíneo cerebral (GIOVANNINI et al., 2015; ANTYBORZEC et al., 2016; SOLARI; HANGYA, 2018).

A ACh é o neurotransmissor do sistema colinérgico, sintetizada pela enzima ChAT, a partir de acetil-coenzima A (Acetil-CoA) e colina, e armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de acetilcolina (vAChT). Com a exocitose vesicular, o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica e é rapidamente degradado pela enzima AChE em acetato e colina (SOLARI; HANGYA, 2018). Grande parte da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico por um transportador de colina (ChT) e reutilizada na síntese de nova ACh (GIOVANNINI et al., 2015) (Figura 2). A hidrólise da ACh pela AChE evita a

propagação contínua do impulso nervoso, o que poderia acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (ROEX, 2003). Devido à sua função regulatória nas sinapses colinérgicas, a AChE se torna extremamente importante para o equilíbrio do SNC (OFEK; SOREQ, 2013).

Figura 2 – Representação da sinalização colinérgica



Fonte: BERNARDO (2017)

A ACh na fenda sináptica pode se ligar a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (ABREU-VILLAÇA et al., 2016). Estas duas classes são divididas em virtude de suas diferentes afinidades por agentes que mimetizam a ação da acetilcolina (TINSLEY et al., 2004). Os receptores nicotínicos são ionotrópicos, reconhecem a acetilcolina e são sensíveis a nicotina (ALBUQUERQUE et al., 2009). Os receptores nicotínicos estão ligados a canais catiônicos e possuem uma estrutura pentamérica (MCKAY; PLACZEK, 2007). Estes receptores pertencem a uma família heterogênea que consiste em diferentes subtipos, os quais formam combinações homoméricas ou heteroméricas a partir de 12 diferentes subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) (GOTTI; CLEMENTI, 2004). Os receptores muscarínicos são metabotrópicos, isto é ligado à proteína G e apresentam cinco subtipos (M1-M5) que foram clonados e identificados farmacologicamente. Os receptores M1, M3 e M5 estão acoplados a uma proteína Gq/11 e alteram a atividade celular pela estimulação da fosfolipase C e pela geração do segundo mensageiro inositol 1,2,4 trifosfato (IP3), o qual induz a liberação de cálcio intracelular e diacilglicerol (DAG).

Já, os receptores M2 e M4 estão unidos a uma proteína Gi que induz sua resposta via inibição da adenilato ciclase (UCHIYAMA; CHESS-WILLIAMS, 2004; OFEK; SOREQ, 2013).

A ChAT e a AChE são proteínas utilizadas como marcadores específicos do estado funcional dos neurônios colinérgicos, e desta forma, são alvo de estudos em doenças relacionadas a detrimientos cognitivos, bem como, a exposição ao etanol (KUMAR et al., 2016; GÖKÇEK-SARAÇ et al., 2021). Um estudo realizado em ratos adultos expostos ao etanol quando jovens, demonstrou por meio de testes comportamentais e análise imuno-histoquímica, que a diminuição persistente da imunoreatividade da ChAT em neurônios colinérgicos, podem levar a alterações comportamentais, como o aumento da tomada de decisão arriscada (BOUTROS et al., 2015). Ademais, estudos têm evidenciado que os prejuízos ao sistema colinérgico após a exposição ao etanol, se devem ao seu efeito pró-oxidativo (TIWARI et al., 2012; TIWARI; CHOPRA, 2013).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) é parte integrante de diversas condições fisiológicas. Durante os processos metabólicos, essas espécies reativas atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (MURPHY, 2009). Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de trifosfato de adenosina (ATP) por meio da cadeia transportadora de elétrons, regulação da sinalização celular e participação de mecanismos de defesa durante o processo inflamatório (SIES, 2015). Por outro lado, o organismo dispõe de um sistema antioxidante regulatório das espécies reativas (Figura 3). O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010). Tal desequilíbrio apresenta consequências deletérias para a célula, tais como a peroxidação lipídica, a oxidação e consequente inativação de proteínas e lesões oxidativas ao DNA, podendo levar à perda de função e morte celular (PALA; GÜRKAN, 2008; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018).

As ERO e ERN podem atacar uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata onde um radical reage com um composto gerando novos radicais. O processo de oxidação resultante do ataque destas espécies sobre os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares chama-se lipoperoxidação (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Durante a lipoperoxidação, intermediários podem sofrer quebras gerando hidrocarbonetos de cadeia curta (etano e pentano), aldeídos (como o malonaldeído e 4-hidroxinonenal), epóxidos e outros produtos altamente citotóxicos (OZCAN; OGUN, 2015). Como resultado da lipoperoxidação as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostase e morte celular (ROMANO et al, 2017). Ainda, a oxidação de proteínas resulta na perda de função destas, inativação de enzimas, perda da homeostase iônica, podendo levar à morte celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018). Adicionalmente, os danos oxidativos ao DNA provocam deleção e quebras de cadeias, podendo induzir novas mutações e alterando a expressão gênica, colaborando para o desenvolvimento de doenças crônicas (PALA; GÜRKAN, 2008).

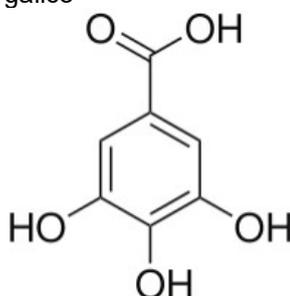
Para manter a homeostasia celular contra os efeitos deletérios das ERO e ERN, a célula possui defesas antioxidantes que agem sobre as biomoléculas. Dentre as defesas antioxidantes, destacam-se a enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) que é responsável pela dismutação de ânions superóxido, a forma mais abundante de ERO, a catalase (EC 1.11.1.6), que neutraliza o peróxido de hidrogênio liberado nessa ação, glutatona peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9), glutatona redutase (GR; EC 1.8.1.7), glutatona-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), γ -glutamilcisteína ligase (GCL; EC 6.3.2.2) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; EC 1.1.1.49) (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018). O sistema de antioxidantes não enzimáticos pode ser dividido em endógeno e exógeno. Dentre os compostos endógenos está a glutatona reduzida (GSH), e, aos antioxidantes exógenos o retinol (vitamina A), ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e os compostos fenólicos, por exemplo, o ácido gálico.

2.4 ÁCIDO GÁLICO

As plantas são compostas por misturas complexas de metabólitos secundários que vêm sendo investigados nas últimas décadas como fonte nutricional por desempenharem um papel importante na proteção da saúde humana. Dentre estes metabólitos, os compostos mais estudados são os polifenóis, que foram associados a redução dos riscos de algumas doenças como cânceres (RUSSO et al., 2017), diabetes (GUASCH-FERRÉ et al., 2017), doenças cardiovasculares (RASINES-PEREA et al., 2017) e doenças neurodegenerativas (SPAGNUOLO et al., 2016). O efeito protetor dos polifenóis tem uma estreita correlação com a eliminação de radicais livres, efeitos quelantes de metais, potencial capacidade de interagir com vias de transdução de sinal e inibição de diferentes enzimas, incluindo cicloxigenase e lipoxigenase (DAGLIA et al., 2014).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, AG) (Figura 4) é um composto trifenólico de baixo peso molecular e é um intermediário do metabolismo secundário derivado da via do ácido chiquímico (DAGLIA et al., 2014). Está presente em várias espécies vegetais, especialmente em chá verde, uvas, mangas e nozes, e é considerado o principal polifenol presente nas dietas (RAMIREZ-LOPEZ et al., 2014; BHATT et al., 2017). As quantidades de AG presente nas plantas variam de acordo com a espécie e, dentro de uma espécie vegetal, de acordo com diferentes fatores ambientais como radiação ultravioleta (UV), infecções microbianas, ataque de insetos e estressores químicos. Visto que é um metabólito secundário, a sua função na planta é protegê-la diante destes insultos (KARIMI et al., 2014).

Figura 4 – Estrutura química do ácido gálico



O metabolismo dos polifenóis no organismo humano e sua biodisponibilidade, ainda permanecem incertos. No que diz respeito ao AG, quando comparado com outros compostos polifenólicos, parece ser o composto melhor

absorvido em humanos. A maior fração do AG administrado por via oral é convertido em ácido 4-O-metilgalico (principal metabólito plasmático), e é excretado por via urinária aproximadamente 6 h após a administração (de OLIVEIRA et al., 2016). Devido ao seu peso e polaridade molecular, o AG apresenta-se biodisponível em diferentes sistemas celulares, como já demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2017; SINGULANI et al., 2017; SHAO et al., 2019).

As propriedades terapêuticas do AG vêm sendo investigadas desde os anos 90 quando se observou que ratos tratados com chá verde apresentaram redução da atividade mutagênica no trato gastrointestinal (DAGLIA et al., 2014). Desde então, muitas propriedades foram atribuídas ao AG como hepatoprotetora (PERAZZOLI et al., 2017), antimicrobiana (ZHAO et al., 2018) e anti-inflamatória (BENSAAD et al., 2017). Estas propriedades se devem ao fato do AG atuar em vias bioquímicas da inflamação e do processo oxidativo. Em relação ao processo inflamatório, estudos realizados em ratos (DONADO-PESTANA et al., 2018) e humanos obesos (SKRZYPCZAK-JANKUN e JANKUN, 2010), demonstraram que a administração de AG reduz os níveis de marcadores pró-inflamatórios. Além do que, foi demonstrado que o AG atua como inibidor competitivo das enzimas ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2 com maior afinidade pela COX-2 (REDDY et al., 2010).

O efeito antioxidante do AG no SNC vem sendo objeto de estudo, visto que o estresse oxidativo e processos inflamatórios mediados pelo desbalanço oxidativo são fatores da fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas. Esta substância pode interagir com os radicais livres e encerrar a cascata oxidativa antes de danificar as biomoléculas, utilizando mecanismos como quelação de metais, sequestro de elétrons desemparelhados e agindo na sinalização celular (OROIAN et al., 2015; MÁRQUEZ et al., 2019). O mecanismo de quelação de metais do AG é extremamente importante no SNC, visto que o cérebro apresenta um alto teor de ferro, e que este metal pesado participa nas reações de oxidação de biomoléculas por meio da reação de Fenton.

Um recente estudo de SIDDIQUI et al. (2019) demonstrou que o AG suprimiu a inflamação por meio da medição dos níveis de mediadores inflamatórios em astrócitos de ratos em um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, CHANDRASEKHAR et al. (2018) demonstrou que o AG foi eficaz em atenuar a interrupção do potencial da membrana mitocondrial, os níveis elevados de ERO intracelular e morte celular apoptótica

induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina implicada na doença de Parkinson, em células dopaminérgicas humanas. Adicionalmente, PEREIRA et al. (2018) verificou em estudo com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que ocorreu aumento da lipoperoxidação, prejuízo na atividade antioxidante e alterações comportamentais tipo ansiogênica. O tratamento com AG reverteu estas condições oxidativas e comportamentais relacionando esta substância a efeitos neuroprotetores e neuromodulatórios (PEREIRA et al., 2018). Além disso, estudos têm demonstrado que a propriedade antioxidante do AG pode estar relacionada a capacidade modulatória do sistema colinérgico em doenças neurodegenerativas, e que esta neuromodulação está associada a melhora cognitiva (NAGPAL et al., 2013; OBOH et al., 2017; de OLIVEIRA et al., 2018; MONU YADAV et al., 2018).

2.5 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL

O peixe-zebra é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente à família Cyprinidae (Figura 5), e tem sido utilizado como modelo experimental em diversas áreas do conhecimento, tais como: genética e genômica, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (VASCOTTO et al., 1997). A utilização do peixe-zebra na pesquisa vem aumentando especialmente por apresentar benefícios como pequeno espaço requerido para manutenção, baixo custo por animal, rápido desenvolvimento, número elevado da prole, embriões translúcidos e suscetíveis à manipulação e microinjeção (SIEBEL et al., 2015).

Por ser um vertebrado que apresenta características relevantes, o peixe-zebra vem se tornando um modelo animal complementar aos roedores, principalmente para estudos translacionais em larga escala. Esta espécie tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para o estudo das bases moleculares da neurobiologia, auxiliando na identificação de genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (GERLAI et al., 2006; LIESCHKE; CURRIE, 2007; EBARASI et al., 2011). Diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: dopaminérgico (BOEHMLER et al., 2004), GABAérgico (KIM et al., 2004), glutamatérgico (EDWARDS; MICHEL, 2002), histaminérgico (KASLIN; PANULA,

2001), serotoninérgico (RINK; GUO, 2004) e purinérgico (RICO et al., 2003; ROSEMBERG et al., 2011; VUADEN et al., 2016). Em relação ao sistema colinérgico, estudos já sequenciaram, identificaram e avaliaram a atividade das enzimas AChE e ChAT neste modelo animal (MUELLER et al., 2004; ARENZANA et al., 2005).

Figura 5 – Peixe-zebra (*Danio rerio*)



Além de modelo experimental em processos neurobiológicos, o peixe-zebra também emergiu como um sistema importante para a modelagem de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. O peixe-zebra possui defesas antioxidantes como a dos mamíferos, sugerindo que peixes e mamíferos têm semelhantes respostas celulares ao estresse oxidativo (MOHANTY et al., 2016). Com isso, estudos de enzimas antioxidantes, de produção de espécies reativas e danos gerados pelo estresse oxidativo vêm sendo realizados em cérebro de peixe-zebra expostos à diversas toxinas (NUNES et al., 2016; ZHENG et al., 2016; MOHANTY et al., 2017).

O peixe-zebra tem se mostrado também um modelo promissor no estudo das alterações fisiopatológicas na exposição ao etanol. Esta espécie possui duas classes da enzima ADH (ADH8A e ADH8B), sendo que a ADH8A possui alta afinidade ao etanol, possuindo melhor eficiência na metabolização e com homologia genômica de 73% com a ADH1 humana (TRAN et al., 2015a; TRAN et al., 2015b). Em relação ao SNC, estudos têm demonstrado alterações neuroquímicas dopaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas no peixe-zebra na exposição crônica e aguda ao etanol (CHATTERJEE et al., 2014; AGOSTINI et al., 2020). Além de ser um modelo no estudo do etanol, o peixe-zebra pode ser utilizado no estudo do AG, visto que, enzimas relacionadas ao metabolismo do mesmo já foram identificadas, codificadas e caracterizadas (MOHAMMED et al., 2012). Adicionalmente, TECHER et al. (2015) avaliaram a toxicidade aguda do AG em

peixes-zebra adultos por meio da concentração letal 50 (CL50) e demonstraram que esta substância é bem tolerada nesta espécie (96 h - CL50 > 100 mg/L).

Em relação a modulação comportamental do peixe-zebra, o etanol tem o efeito de modular o comportamento quando consumido em diferentes padrões e doses, o que pode estar associado com o seu efeito sobre os sistemas de neurotransmissão no cérebro. Estudos de GERLAI et al. (2000, 2006) evidenciaram o efeito ansiolítico do etanol em peixes-zebra expostos de forma aguda e crônica. Adicionalmente, até o momento, nada se sabe sobre o efeito do AG sobre parâmetros comportamentais no peixe-zebra, logo, este estudo trará esta informação de forma inédita.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a eficácia pré-clínica do ácido gálico *per se* e sobre as alterações neuroquímicas e comportamentais em tecido cerebral de peixe-zebra exposto ao etanol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do AG *per se* e após a exposição prolongada ao etanol sobre parâmetros de estresse oxidativo como níveis de TBA-RS, conteúdo de grupos sulfidril, oxidação de DCFH e níveis de nitratos e nitritos.
- Avaliar o efeito do AG *per se* e após a exposição prolongada ao etanol sobre a ação antioxidante através dos níveis de GSH e atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase em cérebro total de peixe-zebra;
- Analisar o efeito do AG *per se* e após a exposição prolongada ao etanol sobre o comportamento locomotor/exploratório do peixe-zebra;
- Observar o efeito do AG *per se* e após a exposição prolongada ao etanol sobre o perfil ansiolítico-símile do peixe-zebra;
- Verificar o efeito do AG *per se* e após a exposição prolongada ao etanol sobre o sistema colinérgico por meio da atividade das enzimas AChE e ChAT.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

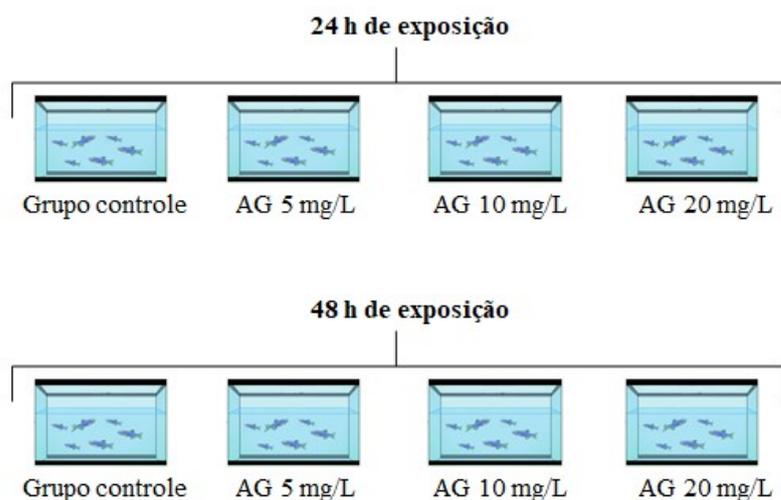
Para a realização deste estudo foram utilizados 360 peixe-zebra (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente quatro meses de idade) de ambos os sexos (50:50). Os animais foram obtidos da colônia proveniente de estabelecimento comercial e foram mantidos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínic de Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco, em aquários de 50 L com água destilada, salinizada e continuamente aerada, em uma densidade de 3 animais por litro. A temperatura da água foi regulada em $25 \pm 1,0$ °C e os peixes foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14h/10h controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 21h), sendo que as condições físico-químicas da água foram averiguadas antes e depois dos experimentos. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com ração industrializada flocada (TetraMin™, NC, USA) e seu bem-estar guiado pelo preceito da redução, substituição e refinamento, visando a garantir o melhor aproveitamento e uso de menor número de animais. Para melhor representar a heterogeneidade da população foram utilizados peixe-zebra do tipo selvagem, devido à sua variabilidade genética aumentada. O manejo dos animais foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011)*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo 23076.020129/2018-93, ANEXO A) e Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC (protocolo 068/2019-1, ANEXO B).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para avaliação do efeito do ácido gálico *per se* sobre o cérebro do peixe-zebra, os animais foram introduzidos aos aquários de teste (10 L) em um número de 30 animais por aquário, contendo uma solução de ácido gálico (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L durante 24 e 48h, formando desta forma seis grupos distintos (Figura 6). Os grupos controles foram introduzidos

ao aquário teste (10 L), porém sem exposição ao ácido gálico. Cada grupo foi formado por uma amostra igual a seis, de tal forma que cada amostra foi composta por um *pool* de cinco cérebros totais.

Figura 6 - Protocolo experimental de exposição ao ácido gálico (AG).

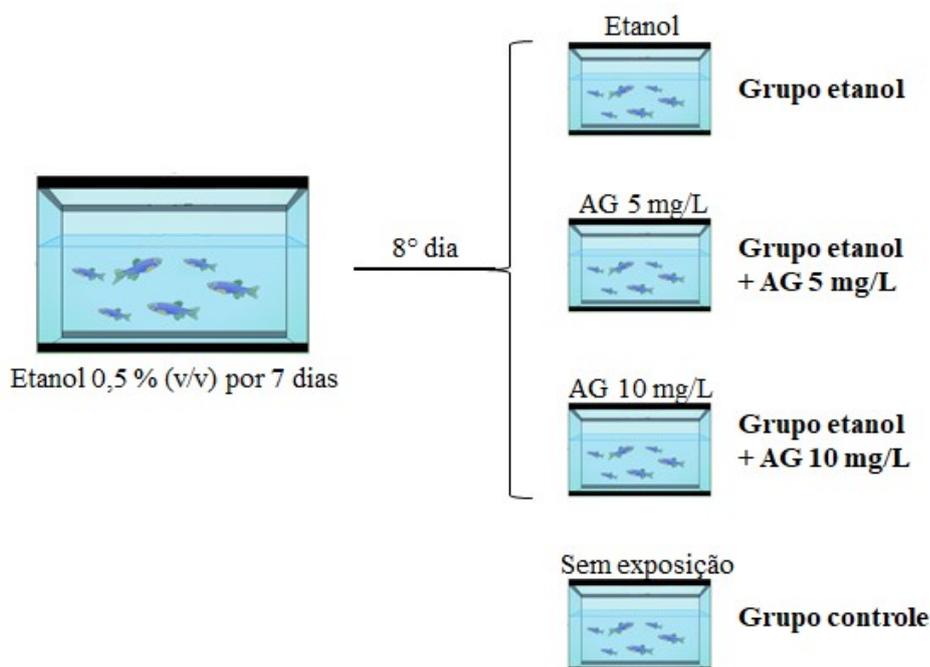


O segundo passo foi avaliar o efeito do ácido gálico sobre o cérebro de peixe-zebra após a exposição ao etanol. Para reproduzir o modelo de exposição prolongada ao etanol em peixe-zebra, proposto por RICO et al. (2011), 90 animais foram introduzidos ao aquário de teste (30 L) contendo uma solução de etanol (Merck, Darmstadt, ALE) a 0,5% (v/v). Os animais foram mantidos no aquário de teste por 7 dias de forma ininterrupta e para garantir a concentração de etanol constante, a solução foi substituída totalmente diariamente. No oitavo dia, os animais foram divididos de forma aleatória em três grupos distintos, onde dois deles receberam por 24h AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L, respectivamente. O grupo controle foi introduzido ao aquário teste (10 L), porém sem exposição ao etanol. Desta forma, obteve-se quatro grupos distintos (Figura 7), em que cada grupo foi formado por uma amostra igual a seis, de tal forma que cada amostra foi composta por um *pool* de cinco cérebros totais.

Ao término do tratamento, os peixes foram submetidos aos testes comportamentais e imediatamente após os animais foram crioadestesiados e sofreram eutanásia por decaptação, as caixas cranianas foram abertas e os

cérebros foram retirados, limpos e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização das análises bioquímicas.

Figura 7 – Protocolo de exposição ao etanol e ácido gálico (AG)



4.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

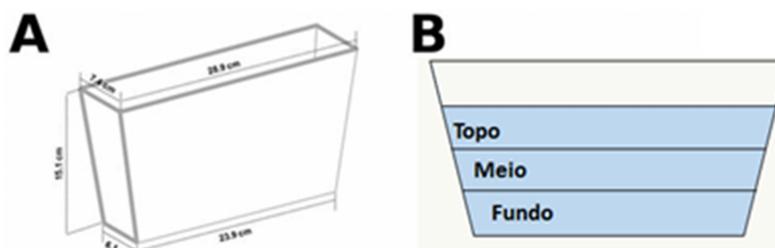
4.3.1 Avaliação da atividade exploratória e locomotora com o teste *novel tank*

O teste comportamental *novel tank* foi realizado durante o mesmo período do dia (entre as 9 e 16 h) para todos os grupos ($n=12$). Cada animal foi transferido de forma cuidadosa para o aparato e testado individualmente. Da mesma forma que no estudo de ROSEMBERG et al. (2011), o aparato teste consistiu em um aquário de vidro trapezoidal (23,9 cm fundo; 28,9 cm topo e 15,1 cm altura) preenchido com 1,5 L de água proveniente do respectivo aquário habitat (Figura 8A). A fim de evitar movimentos que pudessem perturbar o animal e também para melhorar a qualidade das gravações, folhas de papel na cor amarela foram colocados ao redor do aquário em uma distância de 10 cm.

Virtualmente, três áreas foram delimitadas de forma horizontal, formando as zonas: fundo, meio e topo (Figura 8B), conforme previamente determinado

(ROSEMBERG et al., 2011). Uma câmera foi colocada na frente do aquário a uma distância de 30 cm e uma lâmpada foi ajustada acima do aquário com objetivo de melhorar o contraste entre animal e o fundo do aquário. A câmera foi conectada em um computador para gravação dos vídeos e a atividade comportamental foi analisada durante seis minutos utilizando um *software* de *videotracking* apropriado (ANY-maze, Stoelting CO, USA). A cada três animais testados, a água presente no aquário teste foi substituída. Todos os peixes foram manipulados pela mesma pessoa durante o teste comportamental, a qual não participou dos ensaios bioquímicos. Foram analisados os perfis exploratório e locomotor por meio dos seguintes parâmetros calculados pelo *software*: distância percorrida, velocidade média, número de cruzamentos entre as zonas, tempo e número de episódios em que o animal permaneceu imóvel, tempo e número de entradas em cada zona do aquário.

Figura 8: Representação das dimensões e zonas determinadas no aparato utilizado no teste *Novel tank*



Fonte: ROSEMBERG et al. (2011).

4.3.2 Avaliação do perfil ansiolítico-símile com o teste claro/escuro

O teste claro/escuro foi realizado de acordo com GEBAUER et al. (2011) e MARCON et al. (2019). Cada animal foi cuidadosamente transferido para o aparelho e testado individualmente ($n = 12/\text{grupo}$). O aparelho consistiu em um tanque de vidro (18x9x7 cm) dividido em duas partes, um compartimento preto e um compartimento branco, com uma divisória guilhotina deslizante (9x7 cm) entre os dois compartimentos de tamanhos iguais com 3 cm de água proveniente do aquário habitat. A cada três animais testados, a água presente no aquário teste foi substituída. Todos os peixes foram manipulados pela mesma pessoa durante o teste comportamental, a qual não participou dos ensaios bioquímicos. O tempo de

permanência no compartimento de luz e o número de travessias entre os compartimentos foram registrados por 5 min e posteriormente analisados por meio do software Boris (Università Degli Studi di Torino, Torino, Itália).

4.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.4.1 Homogeneização dos tecidos

Os tecidos (encéfalos) foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM acrescido de cloreto de potássio 140 mM em pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 750 x g por 10 minutos a 4° C. Utilizou-se o sobrenadante para as análises posteriores (DAL SANTO et al., 2014; AGOSTINI et al., 2018).

4.4.2 Níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para determinação dos níveis de TBA-RS, o sobrenadante obtido na homogeneização da amostra foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec, São Paulo, Brasil) a 10% com sulfato de sódio na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) 0,67% na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida por meio da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS.mg de proteína⁻¹ (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

4.4.3 Conteúdo de grupos sulfidrila

Para determinação do conteúdo de grupos sulfidrila, uma alíquota da amostra (48 µg de proteína) foi incubada em tampão PBS com EDTA 1mM (pH 7,4). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto. Após foi adicionado o ác. ditionitrobenzoico (DTNB), reagente de cor, que foi reduzido pelos tióis não oxidados, gerando o composto 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB), um derivado

amarelo que foi lido espectrofotometricamente a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TNB.mg de proteína⁻¹ (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4.4.4 Oxidação de DCFH

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

4.4.5 Níveis de nitratos e nitritos

As concentrações de nitratos e nitritos em cérebro total foram determinadas de acordo com MIRANDA et al. (2001), utilizando o reagente de Griess (0,1% dihidrocloridronaftiletildiamida em água e 1% de sulfanilamida em ácido clorídrico 5%). Uma curva de calibração foi feita utilizando nitrato de sódio, e cada ponto da curva foi submetido aos mesmos tratamentos que as amostras. Neste protocolo, os nitratos são reduzidos pelo cloreto de vanádio a nitritos, que são detectados espectrofotometricamente a 540 nm pela reação com o reagente de Griess. Os resultados estão expressos em nmol de nitritos.mg de proteína⁻¹.

4.4.6 Atividade da SOD

A atividade da SOD em cérebro total foi determinada de acordo com BANNISTER e CALABRESE (1987). Inicialmente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra catalase 10 mM,

tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

4.4.7 Atividade da Catalase

Esta atividade enzimática da catalase em cérebro total foi determinada por meio do método de AEBI (1984). À amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1% seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 39,4 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da catalase por mg de proteína).

4.4.8 Níveis de glutathiona (GSH) reduzida

Os níveis de GSH cerebral foram determinados de acordo com SEDLAK e LINDSAY (1968) com pequenas modificações. Os níveis de GSH foram avaliados por meio da quantificação de grupos sulfidril não proteicos em amostras de homogenato que foram submetidas à precipitação de proteínas por adição de TCA a 20% seguida de centrifugação a 800 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio bioquímico. L-cisteína foi usada para construir a curva padrão dos grupos sulfidril e os resultados expressos em μmol GSH.mg de proteína⁻¹.

4.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO

4.5.1 Atividade da ChAT

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

4.5.2 Atividade da AChE

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

4.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas por meio da medida da absorvância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na

solução analisada, onde uma solução de albumina (1 mg/mL) foi utilizada como padrão.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade usando o teste Shapiro-Wilk. Para os dados normalmente distribuídos (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) fez-se da seguinte forma: para analisar a influência da concentração e do tempo de exposição ao AG nos parâmetros de estresse oxidativo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas post hoc de Tukey; para analisar a influência das diferentes concentrações de AG nos parâmetros colinérgicos, foi utilizada ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, para experimentos com AG e etanol, foi utilizada ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados usando os testes de Kruskal-Wallis com os testes post hoc de comparação múltipla de Dunn. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

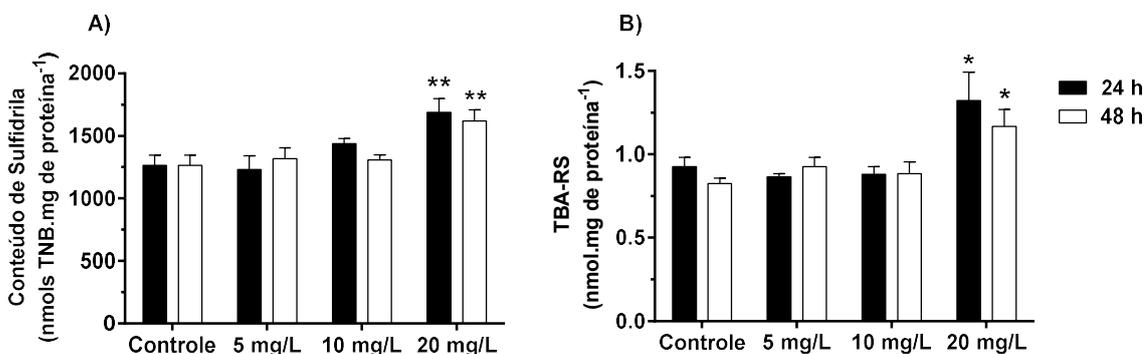
5.1 AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA

Como dito anteriormente, nada há na literatura sobre os efeitos do AG em cérebro de peixe zebra adulto. Com isso, inicialmente foi avaliado o efeito do AG *per se* nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L em cérebro de peixe-zebra expostos durante 24 e 48h sobre parâmetros de estresse oxidativo, visto que esta avaliação pode ser utilizada como um indicativo de toxicidade.

O teste ANOVA demonstrou que a variável concentração possui efeito significativo sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila ($F_{3,30} = 11,32$, $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias), um marcador de dano oxidativo a proteínas, e nos níveis de TBA-RS ($F_{3,30} = 8,231$, $p = 0,0004$, ANOVA de duas vias), um marcador de peroxidação lipídica. A variável tempo de exposição não apresentou significância ($p > 0,05$). A análise post hoc demonstrou aumento significativo sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila no grupo tratado com 20 mg/L de AG exposto por 24h ($p = 0,0014$) e 48h ($p = 0,0071$) em relação ao grupo controle (Figura 9A).

De maneira semelhante houve aumento significativo nos níveis de TBA-RS no grupo tratado com 20 mg/L de AG exposto por 24h ($p = 0,0181$) e 48h ($p = 0,0492$) em relação ao grupo controle (Figura 9B). As demais concentrações não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

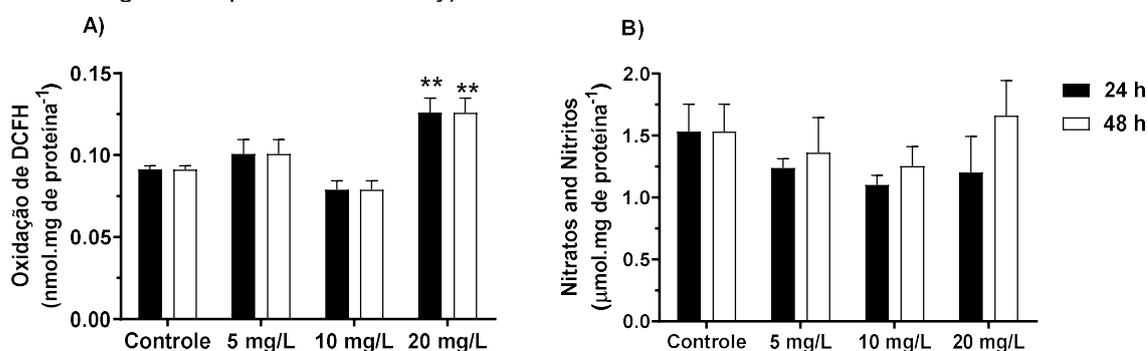
Figura 9 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila (A) e os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol TNB.mg de proteína⁻¹ e nmol.mg de proteína⁻¹, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



Para investigar o efeito do AG na produção de espécies reativas no cérebro do peixe-zebra, marcadores de ERO foram quantificados por meio da oxidação de DCFH, e marcadores de ERN foram quantificados por meio dos níveis de nitrato e nitrito.

Foi constatado significância em relação as diferentes concentrações de AG na oxidação de DCFH ($F_{3,30} = 15,65$, $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias), entretanto, o tempo de exposição não influenciou este parâmetro ($p > 0,05$). A análise post hoc demonstrou aumento significativo na oxidação do DCFH no grupo tratado com 20 mg/L de AG exposto por 24 e 48h ($p = 0,049$ and $p = 0,048$, respectivamente) em relação ao grupo controle (Figura 10A). As demais concentrações não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa nos níveis de nitrato e nitrito entre as concentrações testadas ($p > 0,05$) (Figura 10B).

Figura 10 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre a oxidação de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH; A) e os níveis de nitratos e nitritos (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹ e μ mol.mg de proteína⁻¹, respectivamente. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



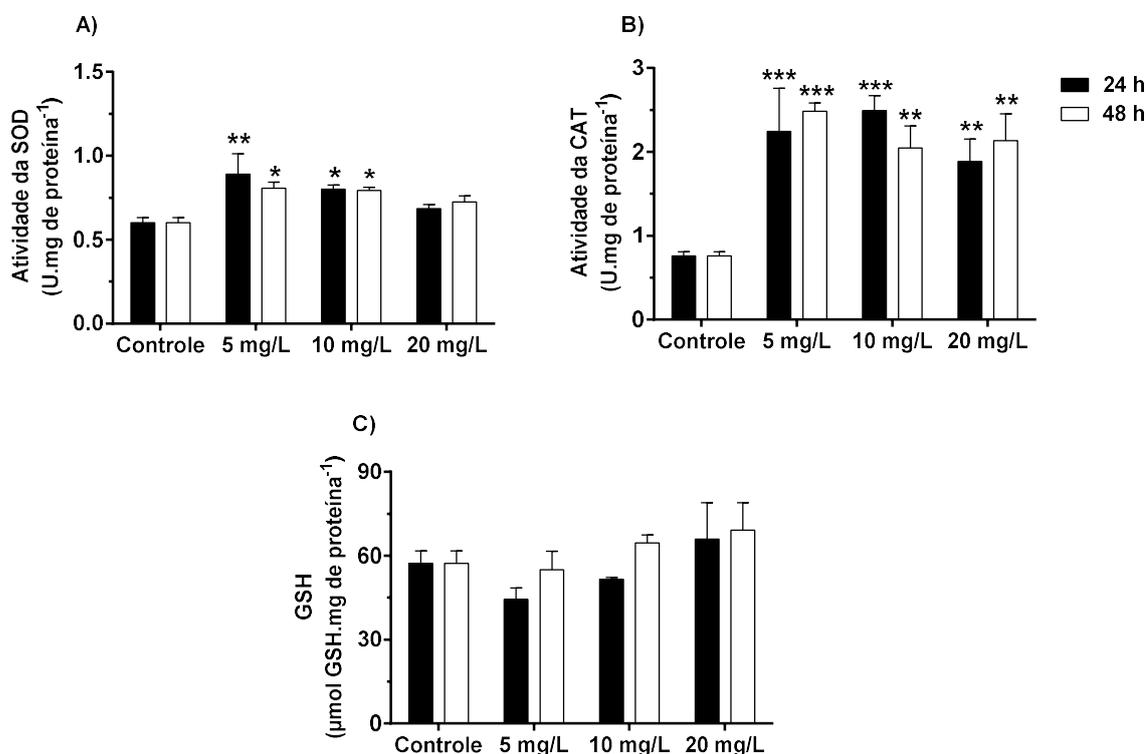
Adicionalmente, foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas em cérebro total de peixe-zebra submetidos a exposição ao AG nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h. o teste ANOVA demonstrou que a variável concentração apresentou significância na atividade das enzimas SOD ($F_{3,30} = 8,372$, $p = 0,0003$, ANOVA de duas vias) e CAT ($F_{3,30} = 17,37$, $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias), enquanto que, a variável tempo não apresentou significância ($p > 0,05$).

A análise post hoc revelou aumento na atividade da SOD após 24h de exposição nos grupos tratados com 5 e 10 mg/L ($p = 0,0018$; $p = 0,0327$, respectivamente) e após 48h nos grupos tratados com 5 e 10 mg/L ($p = 0,0278$; $p =$

0,0425) em relação ao grupo controle (Figura 11A). A atividade da CAT aumentou em todas as concentrações de AG testadas após 24h [5 mg/L ($p = 0,0008$), 10 mg/L ($p = 0,0001$) e 20 mg/L ($p = 0,0097$)] e 48h [5 mg/L ($p = 0,0001$), 10 mg/L ($p = 0,0032$) e 20 mg/L ($p = 0,0017$)] em comparação com os respectivos grupos controles (Figura 11B).

As demais concentrações não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Outrossim, foi avaliada a capacidade antioxidante não enzimática por meio dos níveis de GSH reduzida, a qual não houve diferença significativa nos grupos avaliados em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 11C).

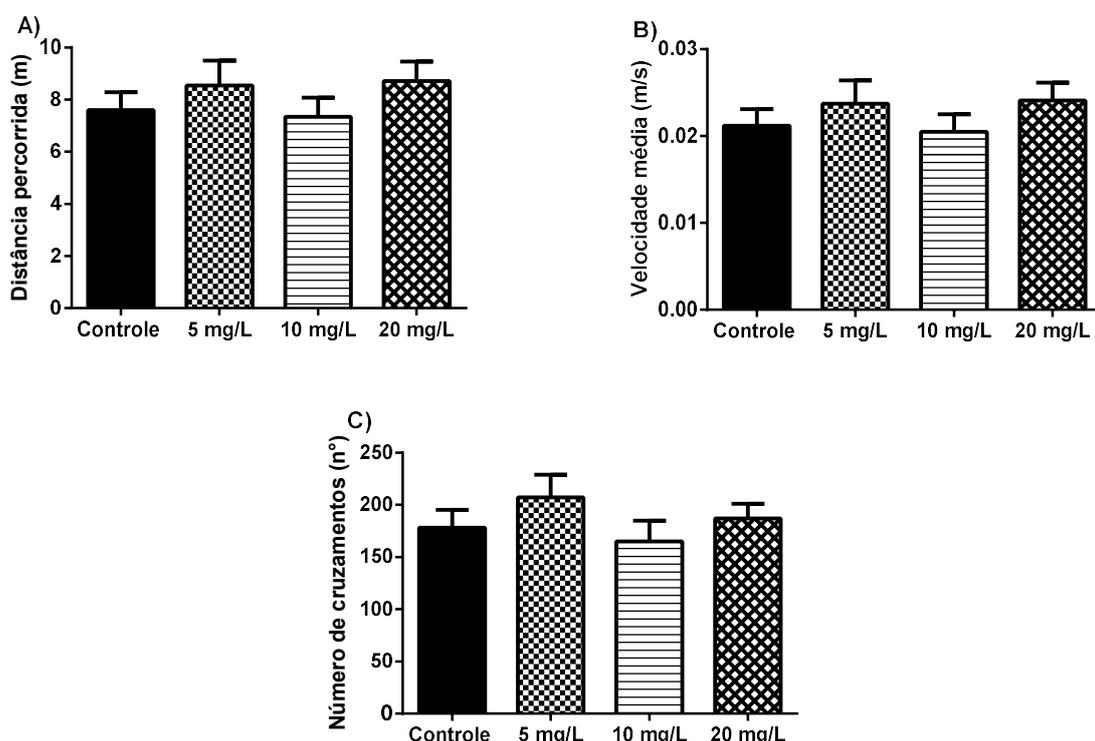
Figura 11 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24 e 48h sobre a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD; A) e catalase (CAT; B) e sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em U.mg de proteína⁻¹ (SOD e CAT) e em μmol de GSH.mg de proteína⁻¹ (GSH). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



Visto que a concentração de AG foi fator diferencial entre as alterações encontradas e o tempo de exposição não interferiu nestas alterações, a avaliação comportamental foi realizada nos animais expostos ao AG nas concentrações 5, 10 e 20 mg/L durante 24h. Para avaliar o perfil exploratório/locomotor foi utilizado teste

do *novel tank*. Em relação ao perfil locomotor, não houve alteração entre os grupos avaliados, uma vez que os parâmetros distância percorrida, velocidade média e número de cruzamentos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 12A, 12B e 12C).

Figura 12 – Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre a distância percorrida (A), velocidade média (B) e número de cruzamentos (C) no aparato *novel tank*. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 12 diferentes experimentos. (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).

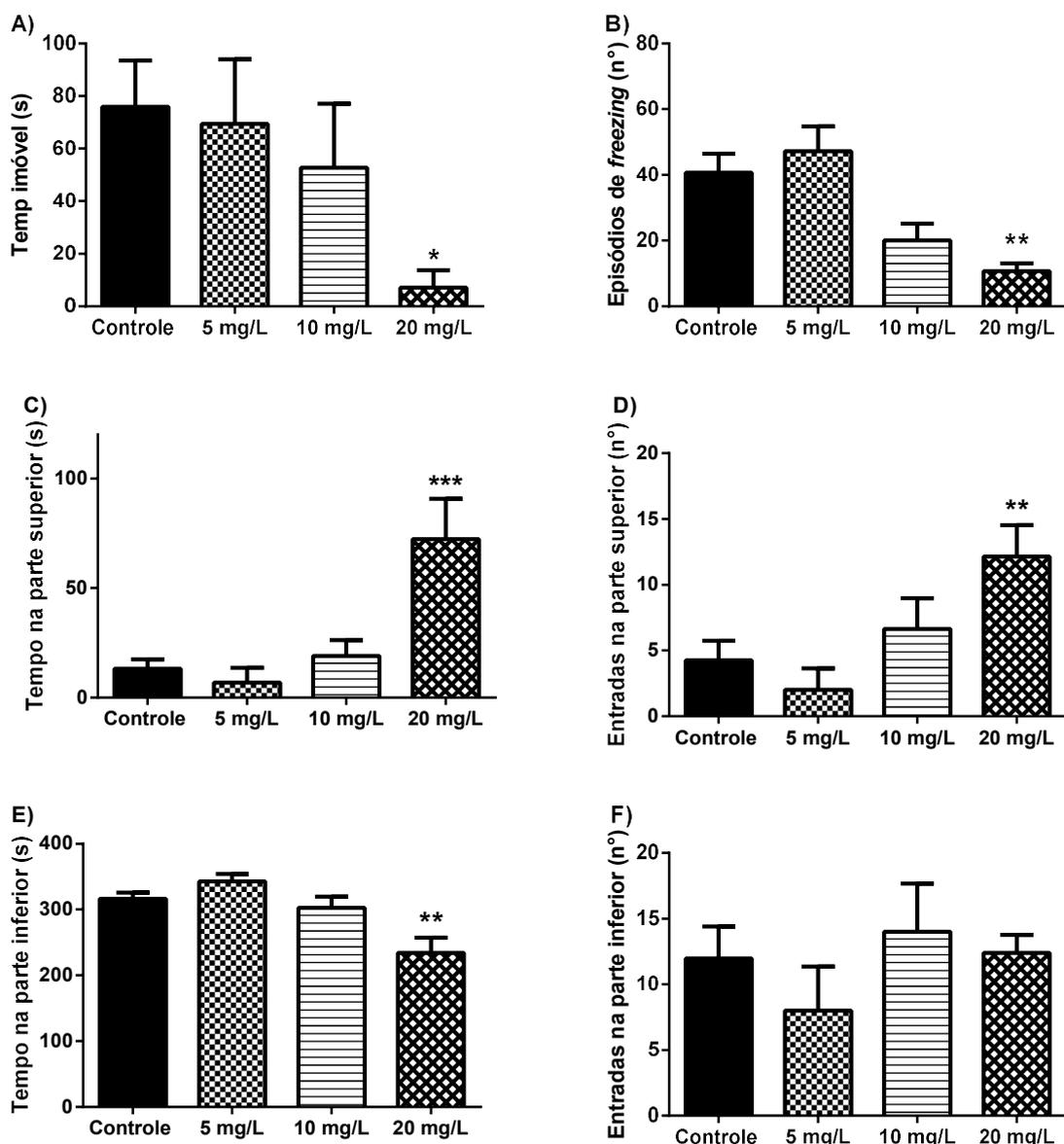


O perfil exploratório dos animais foi avaliado por meio dos parâmetros tempo imóvel, episódios de *freezing* e pelo tempo e número de entradas na zona superior e inferior do aquário. Foi notado que o grupo tratado com 20 mg/L de AG demonstrou uma diminuição no tempo imóvel ($p = 0,039$, Kruskal-Wallis; Figura 13A) e no número de episódio de *freezing* ($p = 0,0030$, Kruskal-Wallis; Figura 13B) em relação aos grupos controle.

Neste mesmo grupo foi constatado que o tempo de permanência (Figura 13C) e o número de entrada (Figura 13D) na parte superior do aparato foram significativamente maiores ($p = 0,0002$ e $p = 0,0021$, Kruskal-Wallis, respectivamente) em relação ao grupo controle, enquanto que o tempo de permanência na parte inferior do aparato foi menor em relação ao grupo controle (p

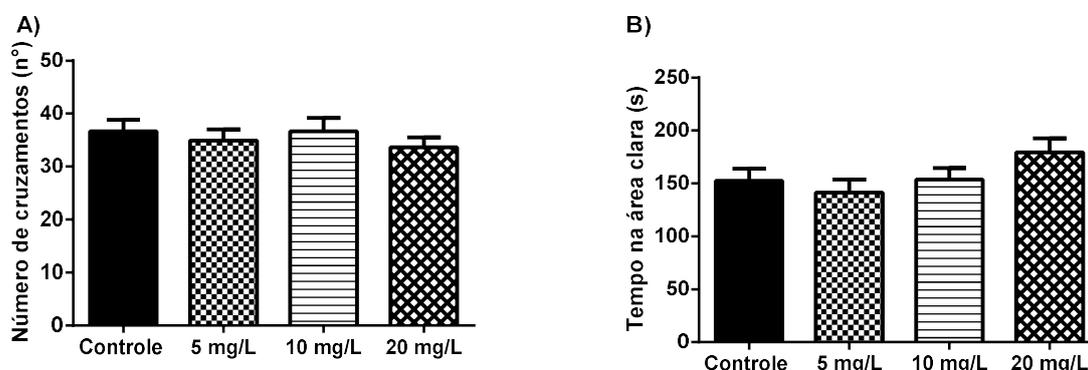
= 0,0044, Kruskal-Wallis, Figura 13E). As demais concentrações não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos controles ($p > 0,05$).

Figura 13 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre o tempo imóvel (A), episódios de freezing (B), tempo na parte superior (C), entradas na parte superior (D), tempo na parte inferior (E) e entradas na parte inferior (F) no aparato *novel tank*. Os resultados representam média \pm erro padrão de 12 diferentes experimentos. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).



A avaliação do perfil ansiolítico-símile foi realizada pelo teste claro/escuro por meio dos parâmetros número de cruzamentos (Figura 14A) e tempo na área clara (Figura 14B) nos peixes-zebra tratados com 5, 10 e 20 mg/L de AG por 24h. Não houve diferença estatística destes parâmetros em relação aos grupos avaliados ($p > 0,05$).

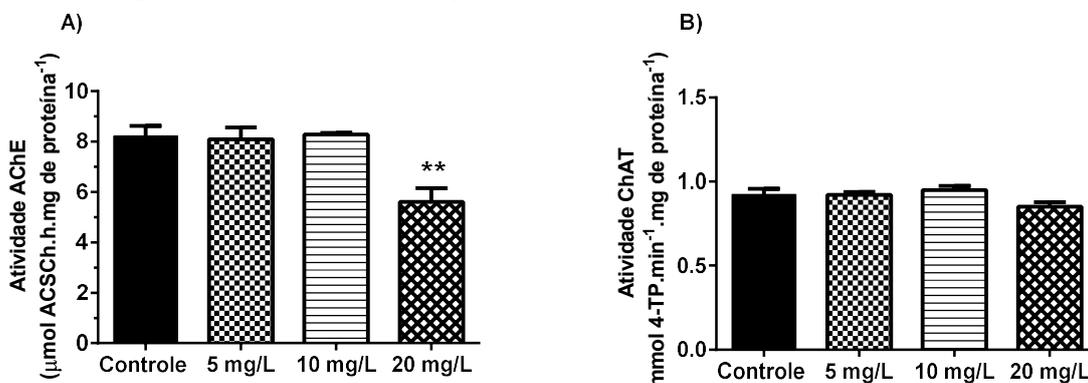
Figura 14 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h no peixe-zebra sobre o número de cruzamentos (A) e tempo na área clara (B) no teste claro/escuro. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 12 diferentes experimentos. (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).



Considerando que respostas comportamentais estão associadas aos sistemas neuroquímicos, para compreender se a função dos neurônios colinérgicos são vulneráveis a exposição ao AG, a atividade das enzimas AChE e ChAT foram avaliadas em cérebro de peixe-zebra exposto ao AG nas concentrações 5, 10 e 20 mg/L por 24h. Foi observada redução na atividade da enzima AChE em relação ao grupo controle em cérebro de peixe-zebra expostos a concentração de 20 mg/L ($F_{3,20} = 9,691$, $p = 0,0014$, ANOVA de uma via) (Figura 15A).

As demais concentrações não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Não houve alteração na atividade da enzima ChAT entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). (Figura 15B).

Figura 15 - Efeito da exposição ao ácido gálico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L por 24h sobre a atividade das enzimas colinérgicas acetilcolinesterase (AChE; A) e colina acetiltransferase (ChAT; B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em $\mu\text{mol ACSCh.h.mg de proteína}^{-1}$ e $\text{nmol.4-TP.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

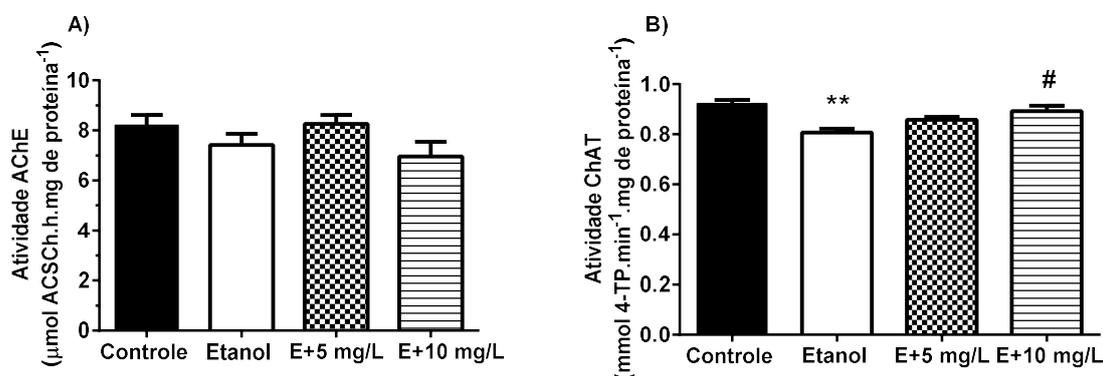


5.2 AVALIAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO EM CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA EXPOSTO DE FORMA PROLONGADA AO ETANOL

Visto que o AG na concentração de 20 mg/L gerou alterações de estresse oxidativo, comportamental e colinérgico, optou-se em avaliar somente as concentrações 5 e 10 mg/L de AG nos animais expostos ao etanol, a fim de observar reversões aos danos gerados pelo etanol. Considerando que o etanol altera o sistema colinérgico, foram avaliadas as enzimas AChE e ChAT no cérebro de peixe zebra exposto ao etanol e posteriormente ao AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L.

Em relação a atividade da AChE não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; Figura 16A). Contudo, foi percebido significativa interação entre o AG e o etanol sobre a atividade da ChAT ($F_{3,15} = 8,825$, $p = 0,0013$, ANOVA de duas vias). A análise post hoc demonstrou redução na atividade da enzima ChAT do grupo exposto ao etanol em relação ao grupo controle ($p = 0,001$) e aumento da atividade desta enzima no grupo tratado com 10 mg/L de AG em relação ao grupo etanol ($p = 0,0119$; Figura 16B).

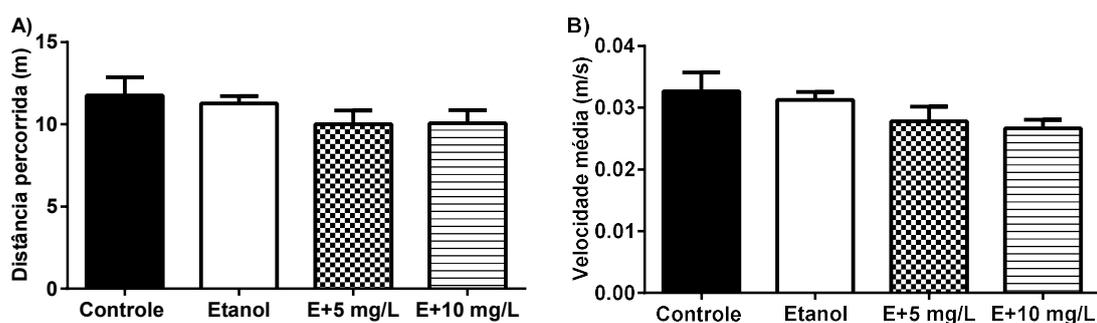
Figura 16 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre a atividade das enzimas colinérgica acetilcolinesterase (AChE; A) e colina acetiltransferase (ChAT; B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em $\mu\text{mol ACSCh.h.mg de proteína}^{-1}$ e $\text{nmol.4-TP.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo etanol (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



O próximo passo foi avaliar a influência do etanol e do tratamento com o AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L sobre o perfil comportamental locomotor e exploratório do peixe-zebra por meio do teste *novel tank*. Dentre os parâmetros ligados ao perfil locomotor avaliado, não foi verificada alteração na distância

percorrida e velocidade média entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; Figura 17A e 17B).

Figura 17 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre a distância percorrida (A) e velocidade média (B) no aparato *novel tank*. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 12 diferentes experimentos. (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).



Em relação ao perfil exploratório dos animais foi observado que o grupo exposto ao etanol permaneceu mais tempo imóvel do que o grupo controle ($p = 0,034$, Kruskal-Wallis) e que o grupo tratado com 5 mg/L de AG apresentou um tempo imóvel menor em relação ao grupo etanol ($p = 0,029$, Kruskal-Wallis; Figura 18A).

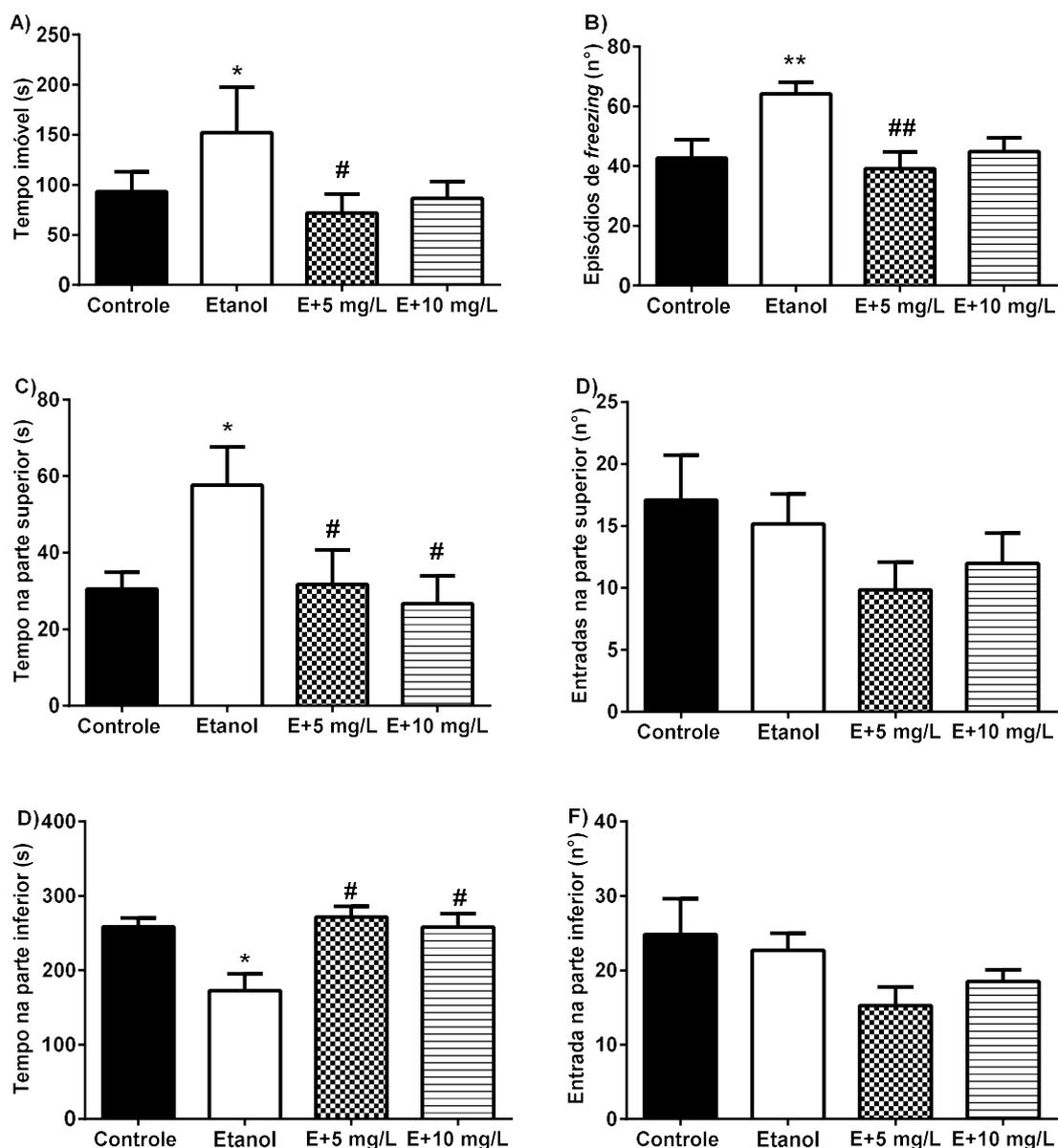
Da mesma forma, o número de episódios de *freezing* do grupo exposto ao etanol foi maior quando comparado com o grupo controle ($p = 0,0074$, Kruskal-Wallis). O grupo tratado com 5 mg/L de AG apresentou redução no número destes episódios em relação ao grupo etanol ($p = 0,0086$, Kruskal-Wallis) (Figura 18B).

O tempo de permanência na parte superior do aparato pelo grupo exposto ao etanol foi maior em relação ao tempo de permanência do grupo controle ($p = 0,014$, Kruskal-Wallis), sendo que os grupos tratados com 5 e 10 mg/L de AG apresentaram uma diminuição deste tempo em relação ao grupo etanol ($p = 0,044$ e $p = 0,041$, respectivamente, Kruskal-Wallis; Figura 18C). Todavia, o número de entrada na parte superior não apresentou alteração entre os grupos avaliados ($p > 0,05$, Figura 18D). Igualmente ocorreu com o número de entrada na parte inferior do aparato ($p > 0,05$, Figura 18F).

Em relação ao tempo de permanência na parte inferior do aparato, o grupo exposto ao etanol apresentou menor tempo nesta zona em relação ao grupo controle ($p = 0,016$, Kruskal-Wallis) enquanto que os animais tratados com as doses de 5 e 10 mg/L de AG apresentaram aumento na permanência na parte inferior do

aparato em relação ao grupo etanol ($p = 0,010$ e $p = 0,040$, respectivamente, Kruskal-Wallis; Figura 18E).

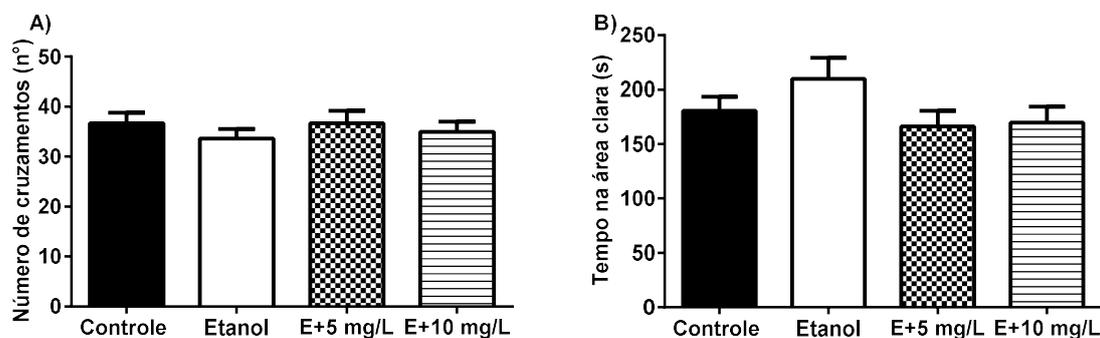
Figura 18 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre o tempo imóvel (A), episódios de *freezing* (B), tempo na parte superior (C), entradas na parte superior (D), tempo na parte inferior (E) e entradas na parte inferior (F) no aparato *novel tank*. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 12 diferentes experimentos. * $p < 0,01$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle; # $p < 0,01$; ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo etanol (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).



O perfil ansiolítico-símile dos animais expostos ao etanol e tratados com AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L foi avaliado pelo teste claro/escuro por meio dos parâmetros número de cruzamentos (Figura 19A) e tempo na área clara (Figura

19B). Não houve diferença estatística destes parâmetros em relação aos grupos avaliados ($p > 0,05$).

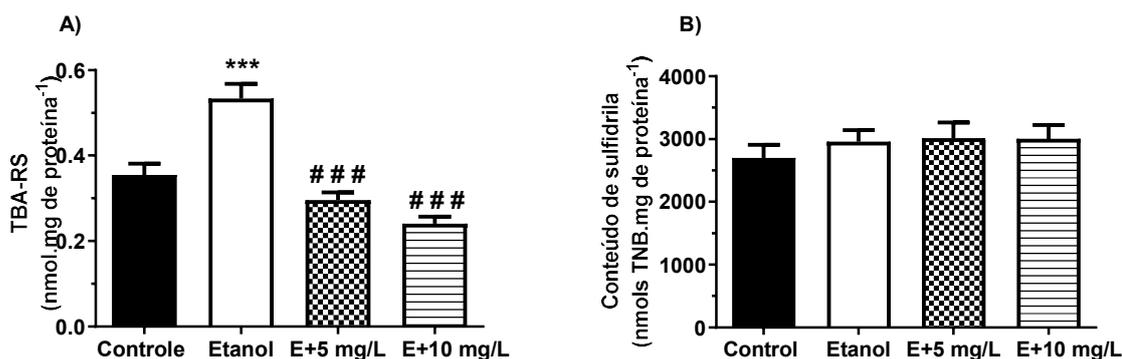
Figura 19- Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol no peixe-zebra sobre o número de cruzamentos (A) e tempo na área clara (B) no teste claro/escuro. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 12 diferentes experimentos. (Kruskal-Wallis seguido de post hoc de Dunn).



Posteriormente, foi avaliados parâmetros de estresse oxidativo em cérebros de peixe-zebra expostos de forma prolongada ao etanol e tratados com AG. Ao avaliar a peroxidação lipídica no tecido cerebral do peixe-zebra (Figura 20A), foi constatada significativa interação entre o AG e o etanol ($F_{3,15} = 29,94$, $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias) nos níveis de TBA-RS. A análise post hoc demonstrou aumento nos níveis de TBA-RS no grupo exposto ao etanol em relação ao grupo controle ($p = 0,0003$) e os grupos que foram tratados com 5 e 10 mg/L de AG apresentaram diminuição destes níveis em relação ao grupo etanol ($p < 0,0001$ para ambas).

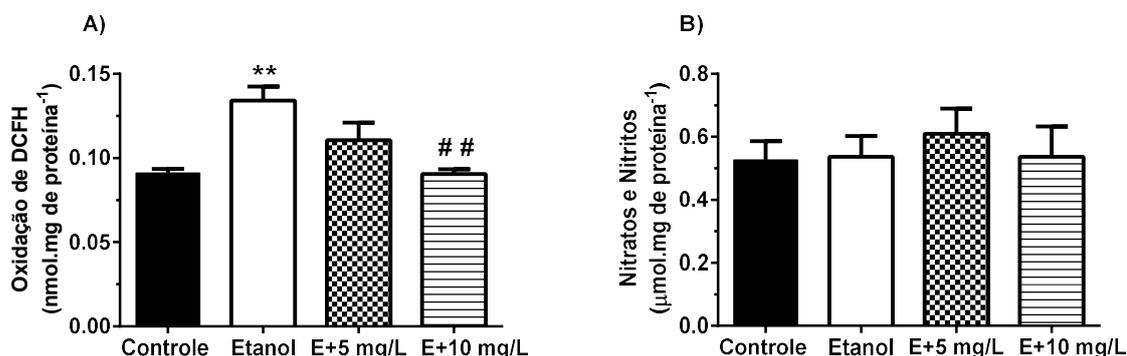
O dano proteico foi avaliado por meio do conteúdo dos grupamentos sulfidrila, todavia, não houve alteração entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; Figura 20B).

Figura 20 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS; A) e o conteúdo de grupamentos sulfidrila (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹ e nmol TNB.mg de proteína⁻¹, respectivamente. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle, ### $p < 0,001$ em comparação ao grupo etanol (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



Para a verificação da presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, foram quantificados a oxidação do DCFH (Figura 21A) e os níveis de nitratos e nitritos (Figura 21B) em cérebro de peixe-zebra expostos ao etanol e posteriormente tratados com 5 e 10 mg/L de AG. Uma significativa interação entre AG e etanol foi observada em relação a oxidação do DCFH ($F_{3,15} = 9,351$, $p < 0,001$, ANOVA de duas vias). A análise post hoc demonstrou aumento na oxidação de DCFH no grupo etanol em relação ao grupo controle ($p = 0,0021$), onde o grupo tratado com 10 mg/L de ácido gálico apresentou diminuição da oxidação de DCFH ($p = 0,0018$) em relação ao grupo etanol. Os níveis de nitratos e nitritos não foram alterados ($p > 0,05$).

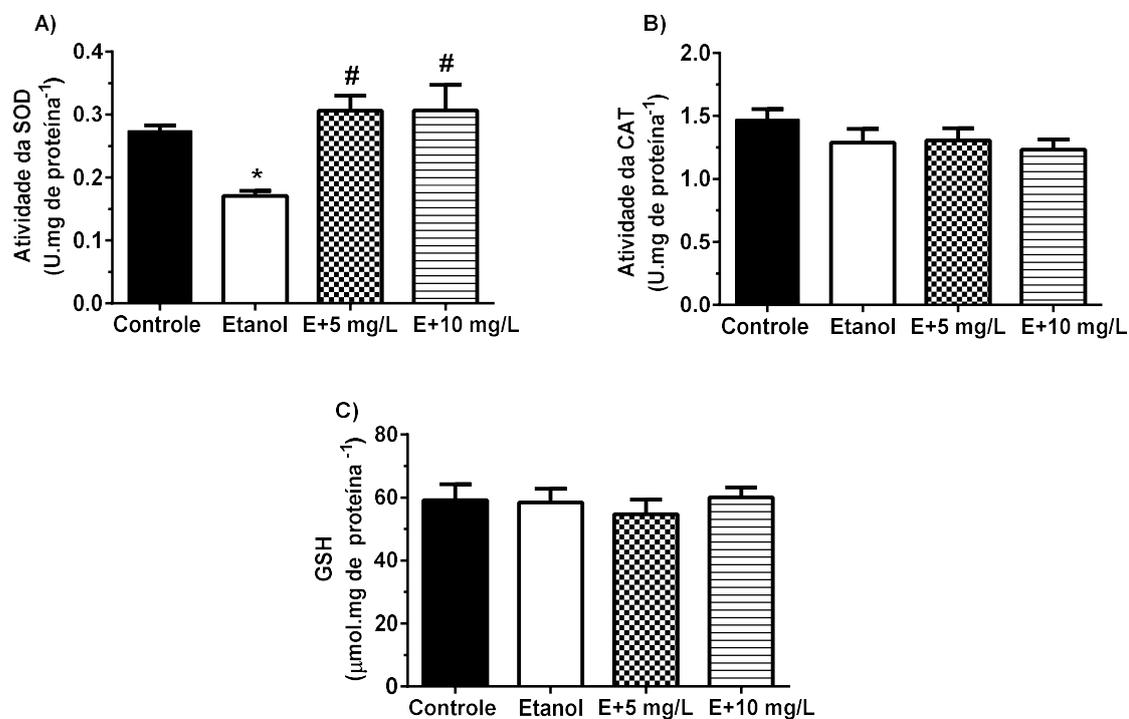
Figura 21 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre a oxidação de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH; A) e os níveis de nitratos e nitritos (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹ e μ mol.mg de proteína⁻¹, respectivamente. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle, ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo etanol (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



A avaliação das defesas antioxidantes foi caracterizada pela análise das enzimas SOD (Figura 22A) e CAT (Figura 22B) e a defesa antioxidante não enzimática por meio dos níveis de GSH em cérebro de peixe-zebra expostos ao etanol e posteriormente tratados com 5 e 10 mg/L de AG (Figura 22C). Uma significativa interação entre o AG e etanol foi constatada na atividade da SOD ($F_{3,15} = 6,113$, $p = 0,0063$, ANOVA de duas vias).

A análise post hoc demonstrou diminuição na atividade da SOD no grupo etanol em comparação ao grupo controle ($p = 0,0337$), enquanto que, os grupos tratados com 5 e 10 mg/L de ácido gálico apresentaram aumento em relação ao grupo etanol ($p = 0,0107$ e $p = 0,0102$, respectivamente). A atividade da CAT e os níveis de GSH não apresentaram diferença entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Figura 22 - Efeito do tratamento com ácido gálico nas concentrações de 5 e 10 mg/L após exposição ao etanol sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD; A), catalase (B) e sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH; C) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm erro padrão das médias de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em U.mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo etanol (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Tukey).



6 DISCUSSÃO

O AG tem emergido como um potencial candidato a fármaco neuroprotetor diante de injúrias oxidativas em virtude de sua ação antioxidante. Esse estudo procurou explorar o efeito do AG em peixes-zebra expostos ao etanol, uma condição que gera estresse oxidativo e alterações neuroquímicas. A princípio foi avaliado o efeito isolado desta substância nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L em cérebro de peixe-zebra expostos durante 24 e 48h sobre parâmetros de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser definido como um processo não fisiológico caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio e as defesas antioxidantes teciduais (SIES, 2015), logo, esta avaliação pode ser utilizada como um indicativo de toxicidade.

No estudo, o aumento verificado nos níveis de TBA-RS na concentração de 20 mg/L, em ambos os tempos de exposição, sugere lipoperoxidação. É descrito que a própria peroxidação lipídica é capaz de gerar espécies reativas que perpetuam este evento por meio de um processo em cadeia (BARBOSA et al. 2010). Provavelmente esta alteração ocorre pela presença de ERO, visto que a oxidação de DCFH nesta concentração estava aumentada, enquanto que os níveis de nitrato e nitrito não se alteraram, descartando a influência de ERN. Adicionalmente, nesta concentração, foi constatado aumento nos grupamentos sulfidríla e nenhuma alteração nos níveis de GSH. Logo, não se pode afirmar que houve dano proteico, visto que os grupamentos sulfidríla participam da rota metabólica da GSH e esta não sofreu modificações (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Em relação a atividade antioxidante dos animais tratados com 20 mg/L foi verificado somente aumento na atividade da catalase que pode estar relacionada a uma tentativa de corrigir o dano lipídico verificado.

As concentrações 5 e 10 mg/L não evidenciaram alterações nos parâmetros oxidativos, porém demonstraram aumento nas atividades das enzimas antioxidantes, sugerindo que estas concentrações possuem potencial efeito antioxidante no cérebro do peixe-zebra. Em testes *in vitro*, o AG revelou atividade antioxidante comparável ao derivado da vitamina E Trolox e ácido ascórbico (YEH et al., 2003). Sistemicamente diversos estudos *in vivo* revelam os benefícios da ação antioxidante do AG em doenças como obesidade (DLUDLA et al., 2018), cardiopatias (RADAN et al., 2019; YAN et al., 2019), diabetes (GARUD; KULKARNI, 2018), micoses

(SINGULANI et al, 2017; ZHAO et al., 2018) e sepsis (CHENG et al., 2018). Adicionalmente, distintos estudos em ratos e camundongos têm explicitado o efeito protetivo antioxidante do AG no SNC (NABAVI et al., 2016; SALEHI et al., 2018; SAMAD et al., 2019). Desta forma, analisando o efeito do AG *per se* sobre os parâmetros de estresse oxidativo, propõe-se que a concentração 20 mg/L de AG possui um perfil tóxico pró-oxidante e que as demais concentrações possuem ação antioxidante em cérebro de peixe-zebra, característica de um fenômeno de hormese.

Sabendo que alterações no balanço oxidativo levam a alterações neuroquímicas e comportamentais, o próximo passo foi avaliar se o AG isoladamente poderia desencadear mudanças comportamentais. O comportamento natural do peixe-zebra é tipificado pela constante atividade de natação afim de explorar o aquário integralmente (SIEBEL et al., 2015). Os resultados insinuem que o AG não influencia a locomoção do peixe-zebra, no entanto, a concentração de 20 mg/L revela um perfil exploratório intenso devido ao tempo imóvel e redução episódios de *freezing*, que se caracterizam por um estado de imobilidade e alerta onde todos os movimentos cessam, com excessão daqueles necessários a respiração (GODSIL et al., 2000). Notou-se que esta exploração se deu principalmente na parte superior do aparato, visto que o tempo de permanência nesta zona e o número de entrada foram significativamente maiores.

Estudos têm demonstrado que o tratamento do peixe-zebra com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, induz ao aumento da atividade exploratória dos animais especialmente no topo do aparato (GEBAUER et al., 2011; VOSSEN et al., 2020). Desta forma, poderia ser sugerido que a concentração de 20 mg/L de AG apresentou um perfil comportamental ansiolítico-símile. Porém, o teste claro/escuro não apresentou achados que indicassem atividade ansiolítica desta concentração. O teste claro/escuro possui a sensibilidade para análise de comportamentos de ansiedade em peixes-zebra, sendo uma ferramenta complementar importante para investigar o efeito de substâncias ansiolíticas sobre esse comportamento (MAXIMINO et al., 2012). Certamente, novos estudos são necessários para confirmar ou excluir esse efeito ansiolítico-símile do AG em peixe-zebra.

O AG na concentração de 20 mg/L apresentou uma diminuição na atividade da AChE, enzima responsável pela degradação da ACh, o que resulta no aumento dos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica levando a um excessivo estímulo de seus receptores (ANTYBORZEC et al., 2016). A lipoperoxidação

observada pode induzir alterações na permeabilidade e fluidez das membranas, causando perda da seletividade, alterações na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de aldeídos citotóxicos, como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal (HERNÁNDEZ et al., 2016). Esses eventos estão relacionados com o decréscimo da viabilidade neuronal (RENDÓN-RAMÍREZ et al., 2013). A AChE é uma enzima que se apresenta ancorada na membrana de neurônios pós-sinápticos, e uma alteração na membrana promovida pela peroxidação lipídica pode ocasionar prejuízos em sua função (LOPES et al., 2017). Nesse sentido, sugere-se que a intensidade exploratória exibida pelos animais expostos ao AG na concentração 20 mg/L tenha relação com uma possível ação tóxica, corroborando os eventos pró-oxidativos e colinérgicos demonstrados.

Apesar do crescente interesse sobre o efeito do AG no comportamento, as informações disponíveis ainda são dispersas e muitas vezes conflitantes nos diversos modelos experimentais. Em camundongos e ratos, a administração aguda de AG bloqueia a tensão psicomotora e a hiperatividade, resultando em uma atividade ansiolítica (DHINGRA et al., 2012; MANSOURI et al., 2013). Por outro lado, o AG está ativamente envolvido na proteção e restauração da função locomotiva em *Drosophila melanogaster* exposta a toxinas ambientais (JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010). Um recente estudo realizado em larvas de peixe-zebra demonstrou que uma breve exposição ao AG induz hiperexcitabilidade motoneuronal justificada por um comprometimento agudo do equilíbrio gabaérgico-glutamatérgico sem descartar a influência de outros sistemas (ANNONA et al., 2021). Este estudo reforça os achados encontrados na concentração de 20 mg/L levando a exclusão desta concentração nos testes com o etanol. As concentrações de 5 e 10 mg/L de AG não apresentaram alterações nos parâmetros colinérgicos e comportamentais. Não se pode descartar que o AG possa ter um efeito espécie-específica.

Assim sendo, o próximo passo foi estabelecer se as concentrações de 5 e 10 mg/L eram capazes de reverter os danos neuroquímicos gerados pelo etanol em cérebro de peixe-zebra. Há evidências claras que os efeitos sobre o SNC se devem à influência do etanol sobre o balanço inibitório/excitatório relacionado aos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos, embora outros receptores e neurotransmissores também estejam envolvidos na sua ação (CHATTERJEE et al., 2014; HARSHBERGER et al., 2016; ALEXANDRE, 2019). O etanol misturado ao ambiente do aquário é absorvido pelos vasos sanguíneos da brânquia e da pele dos

peixes-zebra, que rapidamente é difundido pela circulação sistêmica atingindo todos os tecidos (GERLAI ET AL., 2000; DLUGOS; RABIN, 2003; CHATTERJEE et al., 2014). DLUGOS e RABIN (2003) demonstraram que após 15 minutos de exposição ao etanol numa concentração de 0,5 % (v/v) um equilíbrio entre o nível de etanol no aquário e no cérebro do peixe-zebra foi alcançado e mantido por 24 horas. CHATTERJEE et al. (2014) descreveram alterações nos níveis de dopamina, serotonina, glutamato, GABA, aspartato, glicina e taurina em cérebro de peixe-zebra submetidos à exposição crônica de etanol.

Em relação ao sistema colinérgico, modelos de exposição aguda em peixe-zebra foi demonstrado aumento da atividade da AChE induzido pelo etanol (RICO et al, 2011). Ademais, o estudo revelou que a atividade da AChE não foi sensível ao efeito prolongado do etanol. De maneira análoga, o tratamento com AG não alterou a cinética desta enzima. Estudos realizados em modelos de amnésia induzida por escopolamina (NAGPAL et al., 2013) e Doença de Alzheimer (OBOH et al., 2016; de OLIVEIRA et al., 2018) demonstraram que o AG diminuiu a atividade da AChE que se encontra elevada nestas doenças, revertendo o acúmulo de ACh na fenda sináptica. Estes autores sugerem um perfil neuromodulatório do AG na neurotransmissão colinérgica. Considerando essas informações, como o etanol não gerou prejuízo cinético a AChE, igualmente não houve alteração da atividade pelo AG no estudo.

Os dados, confirmaram que o etanol reduziu a atividade da ChAT. Dados similares aos obtidos foram descritos por AGOSTINI et al. (2018), em modelo de exposição crônica ao etanol, e por BERNARDO et al. (2019), em modelo de *binge drink*. Estes estudos demonstram a influência direta do etanol sobre a cinética desta enzima, visto que o imunoconteúdo da mesma não foi alterado. Os mesmos autores sugerem o estresse oxidativo gerado pelo etanol nos neurônios colinérgicos como fonte do prejuízo no funcionamento de suas enzimas. A enzima colinérgica ChAT é responsável pela síntese de ACh a partir da ligação entre acetil-coenzima A e colina nas varicosidades neuronais parassimpáticas, logo, a diminuição da atividade desta enzima gera um decaimento nos níveis deste neurotransmissor levando a alterações cognitivas e comportamentais (ABREU-VILLAÇA et al., 2016; GAWEL et al., 2017). O tratamento com o AG na concentração de 5 mg/L não foi capaz de reverter o dano na atividade enzimática da ChAT, todavia, na concentração de 10 mg/L houve a reversão do efeito lesivo. Outrossim, estudos com compostos fenólicos em doenças

neurodegenerativas comprovaram aumento na atividade desta enzima após o tratamento (KHAN et al., 2012; DOU et al., 2018; KONG et al., 2019), associando este benefício com a capacidade antioxidante destes compostos.

Uma vez percebido os efeitos deletérios do etanol sobre o sistema colinérgico e conhecendo da importância deste sistema nas funções cognitivas e comportamentais, o estudo investigou o efeito do AG sobre o peixe-zebra após exposição ao etanol. Não foi percebido dano locomotivo nos animais testados, não obstante, o grupo etanol apresentou perfil ansiolítico-símile em relação ao grupo controle observado nos parâmetros de tempo imóvel, episódio de *freezing* e tempo na parte superior do aparato. O comportamento ansiolítico induzido pelo etanol já foi descrito em estudos com peixe-zebra expostos em diferentes concentrações e período de tempo (BAIAMONTE et al., 2016; TRAN et al., 2016; BERNARDO et al., 2019). Os animais tratados com 10 mg/L de AG apresentaram menor tempo de permanência no topo em relação ao grupo etanol, porém os animais tratados com 5 mg/L diminuíram todos os parâmetros alterados pelo etanol demonstrando ser mais efetivo em reverter os efeitos comportamentais gerados por esta substância.

Estudos em ratos têm demonstrado que após uma situação de estresse, os animais tratados com AG demonstram característica ansiolítica-símile (DHINGRA et al., 2012; MONU YADAV et al., 2018). Os resultados evidenciaram que o perfil ansiolítico foi identificado no grupo exposto somente ao etanol e no caso do tratamento com AG, esse padrão não se manteve, ao contrário, reestabeleceu o modelo obtido no grupo controle. Um estudo realizado por MOGHADAS et al. (2015), ratificou que o tratamento com AG modulou o protótipo ansioso e depressivo de camundongos em modelo de intoxicação por cloreto de tributilestanho. Dessa forma, pode-se propor que o AG apresentou perfil modulatório comportamental diante do insulto com etanol.

Estudos relacionam o estresse oxidativo aos detriments no sistema colinérgico, bem como, no comportamento (PATIL et al., 2015; AMIN et al., 2016). Um estudo realizado por TIWARI e CHOPRA (2013) em ratos tratados cronicamente com etanol atestou a presença de estresse oxidativo e lesão no sistema colinérgico, a qual foi revertido pela administração do antioxidante resveratrol. Neste sentido, para verificar a presença de estresse oxidativo no cérebro de peixe-zebra expostos ao etanol e tratado com AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L, foram avaliados danos oxidativos a proteínas e lipídeos por meio da determinação de conteúdo de

grupos sulfidrilas e dos níveis de TBA-RS, respectivamente. No modelo experimental utilizado, não foi verificada diferença no conteúdo de grupos sulfidrilas entre os grupos avaliados, assim como, nos níveis de GSH, descartando o dano proteico. Porém, observou-se que os níveis de TBA-RS se encontram significativamente aumentados nos grupos expostos ao etanol em comparação ao grupo controle, indicando a presença de peroxidação lipídica. O tratamento com AG nas duas concentrações testadas reverteu estes níveis.

Uma vez notado o aumento de peroxidação lipídica, foi avaliada a geração de espécies reativas, por intermédio da determinação dos níveis de nitratos e nitritos e pela oxidação do DCFH. No estudo, não foi possível observar aumento nos níveis de nitratos e nitritos. Por outro lado, houve incremento da oxidação do DCFH no cérebro dos peixes-zebra expostos ao etanol, que é um indicativo de produção de ERO. Estudos atribuíram que a maior parte das ERO produzidas pelo consumo de etanol são provenientes de seu metabolismo (SHAH et al., 2015). Foi descrito que o consumo prolongado de etanol induz a via de metabolização associada a enzima CYP2E1, e que este processo metabólico está diretamente relacionado ao aumento de ERO (HAORAH et al., 2007). Conquanto, o tratamento com AG na concentração de 10 mg/L restringiu a oxidação do DCFH gerada pelo etanol, ou seja, reduziu a presença de ERO no cérebro do zebrafish. Estudos têm demonstrado o efeito neuroprotetivo do AG devido a sua alta capacidade “sequestrante” de radicais livres (como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila), pela eficácia em atenuar a ruptura do potencial da membrana mitocondrial, por efeitos quelantes de metal e também pela capacidade de interagir com vias de transdução de sinal de diferentes enzimas (DAGLIA et al., 2014; NABAVI et al., 2016). Adicionalmente, um estudo de MANSOURI et al. (2013) demonstrou que o AG reverteu o dano oxidativo gerado pelo 6-OHDA num modelo de doença de Parkinson em cérebro de ratos.

Como mencionado anteriormente, além de suas propriedades de eliminação de radicais livres, o AG aumenta a capacidade enzimática. Um estudo realizado por CHANDRASEKHAR et al. (2018) em modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA, revelou que após a decretação da expressão do fator de transcrição nuclear eritroide 2 (Nrf2) induzido por esta neurotoxina, o AG recuperou os níveis deste fator melhorando o perfil oxidativo e as lesões nos neurônios dopaminérgicos. Em condições de estresse oxidativo, a ligação de Nrf2 ao elemento de resposta antioxidante leva à transcrição de várias enzimas antioxidantes, especialmente SOD

e CAT (WANG et al., 2016). Isso pode justificar em princípio, o aumento da atividade da SOD observado no estudo, nos grupos tratados e nas duas concentrações testadas de AG após a exposição ao etanol. O grupo etanol, no entanto, apresentou diminuição na atividade da SOD em relação ao grupo controle. Isso já foi verificado em estudos prévios, sugerindo um efeito direto do etanol na atividade desta enzima (OTUNOLA et al., 2016; GONG et al., 2017).

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do radical superóxido e produzindo peróxido de hidrogênio, substrato da enzima CAT (HALLIWELL, 2012). Nos resultados, não houve diferença na atividade da CAT entre os grupos analisados. Esta enzima participa do processo de metabolismo do etanol, utilizando como substrato o próprio etanol e o peróxido de hidrogênio produzido por outra enzima que participa deste processo, a CYP2E1 (SCOLARO et al., 2012). Logo, como o estudo aborda um modelo prolongado de exposição ao etanol, possivelmente a concentração de peróxido de hidrogênio e de etanol, possivelmente devido a um processo adaptativo, não influenciaram na atividade da catalase. O tratamento com o AG não apresentou alteração na atividade desta enzima, sugerindo uma possível ação modulatória desta substância.

7 CONCLUSÃO

Tomado em conjunto, os resultados do estudo sugerem que a concentração de 20 mg/L de AG parece ser tóxica ao nível oxidativo, comportamental e colinérgico ao cérebro do peixe-zebra. Além disso, o AG nas concentrações de 5 e 10 mg/L revertem as lesões neuroquímicas e comportamentais induzidas pela exposição prolongada ao etanol em cérebro de peixe-zebra, e que este mecanismo está associado principalmente ao balanço oxidativo. Este estudo abre perspectiva para que o AG seja abordado em novos estudos como uma molécula terapêutica diante de insultos e/ou doenças de fisiopatologia relacionada ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A.; YOUSEF, A.I.; ABDEL-TWAB, S.M.; et al. Gallic acid and p-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 4, p. 1279-1286, 2017.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; CORREA-SANTOS, M.; DUTRA-TAVARES, A.C.; et al. A ten fold reduction of nicotine yield in tobacco smoke does not spare the central cholinergic system in adolescent mice. **Int J Dev Neurosci**, v. 52, p. 93-103, 2016.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGOSTINI, J.F.; DAL TOÉ, H.C.Z.; VIEIRA, K.M.; et al. Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol. **Neurotox Res**, v. 33, n. 4, p. 749-758, 2018.
- AGOSTINI, J.F.; COSTA, N.L.F.; BERNARDO, H.T.; et al. Ceftriaxone Attenuated Anxiety-Like Behavior and Enhanced Brain Glutamate Transport in Zebrafish Subjected to Alcohol Withdrawal. **Neurochem Res**, v. 45, n. 7, p. 1526-1535, 2020.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- ALBUQUERQUE, E.X.; PEREIRA, E.R.F.; ALKONDON, M.; ROGERS, S.W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. **Physiol Rev**, v. 98, p. 73-120, 2009.
- ALEXANDRE, M.C.M.; MENDES, N.V.; TORRES, C.A.; et al. Weekly ethanol exposure alters dopaminergic parameters in zebrafish brain. **Neurotoxicol Teratol**, v. 75, 2019.
- AMIN, F.U.; SHAH, S.A.; KIM, M.O. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. **Neurochem Int**, v. 96, p. 1-12, 2016.
- ANNONA, G.; TARALLO, A.; NITTOLI, V. Short-term exposure to the simple polyphenolic compound gallic acid induces neuronal hyperactivity in zebrafish larvae. **Eur J Neurosci**, v. 53, n. 5, p. 1367-1377, 2021.
- ANTYBORZEC, I.; VALERIE, B.; O'LEARY. Low-Affinity Neurotrophin Receptor p75 Promotes the Transduction of Targeted Lentiviral Vectors to Cholinergic Neurons of Rat Basal Forebrain. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 859-870, 2016.
- ARENDRT, T.; HENNIG, D.; GRAY, J.A.; MARCHBANKS R. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. **Brain Res Bull**, v. 21, n. 4, p. 563-569, 1988.

ARENZANA, F.J.; CLEMENTE, D.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, R.; et al. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. **Brain Res Bull**, v. 66, n. 4-6, p. 421-425, 2005.

AUGUSTYNIAK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. **Metab Brain Dis**, v. 25, n. 4, p. 381-389, 2010.

BAIAMONTE, M.; PARKER, M.O.; VINSON, G.P.; et al. Sustained Effects of Developmental Exposure to Ethanol on Zebrafish Anxiety-Like Behaviour. **PLoS One**, v. 11, n. 2, 2016.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BAGNARDI, V.; BANGIARDO, M.; LA VECCHIA, C.; CORRAO, G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. **Br J Cancer**, v. 85, p. 1700-1705, 2001.

BAGNARDI, V.; ROTA, M.; BOTTERI, E.; et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 112, p. 580-593, 2015

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Adv**, v. 5, p. 27540-27557, 2015.

BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr Campinas**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENSAAD, L.A.; KIM, K.H.; QUAH, C.C.; et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, p. 47, 2017.

BERNARDO, H.T. Modelo de exposição intermitente ao etanol altera parâmetros do sistema colinérgico, estresse oxidativo e comportamento em peixe-zebra. [Dissertação de mestrado]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; 2017.

BERNARDO, H.T.; AGOSTINI, J.F.; DAL TOÉ, H.C.Z.; et al. Cholinergic system and exploratory behavior are changed after weekly-binge ethanol exposure in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 186, 2019.

BHATT, I.D.; RAWAT, S.; BADHANI, A.; RAWAL, R.S. Nutraceutical potential of selected wild edible fruits of the Indian Himalayan region. **Food Chem**, v. 215, p. 84-91, 2017.

BLANK, M.; GUERIM, L.D.; CORDEIRO, R.F.; VIANNA, M.R. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 4, p. 529-534, 2009.

BOEHMLER, W.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; CANFIELD, V.; et al. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. **Dev Dyn**, v. 230, n. 3, p. 481-491, 2004.

BOUTROS, N.; SEMENOVA, S.; WEN LIU; et al. Adolescent intermittent ethanol exposure is associated with increased risky choice and decreased dopaminergic and cholinergic neuron markers in adult rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 2, p. 1-9, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 218-254, 1976.

BROUSSE, G.; ARNAUD, B.; VORSPAN, F.; et al. Alteration of glutamate/GABA balance during acute alcohol withdrawal in emergency department: a prospective analysis. **Alcohol Alcohol**, v. 47, n. 5, p. 501-508, 2012.

CAO, Y.Y.; GIOVANNUCCI, E.L. Alcohol as a risk factor for cancer. *Seminars in Oncology*. **Nursing**, v. 32, n. 3, p. 325-331, 2016.

CHAO, L.P.; WOLFGRAM, F. Purification and some properties of choline acetyltransferase. **J Neurochem**, v. 20, p. 1975-1981, 1973.

CHANDRASEKHAR, Y.; PHANI KUMAR, G.; RAMYA, E.M.; ANILAKUMAR, K.R. Gallic Acid Protects 6-OHDA Induced Neurotoxicity by Attenuating Oxidative Stress in Human Dopaminergic Cell Line. **Neurochem Res**, v. 43, n. 6, p. 1150-1160, 2018.

CHATTERJEE, D.; SHAMS, S.; GERLAI, R. Chronic and acute alcohol administration induced neurochemical changes in the brain: comparison of distinct zebrafish populations. **Amino Acids**, v. 46, n. 4, p. 921-930, 2014.

CHENG, Y.; LI, X.; TSE, H.F.; RONG, J. Gallic Acid-L-Leucine Conjugate Protects Mice against LPS-Induced Inflammation and Sepsis via Correcting Proinflammatory Lipid Mediator Profiles and Oxidative Stress. **Oxid Med Cell Longev**, v. 25, 2018.

COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; LEONCINI, S.; et al. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. **Genes Nutr**, v. 5, p. 101-109, 2010.

DAGLIA, M.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S.F.; et al. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! **Curr Pharm Biotechnol**, v. 15, n. 4, p. 362-372, 2014.

DAL SANTO, G.; CONTERATO, G. M. M.; BARCELLOS, L. J. G.; et al. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neurosci Lett**, v. 558, p. 103-108, 2014.

de OLIVEIRA, L.S.; THOMÉ, G.R.; LOPES, T.F.; et al. Effects of gallic acid on delta - aminolevulinic dehydratase activity and in the biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 1291-1299, 2016.

de OLIVEIRA, T.S.; THOMAZ, D.V.; DA SILVA NERI, H.F.; et al. Neuroprotective Effect of Caryocar brasiliense Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, 2018.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R.; GUPTA, A. Antianxiety-Like Activity of Gallic Acid in Unstressed and Stressed Mice: Possible Involvement of Nitriergic System. **Neurochem Res**, v. 37, p. 487–494, 2012.

DLUDLA, P.V.; NKAMBULE, B.B.; JACK, B.; et al. Inflammation and oxidative stress in an obese state and the protective effects of gallic acid. **Nutrients**, v. 11, 2019.

DLUGOS, C.A.; RABIN, R.A. Ethanol effects on three strains of zebrafish: a model system for genetic investigations. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 471-480, 2003.

DONADO-PESTANA, C.M.; DOS SANTOS-DONADO, P.R.; DAZA, L.D.; et al. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. **Food Res Int**, v. 103, p. 40-47, 2018.

DOU, Y.; LUO, J.; WU, X.; et al. Curcumin attenuates collagen-induced inflammatory response through the “gut-brain axis.” **J Neuroinflammation**, v. 15, p. 1–15, 2018.

EBARASI, L.; ODDSSON, A.; HULTENBY, K.; et al. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 20, n. 4, p. 416-424, 2011.

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

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, R.M.; FEATHER-STONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FEIN, G.; MEYERHOFF, D.J. Ethanol in human brain by magnetic resonance spectroscopy: correlation with blood and breath levels, relaxation, and magnetization transfer. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 24, n. 8, p. 1227-1235, 2000.

FERREIRA, B.K. Administração crônica de galactose induz dano oxidativo a biomoléculas em testículo de ratos: relevância para a galactosemia [trabalho de conclusão de curso]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Curso de Farmácia, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde; 2016.

GANNE-CARRIÉ, N.; NAHON, P. Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. **J Hepatol**, v. 70, n. 2, p. 284-293, 2019.

GARUD, M.S.; KULKARNI, Y.A. Gallic acid attenuates type I diabetic nephropathy in rats. **Chem Biol Interact**, v. 282, p. 69-76, 2018.

GAWEL, K.; GIBULA-BRUZDA, E.; DZIEDZIC, M.; et al. Cholinergic activation affects the acute and chronic antinociceptive effects of morphine. **Physiol Behav**, v. 169, p. 22-32, 2017.

GEBAUER, D.L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A.L.; et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, n. 3, p. 480-486, 2011.

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 Behav**, v. 67, p. 773-782, 2000.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacol, Biochem Behav**, v. 85, p. 752-761, 2006.

GIOVANNINI, M.G.; LANA, D.; PEPEU, G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 119, p. 18-33, 2015.

GODSIL B.P.; QUINN J.J.; FANSELOW, M.S. Body temperature as a conditional response measure for pavlovian fear conditioning. **Learn. Mem.** v.7, n. 5, p. 353-356, 2000.

GOEL S.; SHARMA, A.; GARG, A. Effect of Alcohol Consumption on Cardiovascular Health. **Curr Cardiol Rep**, v. 20, n. 4, p. 19, 2018.

GÖKÇEK-SARAÇ, Ç.; AKÇAY, G.; KARAKURT, S.; et al. Possible effects of different doses of 2.1 GHz electromagnetic radiation on learning, and hippocampal levels of cholinergic biomarkers in Wistar rats. **Electromagn Biol Med**. v. 40, n. 1, p. 179-190, 2021.

GONG, Y.S.; GUO, J.; HU, K.; et al. Chronic ethanol consumption and thiamine deficiency modulate β -amyloid peptide level and oxidative stress in the brain. **Alcohol Alcohol**, v. 52, p. 159–164, 2017.

GOUVEIA, V.V.; DA SILVA, L.D.; ATHAYD, R.A.A.; et al. Atitudes frente ao álcool e o potencial bebedor-problema: correlatos demográficos e psicossociais. **Rev Bioet**, v. 17, n. 2, p. 251–266, 2009.

GOTTI, C.; CLEMENTI, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Prog. Neurobiol**, v. 74, n. 6, p. 363-396, 2004.

GUASCH-FERRÉ, M.; MERINO, J.; SUN, Q.; et al. Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, 2017.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 502, n. 2, p. 183-186, 2018.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HAORAH, J.; KNIFE, B.; GORANTLA, S.; et al. Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. **J Neurochem**, v. 100, p. 324–336, 2007.

HARSHBERGER, E.; GILSON, E.A.; GILLETT, K.; et al. nor-BNI Antagonism of kappa opioid agonist-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. **J Addict**, v. 1, p. 1-8, 2016.

HASEBA, T.; KAMEYAMA, K.; MASHIMO, K.; OHNO, Y. Dose-dependent change in elimination kinetics of ethanol due to shift of dominant metabolizing enzyme from ADH 1 (Class I) to ADH 3 (Class III) in mouse. **Int J Hepatol**, v. 1, p. 1-8, 2012.

HERNÁNDEZ, J.A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R.C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxid Med Cell Longev**, v. 1, p. 1-15, 2016.

HIPÓLITO, L.; SANCHEZ, M.J.; POLACHE, A.; GRANERO, L. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. **Curr Drug Metab**, v. 8, n. 7, p. 716-727, 2007.

HOWE, K.; CLARK, M.; TORROJA, C.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. The Effects of Polyphenols on Survival and Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster* Exposed to Iron and Paraquat. **Neurochem Res**, v. 35, p. 227–238, 2010.

KALUEFF, A.V.; KALUYEVA, A.; MAILLET, E.L. Anxiolytic-like effect of noribogaine in zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 330, p. 63-67, 2017.

KARAHANIAN, E.; QUINTANILLA, M.E.; TAMPIER, L.; et al. Ethanol as a pro drug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 4, p. 606-612, 2011.

KARIMI, E.; MEHRABANJOUANI, P.; KESHAVARZIAN, M.; et al. Identification and Quantification of phenolic and flavonoid components in straw and seed husk of some rice varieties (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant properties. **J. Sci. Food Agric**, p. 65-67, 2014.

- KASLIN, J.; PANULA, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). **J Comp Neurol**, v. 440, n. 4, p. 342-377, 2001.
- KELSO, M.L.; LIPUT, D.J.; EAVES, D.W.; NIXON, K. Upregulated vimentin suggests new areas of neurodegeneration in a model of an alcohol use disorder. **Neurosc**, v. 197, p. 381-393, 2011.
- KIM, Y.J.; NAM, R.H.; YOO, Y.M.; LEE, C.J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurosci Lett**, v. 355, n. 12, p. 29-32, 2004.
- KHAN, M.B.; KHAN, M.M.; KHAN, A.; et al. Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular- streptozotocin in rat model. **Neurochem Int**, v. 61, p. 1081–1093, 2012.
- KNOTT, C.; BELL, S.; BRITTON, A. Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of More Than 1.9 Million Individuals From 38 Observational Studies. **Diabetes Care**, v. 38, n. 9, p. 1804-1812, 2015.
- KOEHLER, B.C.; ARSLIC-SCHMITT, T.; PECCERELLA, T.; et al. Possible mechanisms of ethanol-mediated colorectal carcinogenesis: the role of cytochrome P4502E1, etheno-DNA adducts, and the anti-apoptotic protein Mcl-1. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 10, p. 2094-2101, 2016.
- KONG, D.; YAN, Y.; HE, X.Y.; et al. Effects of Resveratrol on the Mechanisms of Antioxidants and Estrogen in Alzheimer's Disease. **Biomed Res Int**, 2019.
- KUMAR, R.; LÅNGSTRÖM, B.; DARREH-SHOR, T. Novel ligands of Choline Acetyltransferase designed by in silico molecular docking, hologram QSAR and lead optimization. **Sci Rep**, v. 6, p. 312-347, 2016.
- LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, v. 5, p. 2217-231, 1992.
- LEE, S.L.; CHAU, G.Y.; YAO, C.T.; WU, C.W.; YIN, S.J. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, n. 7, p. 1132-1142, 2006.
- LEGGIO, L.; LEE, M.R. Treatment of Alcohol Use Disorder in Patients with Alcoholic Liver Disease. **Am J Med**, v. 130, n. 2, p. 124-134, 2017.
- LI, Z.J.; LIU, M.; DAWUTI, G.; et al. Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. **Phytother Res**, v. 31, n. 7, p. 1039-1045, 2017.
- LIESCHKE, G.J.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LOPES, F.M.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G.; DA ROSA, C.E. Glyphosate Adversely Affects Danio rerio Males: Acetylcholinesterase Modulation and Oxidative Stress. **Zebrafish**, v. 14, p. 97–105, 2017.

MANSOURI, M.T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M.J.; et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chem**, v. 138, n. 2, p. 1028-1033, 2013.

MARCHI, K.C.; CERON, C.S.; MUNIZ, J.J.; DE MARTINIS, B.S.; et al. NADPH oxidase plays a role on ethanol-induced hypertension and reactive oxygen species generation in the vasculature. **Alcohol Alcohol**, v. 51, n. 5, p. 522-534, 2016.

MARCON, M.; MOCELIN, R.; DE OLIVEIRA, D.; et al. Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 145–152, 2019.

MÁRQUEZ, K.; PÉREZ-NAVARRO, J.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; et al. Systematic study of hydroxyl radical production in white wines as a function of chemical composition. **Food Chem**, v. 288, p. 377-385, 2019.

MAXIMINO, C.; BENZECRY, R.; MATOS, K.R.O.; et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. 10–12, p. 1099-1123, 2012.

MCGOVERN, P.E. *Uncorking the past: The quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. Berkley: University of California Press. 2009.

MCKAY, E.B.; PLACZEK, A.N. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 8, p. 1120-1133, 2007.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MOCELIN, R.; MARCON, M.; D'AMBROS, S.; et al. Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Neurochem Res**, v. 43, n. 2, p. 458-464, 2018.

MOGHADAS, M.; EDALATMANESH, M.A.; ROBATI, R. Histopathological Analysis from Gallic Acid Administration on Hippocampal Cell Density, Depression, and Anxiety Related Behaviors in A Trimethyltin Intoxication Model. **Cell J**, v. 17, n. 4, p. 659-667, 2016.

MOHAMMED, Y.I.; KUROGI, K.; SHABAN, A.A.; et al. Identification and characterization of zebrafish SULT1 ST9, SULT3 ST4, and SULT3 ST5. **Aquat Toxicol**, v. 11, n. 8, p. 112-113, 2012.

MOHANTY, R.; DAS, S.K.; SINGH, N.R.; PATRI, M. Withania Somnifera leaf extract ameliorates benzo[a]pyrene-induced behavioral and neuromorphological alterations

by improving brain antioxidant status in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 13, p. 188–196, 2016.

MOHANTY, R.; DAS, S.K.; PATRI, M. Modulation of Benzo[a]Pyrene Induced Anxiolytic-Like Behavior by Retinoic Acid in Zebrafish: Involvement of Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. **Neurotox Res**, v. 1, p. 1-12, 2017.

MONU YADAV, M.; JINDAL, D.K.; DHINGRA, M.S.; et al. Protective effect of gallic acid in experimental model of ketamine-induced psychosis: possible behaviour, biochemical, neurochemical and cellular alterations. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 413-424, 2018.

MUELLER, T.; VERNIER, P.; WULLIMANN, M.F. The adult nervous central cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. **Brain Research**, v. 1011, p. 156-169, 2004.

MURPHY, M. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, p. 1-13, 2009.

NA, H.K.; LEE, J.Y. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, p. 11-16, 2017.

NABAVI, S.F.; HABTEMARIAM, S.; DI LORENZO, A.; et al. Post-stroke depression modulation and in vivo antioxidant activity of gallic acid and its synthetic derivatives in a murine model system. **Nutrients**, v. 8, 2016.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (US). Alcohol's Effects on the Body. NIAAA Newsletter; 2019.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Nanoparticle mediated brain targeted delivery of gallic acid: in vivo behavioral and biochemical studies for protection against scopolamine-induced amnesia. **Drug Deliv**, v. 20, n. 3-4, p. 112-119, 2013.

NUNES, M.E.; MÜLLER, T.E.; BRAGA, M.M.; et al. Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. **Mol Neurobiol**, v. 1, p. 1-10, 2016.

OBERNIER, J.A.; WHITE, A.M.; SWARTZWELDER, H.S.; CREWS, F.T. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, n. 3, p. 521-532, 2002.

OBOH, G.; OGUNRUKU, O.O.; OYELEYE, S.I.; et al. Phenolic Extracts from *Clerodendrum volubile* Leaves Inhibit Cholinergic and Monoaminergic Enzymes Relevant to the Management of Some Neurodegenerative Diseases. **J Diet Suppl**, v. 14, n. 3, p. 337-358, 2017.

OFEK, K.; SOREQ, H. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. **Chem Biol Interact**, v. 203, n. 1, p. 113-119, 2013.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Res Int**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OTUNOLA, G.A.; AFOLAYAN, A.J. Therapeutic effect of aqueous extracts of three dietary spices and their mixture on lipid metabolism and oxidative stress in a rat model of chronic alcohol consumption. **Pak J Pharm Sci**, v. 29, p. 1155–1161, 2016.

OZCAN, A.; OGUN, M. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In: Gowder SJT, editor. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Rijeca: InTech; 2015.

PALA, F.S.; GÜRKAN, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. **Adv Mol Biol**, v. 1, p. 1-9, 2008.

PANG, K.S. Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette review series). **Drug Metabo Dispos**, v. 31, n. 12, p. 1507-1519, 2003.

PAQUOT, N. Le métabolisme de l'alcool [The metabolism of alcohol]. **Rev Med Liege**, v.74, n. 5-6, p. 265-267, 2019.

PATIL, S.; TAWARI, S.; MUNDHADA, D.; NADEEM, S. Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 136, p. 13–20, 2015.

PEANA, A.T.; ROSAS, M.; PORRU, S.; ACQUAS, E. From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. **J Exp Neurosci**, v. 10, p. 137-146, 2016.

PENG, J.; WAGLE, M.; MUELLER, T.; et al. Ethanol modulated camouflage response screen in zebrafish uncovers a novel role for cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in behavioral sensitivity to ethanol. **J Neurosci**, v. 29, n. 26, p. 8408-8418, 2009.

PERAZZOLI, M.R.; PERONDI, C.K.; BARATTO, C.M.; et al. Gallic Acid and Dodecyl Gallate Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Acute and Chronic Hepatotoxicity by Enhancing Hepatic Antioxidant Status and Increasing p53 Expression. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 4, p. 425-434, 2017.

PEREIRA, M.M.; DE MORAIS, H.; DOS SANTOS SILVA, E.; et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 5, p. 1573-1584, 2018.

PUDDEY, I.B.; MORI, T.A.; BARDEN, A.E.; BEILIN, L.J. Alcohol and Hypertension- New Insights and Lingering Controversies. **Curr Hypertens Rep**, v. 21, n. 10, p. 79, 2019.

QUERTEMONT, E.; TAMBOUR, S.; TIRELLI, E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. **Prog Neurobiol**, v. 75, p. 247-274, 2005.

RADAN, M.; DIANAT, M.; BADA VI, M.; et al. Gallic acid protects particulate matter (PM₁₀) triggers cardiac oxidative stress and inflammation causing heart adverse events in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 18, p. 18200-18207, 2019.

RALEVSKI, E.; PETRAKIS, I.; ALTEMUS, M. Heart rate variability in alcohol use: A review. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 176, p. 83-92, 2019.

RAMIREZ-LOPEZ, L.M; MCGLYNN, W.; GOAD, C.L.; MIRELES DEWITT, C.A. Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Food Chem**, v. 149, p. 15-24, 2014.

RAO, P.S.S.; SARI, Y. Glutamate Transporter 1: target for the treatment of alcohol dependence. **Curr Med Chem**, v. 19, p. 5148-5156, 2012.

RASINES-PEREA, Z.; TEISSEDRE, P.L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. **Molecules**, p. 1-22, 2017.

REDDY, S.K.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E.C.; et al. Dose response of ethanol ingestion on antioxidante defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 977-987, 1999.

RENDÓN-RAMÍREZ, A.; CORTÉS-COUTO, M.; MARTÍNEZ-RIZO, A.B.; et al. Oxidative damage in young alcohol drinkers: A preliminary study. **Alcohol**, v. 47, n. 7, p. 501-504, 2013.

RHOADS, D.E.; CONTRERAS, C.; FATHALLA, S. Brain levels of catalase remain constant through strain, developmental, and chronic alcohol challenges. **Enzyme Res**, v. 1, p. 1-6, 2012.

RICO, E.P.; SENGER, M.R.; FAUTH, M.D.A.G.; et al. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sci**, v. 73, n. 16, p. 2071-2082, 2003.

RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; LANGONI, A.D.A.S.; et al. Chronic etanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 6, p. 871-878, 2011.

RINK E, GUO S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. **Neuroscience**, v. 127, n. 1, p. 147-154, 2004.

ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R.; VANG, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 451-460, 2003.

ROMANO, A.; SERVIDDI OB, G.; CALCAGNINIA, S.; et al. Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: focus on 4-hydroxy-2-nonenal. **Free Radic Biol Med**, v. 5849, n. 16, p. 31147-31149, 2017.

ROSEMBERG, D.B.; RICO, E.P.; MUSSULINI, B.H.; et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS One**, v. 6, n. 5, 2011.

RUSSO, G.L.; TEDESCO, I.; SPAGNUOLO, C.; RUSSO, M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? **Semin Cancer Biol**, v. 46, p. 1-13, 2017.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**, v. 24, n. 10, p. 453-462, 2014.

SALEHI, A.; RABIEI, Z.; SETORKI, M. Effect of gallic acid on chronic restraint stress-induced anxiety and memory loss in male BALB/c mice. **Iran J Basic Med Sci**, v. 21, n. 12, p. 1232-1237, 2018.

SAMAD, N.; JABEEN, S.; IMRAN, I.; et al. Protective effect of gallic acid against arsenic-induced anxiety-/depression- like behaviors and memory impairment in male rats. **Metab Brain Dis**, v. 34, p. 1091-1102, 2019.

SCHNEIDER, R.J.R.; BANDIERA, S.; SOUZA, D.G.; et al. N-acetylcysteine Prevents Alcohol Related Neuroinflammation in Rats. **Neurochem Res**, v. 42, n. 8, p. 2135-2141, 2017.

SCOLARO, B.; DE LIMA, D.D.; DA CRUZ, J.G.P.; DALMAGRO, D.D. Mate Tea Prevents Oxidative Stress in the Blood and Hippocampus of Rats with Acute or Chronic Ethanol Administration. **Oxid Med Cell Longev**, v. 31, p. 47-58, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHAH, A.S.; YOON, G.H.; KIM, M.O. Protection of the developing brain with anthocyanins against ethanol-induced oxidative stress and neurodegeneration. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 3, p. 1278-1291, 2015.

SHAO, Y.; LUO, W.; GUO, Q.; et al. In vitro and in vivo effect of hyaluronic acid modified, doxorubicin and gallic acid co-delivered lipid-polymeric hybrid nano-system for leukemia therapy. **Drug Des Devel Ther**, v. 28, n. 13, p. 2043-2055, 2019.

SIDDIQUI, S.; KAMAL, A.; KHAN, F.; et al. Gallic and vanillic acid suppress inflammation and promote myelination in an in vitro mouse model of neurodegeneration. **Mol Biol Rep**, v. 46, n. 1, p. 997-1011, 2019.

SIEBEL, A.M.; BONAN, C.D.; DA SILVA, R.S. **Zebrafish como modelo para estudos comportamentais**. 2015.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SINGULANI, J.L.; SCORZONI, L.; GOMES, P.C.; et al. Activity of gallic acid and its ester derivatives in *Caenorhabditis elegans* and zebrafish (*Danio rerio*) models. **Future Med Chem**, v. 9, n. 16, p. 1863-1872, 2017.

SKRZYPCZAK-JANKUN, E.; JANKUN, J. Theaflavin digallate inactivates plasminogen activator inhibitor: Could tea help in Alzheimer's disease and obesity? **Int. J. Mol. Med**, v. 26, p. 45–50, 2010.

SOLARI, N.; HANGYA, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. **Eur J Neurosci**, v. 48, n. 5, p. 2199-2230, 2018.

SPAGNUOLO, C.; NAPOLITANO, M.; TEDESCO, I.; et al. Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. **Curr Top Med Chem**, v. 16, n. 17, p. 1943-1950, 2016.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food Chem Toxicol**, v.41, p. 753–758, 2003.

STERN, H.M.; ZON, L.I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 7, p. 533-539, 2003.

SUN, A.Y.; SUN, G.Y. Ethanol and Oxidative Mechanisms in the Brain. **J Biomed Sci**, v. 8, p. 37-43, 2001.

TECHER, D.; MILLA, S.; FONTAINE, P.; et al. Acute toxicity and sublethal effects of gallic and pelargononic acids on the zebrafish *Danio rerio*. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 22, n. 7, p. 5020-5029, 2015.

TETZSCHNER, R.; NØRGAARD, K.; RANJAN, A. Effects of alcohol on plasma glucose and prevention of alcohol-induced hypoglycemia in type 1 diabetes-A systematic review with GRADE. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 34, n. 3, 2018.

TINSLEY, M.R.; QUINN, J.J.; FANSELOW, M.S. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. **Learn Mem**, v. 11, n. 1, p. 35-42, 2004.

TIWARI, V.; ARORA, V.; CHOPRA, K. Attenuation of NF- κ B mediated apoptotic signaling by tocotrienol ameliorates cognitive deficits in rats postnatally exposed to ethanol. **Neurochem Int**, v. 61, n. 3, p. 310-320, 2012.

TIWARI, V.; CHOPRA, K. Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain. **Neurochem Int**, v. 62, n. 6, p. 861-869, 2013.

TRAMACERE, I.; NEGRI, E.; PELUCCHI, C.; et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. **Ann Oncol**, v. 23, p. 28-36, 2012.

TRAN, S.; NOWICKI, M.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Acute and Chronic ethanol exposure differentially alters alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity in the zebrafish liver. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 56, p. 221-226, 2015a.

TRAN, S.; NOWICKI, M.; FACCIOL, A, et al. Ethanol-induced ADH activity in zebrafish: differential concentration-dependent effects on high- versus low-affinity ADH enzyme. **Zebrafish**, v. 13, n. 2, p. 75-78, 2015b.

TRAN, S.; NOWICKI, M.; FULCHER, N.; et al. Interaction between handling induced stress and anxiolytic effects of ethanol in zebrafish: A behavioral and neurochemical analysis. **Behav Brain Res**, v. 298(PtB), p. 278-285, 2016.

UCHIYAMA, T.; CHESS-WILLIAMS, R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. **J Smooth Muscle Res**, v. 40, n. 6, p. 237-247, 2004.

VASCOTTO, S.G.; BECKHAM, Y.; KELLY, G.M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. **Biochem Cell Biol**, v. 75, n. 5, p. 479-485, 1997.

VUADEN, F.C.; SAVIO, L.E.; RICO, E.P.; et al. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 200-209, 2016.

WANG, H.; LIU, X.; LONG, M.; et al. NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 334, 334ra5, 2016.

WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.

Yan, X.; Zhang, Y.L.; Zhang, L.; et al. Gallic Acid Suppresses Cardiac Hypertrophic Remodeling and Heart Failure. **Mol Nutr Food Res**, v. 63, n. 5, 2019.

YANG, L.; HO, N.Y.; ALSHUT, R.; et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reprod. Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 245-253, 2009.

YEDLAPATI, S.H.; MENDU, A.; STEWART, S.H. Alcohol-related diagnoses and increased mortality in acute myocardial infarction patients: An analysis of the nationwide inpatient sample. **J Hosp Med**, v. 11, n. 8, p. 563-567, 2016.

YEH, C.T.; YEN, G.C. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 1474–1479, 2003.

ZHAO, X.; ZHI, Q.Q.; LI, J.Y.; et al. The Antioxidant Gallic Acid Inhibits Aflatoxin Formation in *Aspergillus flavus* by Modulating Transcription Factors FarB and CreA. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 7, p. 270, 2018.

ZHENG, J.L.; YUAN, S.S.; WU, C.W. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol**, v. 180, p. 36-44, 2016.

VOSEN, L.E.; ČERVENÝ, D.; SEN SARMA, O.; et al. Low concentrations of the benzodiazepine drug oxazepam induce anxiolytic effects in wild-caught but not in laboratory zebrafish. **Sci Total Environ**, 703:134701, 2020.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NEUROSCIENCE

NEUROSCIENCE
RESEARCH ARTICLE



J. F. Agostini et al. / Neuroscience 455 (2021) 251–262

Gallic Acid Reverses Neurochemical Changes Induced by Prolonged Ethanol Exposure in the Zebrafish Brain

Jotele Fontana Agostini,^a Glaucia Dal Santo,^a Samira Leila Baldin,^b Henrique Teza Bernardo,^b Ana Caroline Salvador de Farias,^b Eduardo Pacheco Rico^b and Almir Gonçalves Wanderley^{a,c,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

^b Translational Psychiatry Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Extreme Southern Catarinense (UNESC), Criciúma, Santa Catarina, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Abstract—Gallic acid (GA) is a polyphenolic compound that has attracted significant interest due to its antioxidant action through free radical elimination and metal chelation. Ethanol is a highly soluble psychoactive substance, and its toxicity is associated with oxidative stress. In this context, the purpose of the present study was to investigate the effect of GA on neurochemical changes in zebrafish brains exposed to ethanol. GA was first analyzed in isolation by treating the animals at concentrations of 5, 10, and 20 mg/L for 24 h and 48 h. The results revealed that the group exposed to 20 mg/L over a 24/48 h period exhibited increases in thiobarbituric acid reactive substance (TBA-RS) levels and 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation, demonstrating a pro-oxidant profile. Moreover, decrease in acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity was observed. To investigate the effects of GA after ethanol exposure, the animals were divided into four groups: control; those exposed to 0.5% ethanol for 7 days; those exposed to 0.5% ethanol for 7 days and treated with GA at 5 and 10 mg/L on day 8. Treatment with GA at 5 and 10 mg/L reversed impairment of choline acetyltransferase activity and the damage to TBA-RS levels, DCFH oxidation, and superoxide dismutase activity induced by ethanol. Results of the present study suggest that GA treatment (20 mg/L) appeared to disrupt oxidative parameters in the zebrafish brain. GA treatment at 5 and 10 mg/L reversed alterations to the cholinergic system induced by prolonged exposure to ethanol in the zebrafish brain, probably through an antioxidant mechanism. © 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: gallic acid, ethanol, cholinergic system, oxidative stress, zebrafish.

*Correspondence to: A. G. Wanderley, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife, PE 52670-901, Brazil.

E-mail address: almir.wanderley@ufpe.br (A. G. Wanderley).

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; CAT, catalase; ChAT, choline acetyltransferase; CNS, central nervous system; DCF, 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate; GA, gallic acid; GABA, gamma-aminobutyric acid; GSH, reduced glutathione; SOD, superoxide dismutase; TBA-RS, thiobarbituric acid-reactive species.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.040>

0306-4522/© 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 2126 8842
 e-mail: ufpe.br

Recife, 17 de julho de 2018.

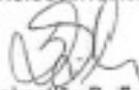
Ofício nº 59/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
 Centro de Biociências
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.020129/2018-93

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo de eficácia pré-clínica do ácido gálico na reversão de lesões neuroquímicas e comportamentais induzidas pela exposição crônica de etanol em peixe zebra."**, Registrada com o nº 23076.020129/2018-93 sob a responsabilidade de **Prof. Almir Gonçalves Wanderley** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/07/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2018 a 01/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Peixe/Wild
Nº de animais	720
Peso/Idade	0.30-0.35g/ 4 meses
Sexo	(360) Macho e Fêmea (360)
Origem	Estabelecimento comercial (Recife Aquarius)

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691



ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (UNESC)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **30/07/2019**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS NEUROQUÍMICOS DO ÁCIDO GÁLICO EM MODELO ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AO ETANOL EM TECIDO CEREBRAL DE PEIXE- ZEBRA
Project title	EVALUATION OF POSSIBLE NEUROCHEMICAL EFFECTS OF GALLIC ACID IN ANIMAL MODEL OF EXPOSURE TO ETHANOL IN ZEBRAFISH BRAIN TISSUE
Número do protocolo Protocol number	068/2019-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Jotele Fontana Agostini Berteli, Samira Leila Baldin, Carolina Antunes Torres, Ana Caroline Salvador de Farias, Arthur Pereira Braga, Henrique Teza Bernardo, Suzielen Damin Pacheco, Alice Ferreira Inácio.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/08/2019 a 01/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Peixe**/ Danio rerio – short-fin
Idade/Peso	3-6 meses / 400-500mg
Número de animais / Gênero	132 / feminine e 132 / masculino = 264
Origem	Biotério 2 UNESC

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

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


Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 30 de julho de 2019.