



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA
À SAÚDE

MARIA LETÍCIA SANTOS CARNAÚBA DA SILVA

**Estudo dos efeitos tóxicos da intoxicação fetal por álcool e opioides em
modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*) com investigação do potencial protetor do
ácido fólico e da quercetina**

RECIFE
2024

MARIA LETÍCIA SANTOS CARNAÚBA DA SILVA

Estudo dos efeitos tóxicos da intoxicação fetal por álcool e opioides em modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*) com investigação do potencial protetor do ácido fólico e da quercetina

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Maria Letícia Santos Carnaúba da.

Estudo dos efeitos tóxicos da intoxicação fetal por álcool e opioides em modelo de zebrafish (*Danio rerio*) com investigação do potencial protetor do ácido fólico e da quercetina / Maria Letícia Santos Carnaúba da Silva. - Recife, 2025.

83f.: il.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biologia Aplicada à Saúde, 2025.

Orientação: Pabyton Gonçalves Cadena.

1. Zebrafish; 2. Poliuso; 3. Embriotoxicidade. I. Cadena, Pabyton Gonçalves. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA LETÍCIA SANTOS CARNAÚBA DA SILVA

**Estudo dos efeitos tóxicos da intoxicação fetal por álcool e opioides em
modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*) com investigação do potencial protetor do
ácido fólico e da quercetina**

Data de apresentação: 27/09/2024

Maria Letícia Santos Carnaúba da Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira
Universidade Federal de Pernambuco.

Prof. Dr. Yuri Mateus Lima de Albuquerque
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

Aos culpados de sempre.

Primeiro, à minha mãe, Lurdinha, que me aguentou enquanto eu escrevia essa dissertação e ainda foi simpática. Obrigada, mãe. Se eu tenho espírito forte para ser ambiciosa e acreditar em mim mesma, é porque fui amada.

Aos meus amigos, que aceitaram graciosamente o abandono fraternal enquanto eu escrevia. 'Tô voltando.

Aos companheiros do LECA, especialmente aos que estiveram comigo nas trincheiras da epibolia durante o inverno. Conseguimos!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, por todos os conselhos e as oportunidades de aprender.

As instituições Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal Rural de Pernambuco por resistirem.

Ao CNPq, CAPES e FACEPE pelo auxílio financeiro.

Aos participantes da banca examinadora.

Muitíssimo obrigada. Nos vemos no doutorado!

RESUMO

O consumo de substâncias psicoativas como álcool e opioides aumentou na última década, e a taxa de mulheres que consomem drogas aumentou, principalmente mulheres em idade fértil e gestantes. Álcool e opioides podem induzir malformações congênitas e neurocomportamentais no feto. Logo, o presente estudo analisou a intoxicação por álcool e opioides no início do desenvolvimento embrionário em modelo animal de *zebrafish* (*Danio rerio*) e investigou o potencial protetor do ácido fólico (FA) e da quercetina (QUE) contra tal intoxicação. Para isso, embriões de *zebrafish* foram expostos aos grupos álcool (EtOH) (150 mM), cloridrato de tramadol (TL) como opioide (24mM), EtOH+TL, AF (75 mM), QUE (75mM), AF+QUE para avaliação de efeitos tóxicos. Os grupos contendo EtOH e TL foram co-expostos a AF, QUE e AF+QUE para avaliação de capacidade protetora dos antioxidantes. Foram realizados os testes de epibolia (6 horas de exposição), taxa de desenvolvimento embrionário, avaliação de efeitos teratogênicos e taxa de eclosão (22 horas de exposição). Os resultados demonstraram a capacidade do EtOH em induzir efeitos tóxicos ao reduzir a porcentagem da epibolia (60%), a taxa de desenvolvimento embrionário (34,5%) e a taxa de eclosão (80%). Também, a ausência de efeitos tóxicos do TL na porcentagem da epibolia, taxa de desenvolvimento embrionário e taxa de eclosão, porém indução de efeitos teratogênicos na forma de edemas no pericárdio (20%). No grupo EtOH+TL, se observou redução na porcentagem da epibolia (<60%) e taxa de desenvolvimento embrionário (32%), porém tais resultados não foram significativamente diferentes dos encontrados no grupo EtOH. Quanto aos potenciais protetores, se observou a ausência de efeitos tóxicos do AF em todos os testes, e sua capacidade em proteger, total ou parcialmente, contra os efeitos tóxicos do EtOH em todos os testes, mas não contra os do TL na avaliação de efeitos teratogênicos. Contra os efeitos induzidos por EtOH+TL, protegeu apenas contra a redução da porcentagem da epibolia. Quanto ao QUE, também se observou a ausência de efeitos tóxicos, porém o antioxidante não foi capaz de proteger contra os efeitos tóxicos induzidos pelo EtOH e o EtOH+TL, e se observou um possível efeito tóxico quando co-exposto com TL, reduzindo a porcentagem da epibolia (<60%). A mistura binária AF+QUE demonstrou possível efeito tóxico ao reduzir a porcentagem de epibolia (<60%) e não foi capaz de proteger contra os efeitos induzidos pelo EtOH, EtOH+TL e TL em nenhum dos testes. Com isso, foi possível concluir que o efeito induzido pelo EtOH está ligado a interferências no desenvolvimento normal, e que o TL pode não causar atrasos no desenvolvimento,

mas ainda causa defeitos cardíacos. A avaliação dos efeitos do EtOH+TL não foi significativamente diferente dos efeitos observados com a exposição apenas de EtOH, o que pode indicar que apenas o EtOH induz os efeitos vistos no grupo EtOH+TL. Quanto ao potencial protetor dos antioxidantes, os resultados encontrados com AF e QUE corroboram outros estudos com EtOH como indutor de toxicidade em *zebrafish*.

Palavras-chave: poliuso; álcool; opioides; ácido fólico; quercetina; *zebrafish*; embriotoxicidade.

ABSTRACT

The consumption of psychoactive substances such as alcohol and opioids has increased in the last decade, and the rate of drug use among women has risen, particularly among women of childbearing age and pregnant women. Alcohol and opioids can induce congenital and neurobehavioral malformations in the fetus. Therefore, this study analyzed alcohol and opioids intoxication during early embryonic development in a zebrafish (*Danio rerio*) animal model and investigated the protective potential of folic acid (FA) and quercetin (QUE) against such intoxication. Zebrafish embryos were exposed to alcohol (EtOH) (150 mM), tramadol hydrochloride (TL) as an opioid (24 mM), EtOH+TL, FA (75 mM), QUE (75 mM), and FA+QUE groups for toxicological evaluation. The EtOH and TL groups were co-exposed to FA, QUE, and FA+QUE to assess protective capacity. Tests were conducted for epiboly (6 hours of exposure), embryonic developmental rate, evaluation of teratogenic effects, and hatching rate (22 hours of exposure). The results demonstrated EtOH's ability to induce toxic effects by reducing the percentage of epiboly (<60%), embryonic developmental rate (34,5%), and hatching rate (80%). Additionally, TL showed no toxic effects on epiboly percentage, embryonic developmental rate, or hatching rate, but it induced teratogenic effects in the form of pericardial edema (20%). In the EtOH+TL group, a reduction in the percentage of epiboly (<60%) and embryonic developmental rate (32%) was observed, but these results were not significantly different from those in the EtOH group. Regarding potential protectors, FA showed no toxic effects in all tests and partially or fully protected against EtOH-induced toxicity, but not against TL-induced teratogenic effects. Against EtOH+TL-induced effects, FA only protected against reduced epiboly percentage. As for QUE, it also showed no toxic effects, but the antioxidant was unable to protect against EtOH and EtOH+TL-induced toxicity. When co-exposed with TL, QUE even exhibited a possible toxic effect by reducing the percentage of epiboly (<60%). The binary mixture of FA+QUE demonstrated a potential toxic effect by reducing the percentage of epiboly (<60%) and did not protect against EtOH, EtOH+TL, or TL-induced effects in any of the tests. Consequently, it was concluded that EtOH-induced effects are associated with disruptions in normal development, and while TL may not cause developmental delays, it still leads to cardiac defects. The evaluation of EtOH+TL effects was not significantly different from the effects observed with EtOH exposure alone, suggesting that only EtOH induces the effects seen in the EtOH+TL group. Regarding the protective potential of antioxidants,

the results obtained with FA and QUE align with other studies on EtOH-induced toxicity in zebrafish.

Keywords: polysubstance use; alcohol; opioids; folic acid; quercetin; zebrafish; embryotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem da epibolia em *zebrafish* às 8 horas pós fertilização após exposição ao álcool e ao cloridrato de tramadol durante a embriogênese. A porcentagem de epibolia foi considerada afetada quando * = $p < 0.05$. Legenda: Controle – água decolorada; DMSO – 0.01% (v/v) Dimetilsulfoxido; EtOH – Etanol; TL – Cloridrato de tramadol; AF – Ácido fólico; QUE – Quercetina. Os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle por one-way ANOVA ($F(25,22931) = 25,22931$ $p < 0.05$) seguido pelo teste de Tukey (DMSO $p = 0.99$; EtOH $p < 0.001$; TL $p = 0.99$; EtOH+TL $p < 0.001$; AF $p = 1$; AF+EtOH $p = 1$; AF+TL $p = 1$; AF+EtOH+TL $p = 1$; QUE $p = 0.99$; QUE+EtOH $p < 0.001$; QUE+TL $p = 0$; QUE+EtOH+TL $p < 0.001$; AF+QUE $p < 0.001$; AF+QUE+EtOH $p = 0$; AF+QUE+TL $p < 0.001$; AF+QUE+EtOH+TL $p < 0.001$).

Figura 2 – Porcentagem de animais de acordo com os estágios embrionários para a determinação da taxa de desenvolvimento em *zebrafish* às 24 horas pós fertilização após exposição a álcool e cloridrato de tramadol durante a embriogênese. A porcentagem de animais foi considerada afetada quando * = $p < 0.05$. Legenda: Controle – água decolorada; DMSO – 0.01% (v/v) Dimetilsulfoxido; EtOH – Etanol; TL – Cloridrato de tramadol; AF – Ácido fólico; QUE – Quercetina. Os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle por one-way ANOVA ($F(25,22931) = 25,22931$ $p < 0.05$) seguido pelo teste de Tukey (DMSO $p = 1$; EtOH $p < 0.001$; TL $p = 1$; EtOH+TL $p = 0$; AF $p = 0.98$; AF+EtOH $p < 0.001$; AF+TL $p = 0.49$; AF+EtOH+TL $p < 0.001$; QUE $p = 0.98$; QUE+EtOH $p < 0.001$; QUE+TL $p = 1$; QUE+EtOH+TL $p < 0.001$; FA+QUE $p < 0.001$; AF+QUE+EtOH $p < 0.001$; AF+QUE+TL $p < 0.001$; AF+QUE+EtOH+TL $p < 0.001$).

Figura 3 – Taxa de eclosão às 72 horas pós fertilização em *zebrafish* após exposição ao álcool e ao cloridrato de tramadol durante a embriogênese. A taxa de eclosão foi considerada afetada quando * = $p < 0.05$. Legenda: Controle – água decolorada; DMSO – 0.01% (v/v) Dimetilsulfoxido; EtOH – Etanol; TL – Cloridrato de tramadol; AF – Ácido fólico; QUE – Quercetina. Os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle por one-way ANOVA ($F(25,22931) = 25,22931$ $p < 0.05$) seguido pelo teste de Tukey (DMSO $p = 1$; EtOH $p < 0.001$; TL $p = 1$; EtOH+TL $p = 1$; AF $p = 0.99$;

AF+EtOH $p = 1$; AF+TL $p = 1$; AF+EtOH+TL $p = 1$; QUE $p = 1$; QUE+EtOH $p = 0.99$;
QUE+TL $p = 1$; QUE+EtOH+TL $p = 1$; AF+QUE $p = 1$; AF+QUE+EtOH $p < 0.001$;
AF+QUE+TL $p = 1$; AF+QUE+EtOH+TL $p < 0.001$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de compostos únicos e misturas binárias (A) para avaliar os efeitos protetores do ácido fólico (FA) e da quercetina (QUE) contra defeitos induzidos por EtOH e TL (cloridrato de tramadol) no modelo de *zebrafish*. Layout do delineamento experimental em um delineamento experimental de rede simplex (B) para avaliar as interações entre compostos químicos (Cadena, 2020a).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – Ácido fólico

dpf – Dias pós-fertilização

EtOH – Álcool

EROs – Espécies reativas de oxigênio

hpf – Horas pós-fertilização

QUE – Quercetina

SAN – Síndrome de abstinência neonatal

SANO – Síndrome de abstinência neonatal a opioides

TDAH – Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TEAF – Transtornos do espectro alcoólico fetal

TL – Cloridrato de tramadol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 OBJETIVOS	41
4 RESULTADO.....	42
5 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A – Artigo publicado.....	81
APÊNDICE B – Participação em artigo publicado.....	82
APÊNDICE C – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	83

1 INTRODUÇÃO

Em 2020, com a implementação de medidas de isolamento social em consequência da pandemia da COVID-19, o consumo de drogas aumentou como um problema secundário (GARCIA; SANCHEZ, 2020; QUEIROGA, 2021). Em 2023, cerca de 35 milhões de pessoas atenderam aos critérios para serem diagnosticadas com abuso de substâncias (OMS, 2023). O consumo de substâncias psicoativas como álcool e opioides já era um problema de saúde pública antes da pandemia, porém, ainda assim, é possível traçar uma relação entre as duas situações. Já em 2021, o aumento no consumo de drogas foi 26% maior do que nos dez anos anteriores (MACHIKANTI et al., 2021). O lockdown gerou uma maior dificuldade para o consumo de drogas ilícitas, com as regras de isolamento e uma maior força policial nas ruas, mas isso fez a população se voltar para as drogas que são legais. Bebidas alcoólicas, hipnóticos, benzodiazepínicos, fármacos opioides, são todas substâncias legais, relativamente fáceis de comprar durante o período pandêmico, e que atuam no sistema nervoso central (LAPEYRE-MESTRE et al., 2020; GILI et al., 2023). Historicamente, em períodos de grande estresse coletivo como ocorreu na pandemia, o consumo de drogas tende a aumentar. Isso acontece em razão da forte relação entre problemas de saúde mental, como depressão e ansiedade, e o consumo de drogas (KAR et al., 2021). Alguns estudos até apontam que as drogas podem causar efeito depressor, criando um ciclo de abuso (SILVA et al., 2022b). O uso de drogas é visto em todas as culturas, e remonta aos primórdios da civilização humana (CALVETE e SOUZA, 2021). O aumento no consumo que cria uma questão de saúde pública pode ser devido ao aumento populacional, porém, também, as consequências da pandemia (GILI et al., 2023).

Antes do período pandêmico, o número de mulheres consumindo drogas já era preocupante (HASON et al., 2021). Em razão de mudanças sociais e a entrada no mercado de trabalho, o comportamento feminino em relação ao consumo e abuso de drogas mudou (HASON et al., 2021). Dentre os homens, esse comportamento ainda é mais expressivo, mas uma possível subnotificação devido ao estigma deve ser considerada (FAMA et al., 2020). O comportamento de vício em mulheres é mais condenado pela sociedade, pois diverge dos papéis de gênero e do conceito social de feminilidade, onde a mulher é ensinada a ser mais cuidadosa e respeitável (STENGEL et al., 2013; FAMA et al., 2020). Apesar de o percentual de mulheres ser menor do que o de homens, e elas começarem a consumir drogas mais tarde, os padrões de

abuso evoluem mais rápido em mulheres (DOZET et al., 2021). Fisiologicamente, mulheres têm uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de dependência e condições de saúde ligadas ao consumo de drogas, em uma questão ligada à massa corporal e metabolismo (DOZET et al., 2021). Ainda se sabe pouco sobre tais consequências ao corpo feminino, pois elas reportam menos o seu vício em drogas e geralmente são excluídas de pesquisas epidemiológicas (FAMA et al., 2020). Porém, quando gestantes, muito se pesquisa a respeito do corpo da mulher em relação ao consumo de drogas. No período gestacional, aspectos da fisiologia feminina mudam, e isso traz diferenças na absorção, metabolismo e excreção de drogas (KAR et al., 2020; BOARD et al., 2023). Além disso, o organismo materno e o organismo fetal estão muito próximos nesse período, pois o feto depende da mãe para sua nutrição, excreção, respiração, entre outros (HUMPHRIES et al., 2023).

O desenvolvimento embrionário é um momento de grande vulnerabilidade para o organismo em formação (POON et al., 2018). O primeiro trimestre da gravidez é um período especialmente crítico, pois é quando acontecem processos como a proliferação, diferenciação e migração celular durante a embriogênese (CHEN et al., 2024). Envolve a formação das três camadas germinativas primárias, o processo inicial para o desenvolvimento dos órgãos (GONG et al., 2023). Além disso, o desenvolvimento do cérebro fetal começa logo após a concepção, com a formação do tubo neural e calibração do padrão sináptico (CHEN et al., 2024). Interrupções nesses processos celulares e moleculares podem alterar as vias de transdução de sinal embrionário, levando a efeitos teratogênicos, malformações congênitas que podem perdurar por toda a vida ou mortalidade (HACK et al., 2023; CHEN et al., 2024). Estudos mostram maior exposição embrionária a drogas no início da gravidez em comparação aos trimestres posteriores, geralmente devido a gestações não detectadas (POPOVA et al., 2023). A exposição fetal ao álcool e opioides afeta importantes vias para o desenvolvimento, como o metabolismo do folato e o equilíbrio entre antioxidantes endógenos e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, interferem na metilação do DNA e biossíntese de nucleotídeos para o processo de divisão celular (KIRLA et al., 2021; ZHENG et al., 2023). Tais interferências podem causar danos celulares que podem afetar o desenvolvimento dos tecidos e órgãos do embrião. Como consequência, se tem uma ampla gama de possíveis distúrbios, desde morfológicos à neurocomportamentais, que podem durar até a vida adulta (KIRLA et al., 2021; COLLIER et al., 2023). Os principais distúrbios

associados à exposição fetal ao álcool e opioides, respectivamente, são os transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF) (POPOVA et al., 2023) e a síndrome de abstinência neonatal (SAN) (BALDO, 2022).

Estudos realizados principalmente com modelos animais tentam elucidar os mecanismos de atuação do álcool e dos opioides no organismo, e investigar possíveis moléculas protetoras que possam dar início a tratamentos terapêuticos (FERNANDES et al., 2018; KIRLA et al., 2021; COLLIER et al., 2023; GIOVANNINI et al., 2024). Quando se induz TEAF ou SAN, ou se faz a exposição a uma substância psicoativa em um modelo animal, se tem limitações. O animal escolhido terá seus próprios mecanismos de resposta, mas, graças às características evolutivamente conservadas entre os animais, é possível fazer comparações (FACCIOL et al., 2019). Além disso, o uso de modelos animais é uma forma de simplificar, ou até mesmo estudar de forma mais detalhada, determinado processo biológico, condição ou patologia (FACCIOL et al., 2019; COLLIER et al., 2023). O *zebrafish* já é bastante utilizado como modelo animal para TEAF e exposição a opioides. Dentre as suas vantagens, se tem a logística de sua criação em biotério e manejo. Também, sua alta fecundidade, rápido desenvolvimento e ovos transparentes que permitem a visualização de células, tecidos e órgãos com facilidade (COLLIER et al., 2023; GIOVANNINI et al., 2024). Como garantia de comparação para humanos, se tem processos do desenvolvimento, padrões anatômicos e vias metabólicas evolutivamente conservadas (COLLIER et al., 2023; GIOVANNINI et al., 2024). O *zebrafish* é muito utilizado, também, na triagem de novos fármacos e testes de novas terapêuticas. Inclusive, pesquisadores o utilizam para avaliar substâncias com potencial protetor contra TEAF, SAN e exposição a opioides (CADENA et al., 2020a, 2020b).

Dentre as substâncias utilizadas como possíveis protetoras, os antioxidantes são muito pesquisados (STEANE et al., 2023). A principal razão para tal, são as informações que já existem sobre os mecanismos e vias do metabolismo que sofrem interferência do álcool e dos opioides no organismo. O equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes é um desses mecanismos. O estresse oxidativo resultante do distúrbio nesse processo é promotor de danos teciduais, apoptose e modificações na expressão gênica (STEANE et al. 2023). Dois antioxidantes vêm sendo estudados para reduzir o estresse oxidativo e seus danos; o ácido fólico (AF) e a quercetina (QUE) (STEANE et al., 2023; YOSHIDA et al., 2024). O AF já é mundialmente indicado como suplementação para gestantes (STEANE et

al., 2023). Ele desempenha um papel significativo em vários processos fisiológicos, como função neurotransmissora e formação de DNA, bem como na prevenção de distúrbios congênitos e anemia. A recomendação para a suplementação de AF é começar antes mesmo da gravidez ocorrer, quando os pais estão tentando engravidar. O AF também é essencial na formação do tubo neural e no desenvolvimento embrionário (DWYER, 2022; KALDYGULOVA et al., 2023). Estudos já avaliam seu potencial protetor em modelos de TEAF (CADENA et al., 2020a). A QUE também é utilizada como suplemento, mas ainda não é indicada para gestantes pois sua segurança para o feto vem sendo avaliada (DINIZ et al., 2023). O interesse nessa substância está nas suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e seu potencial papel como protetor contra alterações no esqueleto do embrião (YOSHIDA et al., 2024). Estudos em modelos animais não reportaram toxicidade fetal da QUE (CADENA et al., 2020a; YOSHIDA et al., 2024).

Muitos estudos sobre exposição a drogas, transtornos por uso de substâncias e as consequências do uso de drogas geralmente se concentram em um critério de "droga única" (HOOD et al., 2020). No entanto, essa abordagem pode não capturar totalmente a realidade complexa dos transtornos por uso de drogas nos últimos anos (HOOD et al., 2020; BOARD et al., 2023). É essencial entender como as drogas podem interagir e potencialmente influenciar os efeitos umas das outras quando usadas juntas. Hoje em dia, é muito mais comum que usuários de drogas relatem o uso de mais de uma droga, especialmente as lícitas, como álcool e opioides de uso médico (CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023). Esse comportamento geralmente acontece para minimizar os danos ou sintomas negativos de uma das substâncias ou melhorar a experiência durante o uso, quando duas substâncias potencializam os efeitos uma da outra (KHADKA et al., 2023). As informações sobre o poliuso na literatura ainda são escassas, principalmente utilizando modelos animais para entender seus processos no organismo e suas consequências. As possíveis substâncias protetoras que podem resultar em novas terapias farmacológicas contra o poliuso também não são conhecidas. Por isso, é importante investigar os potenciais efeitos protetores do AF e da QUE em um modelo de poliuso de álcool e opioides, utilizando *zebrafish* como modelo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Consumo de drogas: a influência da pandemia da COVID-19 e o poliuso

2.1.1 Contextualização, epidemiologia e breve histórico

O último relatório sobre o uso de drogas apresentado pela Organização das Nações Unidas (ONU) estima que 292 milhões de pessoas consumiram algum tipo de droga em 2022. Isso representa um aumento de 20% em relação à última década. O consumo de drogas é um problema de saúde pública mundial há muito tempo reconhecido e cuja incidência cresce a cada ano (CRUMMY et al., 2020). Esse consumo interfere na capacidade de julgamento do indivíduo, criando um comportamento de compulsão que na maioria das vezes leva a distúrbios como o vício (MARANGONI et al., 2022). Tais distúrbios podem resultar em uma ampla gama de consequências negativas, como baixo desempenho escolar, problemas de saúde mental, incluindo depressão, comportamentos de risco, problemas com a lei e até overdose (MARANGONI et al., 2022). Em 2021, o Sistema Único de Saúde (SUS) registrou 400 mil atendimentos a pessoas que consumiram drogas (Brasil, 2021), e a previsão é de que até 2030, sejam 300 milhões de pessoas consumindo algum tipo de droga em todo o mundo (OMS, 2023). Dentre as pessoas que fazem uso de drogas, 13% sofrem algum transtorno relacionado a esse consumo (ONU, 2021). Em 2021, 39,5 milhões de pessoas reportaram transtornos relacionados ao consumo de drogas, 45% a mais do que foi reportado ao longo da década passada (OMS, 2023). A Organização Mundial de Saúde considera a dependência em drogas, lícitas ou ilícitas, uma patologia. Atualmente, é a psicopatologia com maior prevalência e mortalidade (OMS, 2021). Nos Estados Unidos, em 2020, as consequências da dependência em drogas custaram cerca de 740 bilhões de dólares (PETERSON et al., 2021).

O consumo de drogas remonta ao século XVI, quando a palavra “droga” era utilizada para falar de produtos naturais com potencial para curar doenças (CALVETE; SOUZA, 2020). Em séculos anteriores, o consumo de drogas chegou a estar relacionado ao religioso e ao sagrado, integrando ritos, cultos e festas (NUNES; JÓLLUSKIN, 2004; CALVETE; SOUZA, 2020). Durante o período de expedições mercantis e criação de colônias, entre os séculos XVI e XVII, as drogas se tornaram valiosas mercadorias (NUNES; JÓLLUSKIN, 2004; CALVETE; SOUZA, 2020). Atingiu uma alta incidência pela primeira vez nos anos 1970, tanto no consumo quanto nos casos de dependência. Ao longo dos anos, epidemias de drogas específicas surgiram e se estabeleceram (NUNES; JÓLLUSKIN, 2004). Como exemplo, se tem a epidemia de crack em 1984 (PACHECO et al., 2021), a epidemia de heroína entre 1970 e 1980, e a epidemia de opioides que assola os Estados Unidos desde a década de 1990

(MARTÍ et al., 2023). O crescimento no consumo de opioides não se restringe aos Estados Unidos, sendo os opioides a segunda droga mais utilizada no mundo, com 60 milhões de pessoas consumindo algum opioide em 2022 (OMS, 2024). Especialistas acreditam que o consumo de drogas tenha forte relação com períodos de grande mudança, social, cultural e política (GILI et al., 2023).

2.1.2 Aumento no consumo de drogas como consequência secundária da COVID-19

O atual aumento no consumo de drogas está relacionado ao crescimento mundial da população, mas, também, sofre a influência da pandemia da COVID-19 (GILI et al., 2023). O período da pandemia atuou tanto no aumento do consumo de drogas, quanto no desenvolvimento de transtornos relacionados a esse consumo (GILI et al., 2023; MARCEL; CAIRE-JUVERA, 2023). Estudos descrevem duas formas de influência da pandemia: social e biológica (CHAGAS et al., 2021; GILI et al., 2023). A social está relacionada à saúde mental e é a mais discutida, sendo considerada uma consequência secundária do período de isolamento social imposto durante a pandemia (GARCIA; SANCHEZ, 2020; MARCEL; CAIRE-JUVERA, 2023). Transtornos de saúde mental aumentaram durante o período de isolamento, com o estresse, o medo e a solidão levando a um aumento nos casos de ansiedade, depressão e síndrome do pânico (SMITH, 2020; GARCIA; SANCHEZ, 2020). Existe uma relação entre transtornos de saúde mental e fatores sociais com potencial estressor que levam ao abuso de substâncias (SMITH, 2020; GARCIA; SANCHEZ, 2020; MARCEL; CAIRE-JUVERA, 2023). O que pode acarretar casos de dependência. O isolamento social imposto durante a pandemia trouxe impactos na saúde mental da população, levando a um aumento no consumo de drogas (CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021; MARCEL; CAIRE-JUVERA, 2023).

A influência biológica da pandemia da COVID-19 sobre o aumento no consumo de drogas apareceu na literatura recentemente, mas pesquisadores vêm construindo um caso forte nessa linha de pensamento (CHAGAS et al., 2021; GILI et al., 2023). A ideia geral é que, em um nível fisiológico, alterações na plasticidade sináptica do sistema nervoso central, causadas por processos inflamatórios, aumentam o risco de abuso no consumo de drogas e o desenvolvimento de transtornos (CHAGAS et al., 2021; CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021). Os transtornos por uso de drogas estão relacionados aos níveis de neurotransmissores como glutamato e serotonina, em um

ciclo de busca e recompensa (CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021). Tais neurotransmissores, têm seus níveis influenciados por processos inflamatórios, como os causados por vírus (CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021). Um aumento na inflamação diminui os níveis de serotonina e glutamato, impulsionando o comportamento compulsivo de busca pela droga (CHAGAS et al., 2021; CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021). Em estudos com o vírus HIV, já se têm resultados demonstrando como a inflamação causada pelo vírus estimula a síntese de enzimas que competem pelos precursores da serotonina, diminuindo os níveis do neurotransmissor (WEINSTEIN et al., 2019; ILLENBERGER et al., 2020). Esse mesmo padrão também é uma das sequelas da COVID-19. Por isso, é relevante discutir a influência a nível biológico da pandemia da COVID-19 sobre o aumento no consumo de drogas e os transtornos relacionados (CHAGAS et al., 2021; CISNEROS; CUNNINGHAM, 2021). Junto a isso, o comportamento no consumo de drogas também sofreu mudanças nesse período.

2.1.3 Poliuso de drogas

No cenário atual, agências de saúde e estudos vêm reportando o estabelecimento de um tipo de comportamento em relação ao consumo de drogas: o poliuso (FIOCRUZ, 2019; CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023; OMS, 2023). O poliuso de drogas é um termo amplo para classificar o uso de mais de uma droga, podendo esse uso ser feito de forma simultânea ou de forma alternada por um certo período (BUNTING et al., 2023). O poliuso pode ser intencional ou não (CRUMMY et al., 2020). Estudos relatam que o consumo de uma droga aumenta em 11% a chance do consumo de uma segunda droga (CRUMMY et al., 2020). Quando intencional, geralmente ocorre para minimizar danos ou sintomas negativos de uma das substâncias ou melhorar a experiência durante o uso (BOILEAU-FALARDEAU et al., 2023; KHADKA et al., 2023). Junto a isso, estudos demonstram uma ligação entre o poliuso de drogas e saúde mental, estando tal comportamento relacionado a casos de depressão e ansiedade (BOILEAU-FALARDEAU et al., 2023; BUNTING et al., 2023). Essa relação pode ser devido a um desejo de automedicação em decorrência dos sintomas de um transtorno de saúde mental, ou os sintomas do transtorno podem advir do uso extensivo de drogas (CRUMMY et al., 2020; BOILEAU-FALARDEAU et al., 2023). Além de comorbidades psiquiátricas, o poliuso de drogas pode levar a comportamentos de risco como dirigir sob efeito de drogas, práticas sexuais de risco,

comportamento violento e impulsividade (CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023; KHADKA et al., 2023). O risco de overdose também aumenta com o poliuso, com uma taxa de mortalidade três vezes maior em relação ao uso apenas uma droga (CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023; KHADKA et al., 2023). Uma possível explicação neurobiológica para o uso de mais de uma droga é que essa combinação acaba por convergir em um circuito comum no SNC, produzindo efeitos recompensadores aditivos ou sinérgicos (CRUMMY et al., 2020; BUNTING et al., 2023).

2.2 Consumo de drogas por mulheres: a estigmatização e o poliuso de álcool e opioides durante a gestação

2.2.1 Os papéis de gênero e a cidadania reprodutiva

Quando se trata de gênero em estudos sobre o consumo de drogas, o sexo masculino é considerado um fator relevante, pois é um comportamento mais comum entre os homens (GOODWIN et al., 2022). Porém, com as mudanças do papel da mulher na sociedade, e sua entrada no mercado de trabalho, o consumo de drogas e o desenvolvimento de transtornos por uso de drogas aumentou entre a população feminina (FAMA et al., 2020). Mulheres têm uma maior incidência no desenvolvimento de problemas de saúde mental como ansiedade e depressão, o que pode levar a um maior consumo de drogas psicoativas (COOK, 2022). Aspectos midiáticos, como campanhas publicitárias incentivando o consumo de drogas lícitas como o álcool, e pressões sociais também estão relacionados a esse comportamento (REBECA et al., 2014). Apesar disso, existe uma lacuna de conhecimento sobre o uso de drogas por mulheres (GOODWIN et al., 2022).

A maior parte dos estudos sobre o consumo de drogas e os transtornos decorrentes ainda estão focados na população masculina (FAMA et al., 2020; GOODWIN et al., 2022). Não apenas isso cria lacunas nos dados epidemiológicos, podendo levar à subnotificação e defasagem nas políticas públicas contra o consumo de drogas, mas, também, dificulta o desenvolvimento de protocolos de tratamento (FAMA et al., 2020). A exclusão das mulheres dos estudos sobre o consumo de drogas está relacionada à estigmatização e ao preconceito (FAMA et al., 2020). O papel social que é imposto às mulheres, o conceito de feminilidade, não permite a ideia de que elas possam sofrer com vícios (FAMA et al., 2020). Em comparação, o mesmo comportamento em homens é visto com mais indulgência. Isso resulta em uma maior dificuldade para que mulheres admitam o uso de drogas e possíveis transtornos

decorrentes, atrapalhando o acolhimento dessas mulheres e possíveis tratamentos (FAMA et al., 2020; COOK, 2022; GOODWIN et al., 2022). Além disso, a capacidade de metabolização de drogas e suas consequências sofrem influência fisiológica do organismo, estando relacionadas a composição corporal (FAMA et al., 2020). Mulheres desenvolvem transtornos em menos tempo de uso da droga, e as consequências para a saúde aparecem mais rápido, porque seus corpos metabolizam drogas em uma velocidade diferente (FAMA et al., 2020).

Por outro lado, observa-se uma atenção significativa ao consumo de drogas por mulheres durante a gestação, sendo o vício ainda mais estigmatizado por conta do risco duplo, para a mulher e para o feto (BOARD et al., 2023; GIOVANNINI et al., 2024). Essa maior estigmatização da mulher quando grávida, advém da ideia de cidadania reprodutiva, que reforça o arquétipo de “boa mãe” e responsabiliza mulheres por quaisquer situações desfavoráveis durante a gestação (STENGEL, 2014; WEBER et al., 2021). Isso cria um cenário em que essas mulheres são vistas como potenciais ameaças ao feto que carregam e por isso acabam não sendo honestas sobre o consumo de drogas (STENGEL, 2014; WEBER et al., 2021). Estigmatizar mulheres com vícios e fomentar políticas e normas punitivas, em que elas são as únicas responsáveis pelos riscos aos quais estão vulneráveis, possivelmente dificulta as trocas de informação e a minimização de riscos durante o pré-natal (SYVERTSEN et al., 2021; WEBER et al., 2021). Não existem dados que comprovem que o estigma e a discriminação promovem redução no consumo de drogas por gestantes, mas se sabe que tais julgamentos podem levar ao medo e a vergonha, impedindo mulheres de comunicar o uso de drogas (WEBER et al., 2021; GOODWIN et al., 2022). É importante lembrar que as chances de o uso de drogas ocorrer durante o primeiro trimestre de gestação é maior, e isso se dá principalmente por não se ter ciência da gravidez (POON et al., 2018; POPOVA et al., 2023). Em todo o mundo, mais da metade das gestações não são planejadas (ASRATIE, 2021). Isso cria toda uma sequência de eventos que pode resultar na exposição fetal a drogas (POPOVA et al., 2023).

2.2.2 Poliuso de substâncias durante a gestação

O uso de drogas durante a gravidez é um problema de saúde pública desde a década de 1960. Cerca de 21% das grávidas admitiram usar algum tipo de droga durante a gravidez (DOZET et al., 2021). Estudos sugerem que o poliuso de

substâncias entre gestantes é comum (CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023; TRAN et al., 2023). A sobredosagem decorrente deste comportamento é uma das principais causas de morte associada à gravidez ou ao pós-parto, cerca de 83% (BOARD et al., 2023; TRAN et al., 2023). A utilização de drogas durante a gravidez é a causadora do aumento de casos de aborto espontâneo, nascimento de natimortos, partos prematuros e bebês com baixo peso ao nascer (BOARD et al., 2023; TRAN et al., 2023). Principalmente quando tais substâncias são depressoras do sistema nervoso central, como álcool e opioides. O número de mulheres que consomem álcool subiu 84% na última década, especialmente entre mulheres em idade fértil (OEI, 2020; GOODWIN et al., 2022). Uma em cada três mulheres admite utilizar álcool na gestação, durante pelo menos um trimestre (DOZET et al., 2021). Alguns fatores relacionados a esse comportamento são: o fácil acesso ao álcool, por ser uma droga lícita, e a diminuição nas campanhas contra o consumo de álcool durante a gravidez (ADDILA et al., 2020). Além disso, também se pode perceber a influência de fatores socioeconômicos, como nível de escolaridade e desemprego; gestações não planejadas e problemas com o parceiro; e problemas prévios com o abuso de álcool e saúde mental (ADDILA et al., 2020). Dentre as mulheres grávidas que consomem álcool durante a gestação, 38,2% relatam fazer uso de ao menos uma segunda substância (BOARD et al., 2023). Na maioria dos casos, a segunda substância também é lícita como tabaco e fármacos opioides de uso médico (FOGELMAN et al., 2024).

Opioides são conhecidos e utilizados há décadas, mas o seu abuso é considerado mais recente (TERPLAN, 2017). Mulheres sempre receberam mais prescrições de opioides, pois é mais provável que reportem dor e distúrbios de saúde mental como depressão e ansiedade (COOK, 2022). Entre mulheres em idade fértil, 40% já receberam prescrição de fármacos opioides (TERPLAN, 2017). Por não ser considerado um teratôgeno, o uso de opioides não é proibido durante a gravidez, e pelo menos 22% das mulheres já receberam prescrição de opioides durante a gravidez e admitem um comportamento de abuso (KO, 2020; STRAUB, 2021). Dentre as mulheres grávidas que reportam o uso não médico de opioides, elas também relataram ter consumido bebidas alcóolicas (YEE et al., 2021). O consumo de tais substâncias aumenta o risco de desenvolvimento de distúrbios como a síndrome de abstinência neonatal (SAN) e os transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF) (COLLIER et al., 2023).

O consumo de drogas pode produzir efeitos na fisiologia da mãe que podem influenciar secundariamente o feto, como aumento da secreção de hormônios do estresse ou alterações nos comportamentos de saúde materna atribuíveis ao vício da mãe (BOARD et al., 2023). Esse consumo pode interferir diretamente no útero, levando a contrações e parto prematuro e alteração no fluxo sanguíneo uteroplacentário (HUMPHRIES et al., 2023). Na placenta, pode atuar causando alteração na sua atividade secretora, levando a insuficiência placentária, rompimento e pré-eclâmpsia (HUMPHRIES et al., 2023). O consumo de drogas também pode atuar diretamente no feto, pois a maioria das drogas que causam dependência atravessam a barreira placentária e podem se acumular no líquido amniótico, elevando a concentração da droga a qual o feto é exposto (BOARD et al., 2023; TRAN et al., 2023). Álcool e opioides têm a capacidade de atravessar a barreira placentária, e o álcool pode chegar a acumular no líquido amniótico, chegando a uma concentração maior do que a encontrada no sangue materno (FRAGA et al., 2021).

2.3 Exposição embrionária a álcool e opioides: efeitos no feto e o risco do poliuso para o primeiro trimestre

2.3.1 Vulnerabilidade do embrião a drogas

O desenvolvimento embrionário é um momento de grande vulnerabilidade para o organismo em formação (POON et al., 2018). Animais têm mecanismos para proteger e promover o desenvolvimento embrionário. Tais mecanismos evoluem à medida que os táxons vão ficando mais complexos, respondendo a mudanças ambientais, fisiológicas e genéticas (FERNER; MESS, 2011; GRIFFTH, 2022). Humanos, por serem animais placentários, têm as mães retendo os embriões dentro de seus corpos, no útero, conectados pela placenta, até que o desenvolvimento esteja completo (FERNER; MESS, 2011; GRIFFTH, 2022). A placenta é um órgão multifuncional formado pela junção de tecidos fetais e maternos que permite trocas fisiológicas entre a mãe e o feto (GRIFFTH, 2022; HUMPHRIES et al., 2023). Em humanos, a placenta é do tipo hemocorial, com as células do trofoblasto que dará origem ao embrião invadindo a parede uterina para alcançar as artérias maternas, permitindo contato direto entre o fluxo sanguíneo materno e o fetal (CHAVATTE-PALMER et al., 2016). Essa disposição garante uma maior eficiência na troca de nutrientes, metabólitos e hormônios. Durante a gestação, a placenta atuará como pulmão, intestino e rim fetal, realizando trocas gasosas, transporte de nutrientes e

excreção (CHAVATTE-PALMER et al., 2016; GRIFFTH, 2022). Em razão da estreita proximidade entre tecidos fetais e maternos, e da interação entre os seus metabolismos, substâncias nocivas na corrente sanguínea da mãe podem chegar ao feto (CHAVATTE-PALMER et al., 2016). Esse é o caso de drogas psicoativas como álcool e opioides, que têm capacidade de atravessar a barreira placentária.

Durante o período gestacional, o organismo materno sofre alterações fisiológicas, mudando a absorção, metabolização, biodisponibilidade e excreção de drogas (HUMPHRIES et al., 2023). Junto a isso, se tem a ausência de mecanismos de metabolização e regulação homeostática devidamente calibrados no organismo fetal (HARTEL et al., 2023). No caso da exposição a opioides e álcool, enzimas que metabolizam o álcool estão presentes em uma menor quantidade no feto (FRAGA et al., 2021) e sua expressão de receptores opioides é diferente a depender do estágio embrionário, o que influencia na absorção de opioides (CONRADT et al., 2018). Fisiologicamente, o feto não é um organismo capaz de lidar com tais estressores sem acabar por desenvolver sequelas, sejam elas morfológicas, neurológicas ou comportamentais (HARTEL et al., 2023). Tais sequelas podem ser não perceptíveis no momento do nascimento. A exposição de mais de uma substância estressora, assim como o período gestacional e o tempo de exposição, podem elevar o risco do desenvolvimento de malformações congênitas, assim como aumentar sua gravidade (BOARD et al., 2023). Álcool e opioides são substâncias psicoativas com potencial para causar estresse oxidativo e interferir em vias que o compensariam (KANNAN et al., 2024).

2.3.2 Exposição embrionária ao álcool

As consequências da exposição fetal ao álcool são conhecidas a muito tempo, sendo citadas até mesmo em versos bíblicos (POPOVA et al., 2023). Artigos científicos e estudos de caso do século XV já relatavam o nascimento de crianças com malformações características da exposição fetal ao álcool (POPOVA et al., 2023). No fim do século XX, guias de agências de saúde procuraram informar sobre os riscos da ingestão de álcool durante a gestação, aconselhando que mulheres grávidas ou que desejem engravidar não consumam bebidas alcoólicas (POPOVA et al., 2023). Não se tem uma dose de álcool ou período gestacional em que o consumo seja seguro. Dependendo de fatores nutricionais, genéticos e fisiológicos, uma única dose pode ser o suficiente para causar malformações (OEI, 2020). Malformações ligadas à

exposição fetal ao álcool compõem um amplo leque, podendo se apresentar tanto na forma de características faciais e físicas distintas, e problemas no sistema nervoso central (SNC), quanto em problemas comportamentais, cognitivos e de aprendizagem, como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (OEI, 2020; POPOVA et al., 2023). Além disso, tais malformações podem acarretar desenvolvimento de doenças metabólicas, imunológicas e cardiovasculares. Esse conjunto de possíveis malformações estão incluídos entre os transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF) (OEI, 2020; POPOVA et al., 2023). As vias fisiológicas em que o álcool atua para o desenvolvimento de TEAF já estão razoavelmente elucidadas (POPOVA et al., 2023).

No organismo, o álcool influencia em várias vias e processos moleculares muito importantes para o desenvolvimento fetal. Um desses processos, é o estresse oxidativo (KANNAN et al., 2024). O álcool pode induzir o estresse oxidativo ao ser metabolizado e gerar espécies reativas de oxigênio ao interferir no metabolismo de enzimas antioxidantes (KANNAN et al., 2024); e, também, ao danificar a morfologia da mitocôndria, organela responsável pela respiração celular (FERNANDES et al., 2018). O aumento no estresse oxidativo gerado pelo álcool, acaba induzindo a apoptose celular, o que pode levar a formação de anomalias craniofaciais, atraso no desenvolvimento e malformações em importantes órgãos como coração, pulmão, olhos (STEANE et al., 2023; KANNAN et al., 2024). A exposição ao álcool durante o primeiro trimestre, mais especificamente na terceira semana de gestação, pode afetar o processo de neurulação do feto, interferindo na formação do tubo neural, estrutura que dará origem ao SNC (POPOVA et al., 2023). Nesse processo, além do estresse oxidativo, o álcool também é responsável por promover processos inflamatórios, que reduzem a plasticidade neural e interferem na adesão celular e nas interações neuronais-gliais (COLLIER et al., 2023). Dessa forma, pode causar problemas cognitivos e dificuldade de aprendizado, transtornos comportamentais e motores (POPOVA et al., 2024; CHEN et al., 2024). Alguns estudos sugerem que a exposição do cérebro em desenvolvimento ao álcool pode aumentar as propensões ao vício (GEORGIEFF et al., 2018). E, por último, também é importante falar da interferência da exposição fetal ao álcool no DNA. Mais especificamente, na regulação epigenética e na metilação do DNA, causando problemas no desenvolvimento placentário, crescimento somático e desenvolvimento do SNC (HUMPHRIES et al., 2023; POPOVA et al., 2023; ZHENG et al., 2023).

2.3.3 Exposição embrionária a opioides

Durante a gravidez, a exposição a opioides, ilícitos como heroína ou lícitos na forma de opioides de uso médico, pode levar a complicações tanto no feto quanto nos anexos fetais (ABU; ROY, 2021; HUMPHRIES et al., 2023). A placenta, por exemplo, pode ter seus receptores opioides dessensibilizados ou desregulados, comprometendo suas funções imunológicas, vasculares e endócrinas (HUMPHRIES et al., 2023). Além disso, aumenta o risco de descolamento prematuro da placenta, que é uma das causas mais comuns de parto prematuro (HUMPHRIES et al., 2023). Através de interferências na placenta, opioides podem diminuir o suprimento de oxigênio para o feto, causando hipóxia (HUMPHRIES et al., 2023). A hipóxia pode levar ao retardo e restrição no crescimento de vários órgãos, principalmente o cérebro (BAO et al., 2019; HUMPHRIES et al., 2023). A interferência no desenvolvimento do SNC causada por opioides está associada a casos de déficits cognitivos, motores, comportamentais e de linguagem, além de memória de curto prazo prejudicada e alguns casos de microcefalia (LIND et al., 2017; BAO et al., 2019). Anomalias congênitas cardiovasculares também são observadas em bebês que foram expostos a opioides no útero (LIND et al., 2017; KIRLA et al., 2021).

Quando se trata de exposição fetal a opioides, uma das maiores preocupações é o desenvolvimento da síndrome de abstinência neonatal (SAN) (BALDO, 2022). A SAN é um termo mais abrangente relacionado a crise de abstinência que recém-nascidos sofrem após serem expostos a drogas no útero (PATRICK et al., 2020). Ela é caracterizada por um quadro de hiperatividade dos sistemas nervosos central e autônomo e do trato gastrointestinal (BALDO, 2022). Os sintomas neurológicos da SAN comumente descritos incluem aumento do estado de alerta, irritabilidade e distúrbios do sono (PATRICK et al., 2020; BALDO, 2022). Também, sintomas de hiperreatividade autonômica, como aumento da sudorese, são comumente relatados. As manifestações do trato gastrointestinal incluem sucção descoordenada e constante, alimentação deficiente, ganho de peso inadequado, vômitos, diarreia e desidratação (PATRICK et al., 2020; BALDO, 2022). Para uma classificação mais específica para a SAN quando está é causada por opioides, alguns pesquisadores utilizam o termo síndrome de abstinência neonatal de opioides (SANO) (BALDO, 2022). A SANO pode afetar entre 22 a 94% dos neonatos expostos a opioides (TOBON et al., 2019). Essa exposição pode advir do uso terapêutico de opioides feito pela mãe, do abuso de opioides de uso médico, ou do consumo de opioides ilícitos, como a heroína (PATRICK

et al., 2020; ESPOSITO et al., 2022). A exposição durante a gestação também pode ocorrer de forma intermitente, expondo o feto a múltiplos episódios de intoxicação e abstinência, o que pode levar a morte fetal intrauterina em um dos períodos de abstinência (PATRICK et al., 2020). Com o nascimento do recém-nascido, o quadro de SANO pode ser leve e transitório, com poucos sintomas e curta duração ou pode ser progressivo. Os sintomas podem aparecer logo após o nascimento, ou de forma tardia (BALDO, 2022). A SANO pode ser intermitente ou ter um curso bifásico com sinais agudos de abstinência neonatal seguidos de melhora (BALDO, 2022). Os sintomas e a duração da SANO dependem de fatores como o tipo de opioide usado pela mãe, o momento e a dosagem antes do parto, as condições do parto, o estado nutricional e a saúde geral do bebê (BALDO, 2022; ESPOSITO et al., 2022). Sintomas mais prolongados da SANO podem ser estrabismo e baixa acuidade visual (BALDO, 2022). Crianças com SANO podem ter QI mais baixo e problemas comportamentais, com TDAH, transtorno de conduta e transtorno de ansiedade. (PATRICK et al., 2021; BALDO, 2022).

2.3.4 Exposição fetal ao poliuso durante o primeiro trimestre: possíveis riscos ao feto e as limitações na literatura a respeito do assunto

A síndrome de abstinência neonatal (SAN) pode ser causada por várias substâncias com potencial de abuso e dependência, como o álcool e opioides (PATRICK et al., 2020). O poliuso dessas substâncias tem se tornado bastante comum, com 48% das mulheres grávidas que relataram uso não médico de opioides também relatando o uso de álcool (KOZHIMANNIL et al., 2017). Apesar de serem substâncias distintas em sua absorção e metabolização, tanto o álcool quanto os opioides são substâncias psicoativas depressoras do sistema nervoso central (SNC) e estudos demonstram efeitos sinérgicos entre elas (KOZHIMANNIL et al., 2017). Em relação ao seu efeito combinado no feto, não se têm estudos a respeito, mas se pode criar hipóteses a partir do extenso conhecimento que já existe sobre as consequências da exposição fetal a essas drogas separadamente. A gravidade, extensão e duração das consequências provavelmente serão influenciadas pela quantidade de drogas ingeridas, o período de uso, e o trimestre de gravidez (ABU; ROY, 2021; POPOVA et al., 2023). Cada trimestre tem sua vulnerabilidade, mas o primeiro trimestre combina dois fatores que aumentam sua susceptibilidade: com mais de 80 milhões de gestações não planejadas em todo o mundo, muitas gestantes não têm ciência da

gravidez e por isso não se abstém do uso de drogas (ASRATIE, 2020); e o primeiro trimestre é um momento de desenvolvimento inicial do feto, que ainda não tem muitas defesas próprias contra substâncias potencialmente nocivas (ABU et al., 2021). No estágio fetal, a atividade renal é limitada e a excreção do feto é feita por difusão através da placenta para o organismo materno (HUMPHRIES et al., 2023). Esse fato, junto a baixa capacidade de metabolização, cria um risco de saturação do líquido amniótico com substâncias como álcool e opioides. Se o sangue materno está com uma alta concentração dessas substâncias, o retorno para a circulação materna não será eficiente ou rápido (HUSSAIN et al., 2023). O feto tem pouca capacidade de metabolização, pois ainda não está suficientemente desenvolvido no primeiro trimestre, enzimas que metabolizam álcool ainda não existem em quantidade suficiente para uma desintoxicação completa (HUSSAIN et al., 2021). A exposição do feto a esse líquido amniótico saturado é perigosa durante o primeiro trimestre pois os mecanismos reguladores da homeostase que normalmente compensam os efeitos nocivos ainda não estão devidamente calibrados (HUSSAIN et al., 2021).

Além disso, o primeiro trimestre também é sensível devido a reprogramação epigenética sofrida pelo blastocisto (MANIKANDAN et al., 2022). Esse processo envolve a desmetilação do DNA para restaurar a totipotência das células do blastocisto e direcionar a expressão gênica para o desenvolvimento placentário e fetal (MANIKANDAN et al., 2022). Tanto o álcool quanto opioides têm capacidade de interferir em processos epigenéticos e na expressão gênica (BROWNE et al., 2020). Então, em uma situação de exposição fetal ao poliuso, provavelmente se observaria uma combinação dos efeitos listados no TEAF, na SAN e na SANO. Alguns desses efeitos são similares, pois ambas as substâncias acabam por interferir nas mesmas vias metabólicas, ou vias que se combinam (BECKER; ROSA, 2022). Os dados sobre os efeitos desse poliuso e suas vias de atuação ainda são muito limitados. Um dos motivos é o critério de “droga única” que a maioria dos estudos sobre exposição fetal a drogas adota (HOOD et al., 2020). Uma abordagem reducionista é compreensível, mas, por vezes, ela pode se afastar da realidade. E o poliuso de álcool e opioides é uma situação muito presente no cenário atual (HOOD et al., 2020). Dados epidemiológicos não são escassos, mas relacionados a biologia do desenvolvimento são. Um segundo motivo para tal situação pode ser a restrição de estudos com gestantes, por questões éticas e de segurança do feto, além dos aspectos legais (HUMPHRIES et al., 2023). Por isso, o uso de modelos alternativos, como modelos

animais, é muito utilizado para o estudo de questões que envolvem gestação e saúde fetal.

2.4 Uso de modelos animais em pesquisas científicas: histórico e questões éticas

2.4.1 Breve introdução e histórico sobre o uso

Historicamente, o uso de modelos animais data da Grécia Antiga, com Aristóteles fazendo importantes descobertas para a zoologia, anatomia e fisiologia ao dissecar animais para estudá-los (JOTA et al., 2021; BIAZOTTO, 2022). Seu trabalho intitulado “A história dos animais” começou discussões éticas a respeito do direito dos animais e seu uso como animais modelos (BIAZOTTO, 2022). O uso de modelos animais na biologia se baseia no princípio de estruturas evolutivamente conservadas no reino animal, fazendo-os compartilhar características anatômicas, fisiológicas, patológicas e comportamentais com os humanos (FACCIOL et al., 2019; JOTA et al., 2021). Além da biologia, a medicina, microbiologia, bioquímica e farmacologia representam outras áreas científicas onde modelos animais são frequentemente usados (JOTA et al., 2021). Como consequência de considerações éticas dos estudos em humanos, os modelos animais são de importância crítica para estudos relacionados à compreensão da estrutura e função de diferentes células, tecidos, órgãos e sistemas (JOTA et al., 2021). O uso de modelos animais, também, está associado ao estudo de patologias e a testes clínicos e de triagem de novas terapêuticas (FACCIOL et al., 2019; ALVES-PIMENTA et al., 2024).

Para estudos relacionados ao período gestacional e ao desenvolvimento embrionário, modelos animais vêm para solucionar diversas lacunas (ALVES-PIMENTA et al., 2024). Gestantes e fetos são dois grupos que normalmente não são utilizados em testes clínicos, por serem mais sensíveis e envolverem questões éticas em relação a sua segurança. Porém, o conhecimento a respeito da gestação, do desenvolvimento embrionário, e da interface materno-fetal, é muito importante para garantir a saúde e a segurança de gestantes e bebês (HUMPHRIES et al., 2023). Nesse campo, modelos animais permitem o estudo de diferentes condições que podem acometer as gestantes durante a gestação como alterações nutricionais; mudanças fisiológicas e anatômicas que acontecem no corpo da gestante; e patologias relacionadas ao metabolismo materno como diabetes, pressão alta e obesidade (ALVES-PIMENTA et al., 2024). Em relação ao feto, podem esclarecer

janelas críticas de desenvolvimento fetal, são úteis para estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade, e permitem observar como a interface materno-fetal afeta o desenvolvimento fetal (FACCIOL et al., 2019; ALVES-PIMENTA et al., 2024). Além disso, permitem a realização de estudos para observar na prole os efeitos das condições maternas. É possível estudar o efeito sobre o embrião de fármacos ingeridos pela mãe, criando assim protocolos com doses mais seguras (FACCIOL et al., 2019; COLLIER et al., 2023). Além disso, também permite observar o efeito da exposição fetal a substâncias nocivas, como drogas.

Para tais estudos, a escolha do modelo animal mais eficiente é muito importante e dependerá de sua similaridade com o ser humano em termos de anatomia, fisiologia e metabolismo, em relação ao que se almeja estudar (FACCIOL et al., 2019; JOTA et al., 2021). Sempre há a “espécie mais conveniente” para estudar uma questão específica, dependendo da área biológica do estudo e da fase do processo biológico (JOTA et al., 2021). Estudos que procuram entender mecanismos mais simples em períodos iniciais do ciclo reprodutivo, por exemplo, se beneficiariam de um modelo animal que permita uma abordagem reducionista, como invertebrados e peixes (FACCIOL et al., 2019). Porém, se o estudo almeja estudar situações que acometem a placenta durante a gestação, mamíferos, como roedores e coelhos são mais adequados (FACCIOL et al., 2019). Por serem filogeneticamente mais próximos dos humanos, a classe dos mamíferos é mais usada e, dentro dela, a ordem Rodentia, que inclui ratos, camundongos e porquinhos-da-índia têm um longo histórico como modelo animal (CHAVATTE-PALMER et al., 2016; JOTA et al., 2021). Dentre esses, os camundongos são os modelos animais mais comumente usados no mundo. Suas vantagens logísticas incluem a facilidade de fornecimento e manuseio, com baixo custo de manutenção; tamanho pequeno e prole ampla, com gestação curta; e sua aceitação cultural como modelo animal (FACCIOL et al., 2019). Sua maior desvantagem é não permitir o estudo de períodos gestacionais específicos *in vivo* sem a eutanásia da mãe (FACCIOL et al., 2019). É um animal que possui comportamento de cuidado parental, com os filhotes completamente dependentes da mãe (FACCIOL et al., 2019).

Um modelo animal considerado o ideal em relação às suas similaridades com os humanos são os primatas não humanos (CHAVATTE-PALMER et al., 2016). Estão filogeneticamente mais próximos, e por isso a estrutura anatômica, fisiológica e sua resposta a diversas patologias é muito similar (CHAVATTE-PALMER et al., 2016). No

entanto, seu uso para pesquisa biomédica é muito limitado por seu custo elevado e importantes questões éticas relativas à sua organização comportamental e social; sua maior capacidade de percepção de situações que causam medo e dor (CHAVATTE-PALMER et al., 2016; MARTÍNEZ-BURNES *et al.*, 2021). Primatas não-humanos têm forte comportamento de cuidado parental, e o sofrimento causado em estudos relacionados ao período gestacional precisa ser levado em consideração. (CHAVATTE-PALMER et al., 2016; MARTÍNEZ-BURNES *et al.*, 2021).

2.4.2 Ética no uso animal para pesquisa

Ao longo dos anos, questões a respeito do bem-estar animal foram gradualmente ganhando força na opinião pública, levando a um crescimento nas discussões éticas sobre o uso de animais em pesquisa (YADAV et al., 2024). Isso trouxe mudanças muito importantes, que deram origem aos procedimentos e diretrizes legais em vigência atualmente (LOSS et al., 2021; YADAV et al., 2024). No fim do século XX, no 3º Congresso Mundial sobre Alternativas e Uso Animal nas Ciências da Vida, a Declaração de Bolonha foi assinada. Essa declaração, entre outras coisas, afirmava que para se fazer boa ciência, em relação ao uso de animais em laboratório, se deve priorizar a promoção e a aplicação dos 3Rs (JOHNSTON; NEVALAINEN, 2002; JOTA et al., 2021). Os 3Rs fazem referência aos princípios estabelecidos pelos cientistas britânicos Russel e Burch em 1959, para guiar o planejamento de estudos científicos e o uso de modelos animais (YADAV et al., 2024). Os 3 Rs, em inglês, significam *Reduction* (redução), *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento). Basicamente, fala de uma redução no número de animais utilizados em testes; substituir, sempre que possível, o uso de animais por formas alternativas, como modelos computacionais ou *in vitro*; e refinar os protocolos e procedimentos de um experimento para minimizar o sofrimento animal (YADAV et al., 2024). Atualmente, em todo o mundo, a pesquisa animal só pode ser desenvolvida em conformidade com os requisitos regulatórios legais como a inspeção e o licenciamento de locais com animais; o treinamento de todas as pessoas envolvidas em sua manipulação e criação; e a sujeição obrigatória de cada projeto a avaliação ética por um Comitê de Ética Animal (JOTA et al., 2021).

2.5 Zebrafish como modelo animal para estudo de embriotoxicidade

2.5.1 Principais vantagens no uso do zebrafish como modelo animal

O princípio dos 3Rs também diz respeito ao uso de espécies mais simples para realizar determinados estudos (FACCIOL et al., 2019). Com formas de vida intelectualmente menos complexas e sencientes, porém que ainda tenham características adequadas para estudar as questões necessárias (FACCIOL et al., 2019). Os peixes, como o *zebrafish* (*Danio rerio*), são os vertebrados mais simples e evolutivamente mais antigos que se pode empregar em pesquisas (FACCIOL et al., 2019; JOTA et al., 2021). O *zebrafish* é um peixe teleósteo, originário do sul asiático, que habita corpos de água doce (COLLIER et al., 2023). O último ancestral comum entre peixes e humanos viveu há cerca de 400 milhões de anos, o que torna o *zebrafish* uma forma animal mais simples em comparação a humanos (FACCIOL et al., 2019). Porém, devido a mecanismos evolutivamente conservados, o *zebrafish* possui uma homologia genética de 70% com os humanos, além de estruturas anatômicas e vias metabólicas semelhantes (COLLIER et al., 2023). Desde a década de 1970, o *zebrafish* tem sido utilizado como modelo animal em estudos, com seus resultados sendo extrapolados para comparação em humanos (FERNANDES et al., 2018).

O *zebrafish*, também, apresenta algumas vantagens logísticas em relação a outros modelos. É um animal pequeno, com manutenção relativamente barata e fácil, representando um bom custo-benefício em relação a outros modelos (COLLIER et al., 2023). Além disso, é muito fértil, com centenas de ovos por acasalamento, criando grandes amostras (FERNANDES et al., 2018). Uma das grandes vantagens do *zebrafish* sobre os outros modelos, é justamente sua fertilização e desenvolvimento externos (COLLIER et al., 2023). Testes com exposição embrionária em outros modelos animais como murinos, acabam tendo limitações como a interferência do organismo materno na concentração da substância de exposição e a dificuldade em observar os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, pois este acontece dentro da mãe (FACCIOL et al., 2019; COLLIER et al., 2023). Geralmente, a mãe precisa ser eutanasiada para se ter acesso aos embriões nos estágios iniciais, o que levanta questões éticas a respeito do bem-estar animal (FACCIOL et al., 2019). Com o desenvolvimento externo em ovos transparentes, sem necessidade de cuidado parental, o *zebrafish* se mostra um modelo excelente para observação em tempo real do desenvolvimento embrionário e como drogas e outras substâncias podem acabar interferindo nesse processo (FACCIOL et al., 2019; MANIKANDAN et al., 2022). A divisão e a migração celular nos estágios de blastulação e gastrulação, com o

movimento de epibolia, são facilmente observados nos embriões transparentes (MANIKANDAN et al., 2022). A fase larval desse animal também é transparente, o que permite a visualização de órgãos em pouco tempo de desenvolvimento (MANIKANDAN et al., 2022). A exposição do *zebrafish* também atende aos critérios éticos por ser realizada de forma não-invasiva, por imersão. Isso, também, possibilita uma maior precisão na concentração que cada embrião do estudo receberá, já que podem ser imersos juntos, ao mesmo tempo (FACCIOL et al., 2019; COLLIER et al., 2023).

O desenvolvimento inicial, a somitogênese e o estabelecimento do plano corporal do *zebrafish* ocorrem em 24 horas (MANIKANDAN et al., 2022). Por ser um vertebrado, essas primeiras 24 horas de vida do *zebrafish* podem ser comparadas a um primeiro trimestre de gestação humana (FERNANDES et al., 2015). De acordo com Patton e colaboradores (2021), o *zebrafish* possui um desenvolvimento tecidual e homeostase similar aos humanos, incluindo o desenvolvimento de vários tecidos e órgãos. Seu desenvolvimento se dá de forma rápida, o que permite a obtenção de resultados em pouco tempo. Já é um animal bem estabelecido em estudos sobre a biologia do desenvolvimento (MANIKANDAN et al., 2022). O rápido desenvolvimento do animal, permite que os efeitos da exposição ao álcool e a opioides sejam observados em pouco tempo (COLLIER et al., 2023). Em até 3 dias após a fertilização é possível que o *zebrafish* esteja nadando e sua movimentação pode ser filmada para posterior avaliação (PATTON et al., 2021). Distúrbios na estrutura do SNC e de comportamento estão relacionados tanto à exposição ao álcool e o modelo de TEAF, quanto à exposição aos opioides. E o *zebrafish* também pode ser utilizado nesse caso. A anatomia e as vias neuroquímicas estão conservadas no *zebrafish* e podem ser comparadas a de humanos (BAO et al., 2019). Junto a isso, muito do seu comportamento padrão já foi descrito, tanto dos adultos quanto dos embriões (PATTON et al., 2021). Comportamentos ligados a forrageio, ansiedade, interação social, resposta a estímulos visuais e mecânicos são facilmente observáveis (FACCIOL; GERLAI, 2020; PATTON et al., 2021; GOMES et al., 2024). Eles são capazes de tomar decisões com base nos estímulos do ambiente e de construir memória. Distúrbios do SNC já são bastante estudados no *zebrafish* (SHAMS et al., 2018). Também, já é muito utilizado como um modelo animal para TEAF e exposição embrionária a opioides (FERNANDES et al., 2018; KIRLA et al., 2021; COLLIER et al., 2023).

2.5.2 *Zebrafish* como modelo animal para estudo da exposição embrionária ao álcool

Os mecanismos relacionados a teratogenicidade do álcool são conservados entre as espécies, o que torna possível o uso do *zebrafish* para estudar a exposição ao álcool e usar os resultados para comparações com dados extraídos de estudos com humanos (COLLIER et al., 2023). Para chegar a essa conclusão, vários estudos foram realizados para avaliar o sucesso na indução de TEAF e fenótipos de exposição ao álcool no *zebrafish*. O TEAF tem um amplo leque de sintomas, morfológicos e neurocomportamentais. Fernandes e colaboradores (2018), trouxeram exemplos de estudos em que as características craniofaciais do TEAF foram observadas em modelo *zebrafish*. Também, discutiram estudos que traziam informações sobre o uso desse animal em avaliações comportamentais e cognitivas em fenótipos de TEAF para avaliar comportamento ansiogênico, coesão social, capacidade de aprendizado e construção de memória. Collier e colaboradores (2023) discutiram o uso do *zebrafish* para a avaliação de danos ao SNC causados pela exposição ao álcool. Por conta da conservação evolutiva que cria um padrão básico neuroanatômico e das vias neuroquímicas, o *zebrafish* pode ser utilizado como modelo animal para estudar distúrbios no SNC. Em relação ao uso do *zebrafish* para avaliar embriotoxicidade, Manikandan e colaboradores (2022) discutiram e reuniram exemplos do uso do *zebrafish* para avaliar os efeitos da exposição ao álcool durante o início do desenvolvimento fetal, demonstrando a possibilidade de investigar os efeitos do álcool durante a formação do blastocisto, a fase de gastrulação e através da porcentagem do movimento epibólico. Facciol e colaboradores (2019) defenderam a abordagem reducionista que esse animal possibilita em estudos com TEAF, um fenótipo tão complexo. O *zebrafish* como modelo animal para TEAF foi avaliado em relação a distúrbios genéticos (SARMAH et al., 2016; SARMAH et al., 2020a), cardíacos (ZHANG et al., 2023; WEEKS et al., 2024), neurológicos (FACCIOL; GERLAI, 2020; YIN et al., 2023), comportamentais (CADENA et al., 2020b; FACCIOL; GERLAI, 2020). O *zebrafish* também foi utilizado para o estudo dos efeitos da exposição ao álcool em órgãos específicos como o fígado (Park et al., 2023), o coração (SARMAH; MARS, 2017; WEEKS et al., 2024), os olhos (MURALIDHARAN et al., 2018; CLAYMAN et al., 2023).

Além de possibilitar estudos para a avaliação de órgãos específicos, o rápido desenvolvimento do *zebrafish* possibilita o uso dos embriões para avaliar como a exposição ao álcool no início do desenvolvimento afetará esse animal em outras fases (COLLIER et al., 2023). Segundo Manikandan e colaboradores (2022), embriões de *zebrafish* tratados com etanol apresentam efeitos tóxicos já nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, a partir de 2 horas pós-fertilização (hpf). Tais efeitos incluem a redução da migração celular durante o movimento epibólico, devido a defeitos na adesão celular e organização dos microtúbulos, podendo gerar, também, interferência na sinalização celular, reduzindo a progressão de estágios posteriores do desenvolvimento embrionário (MANIKANDAN et al., 2022). Tais interferências no início do desenvolvimento embrionário, podem ser investigadas através de estudos comportamentais já na fase larval do animal, ainda que os efeitos morfológicos não se mantenham (FERNANDES et al., 2015; COLLIER et al., 2023).

2.5.3 *Zebrafish* como modelo animal para estudo da exposição embrionária a opioides

Em relação aos opioides, o *zebrafish* apresenta receptores opioides a partir de 3 hpf, permitindo que essa substância também seja estudada já no início do desenvolvimento fetal (KIRLA et al., 2021). Os efeitos da exposição embrionária a opioides relatados geralmente estão ligados a defeitos no coração (que se forma em 5 hpf no *zebrafish* [BROWN et al., 2016]) (KIRLA et al., 2021). Para avaliações em órgãos específicos como o coração, o *zebrafish* também foi utilizado, e possibilitou a elucidação de possíveis mecanismos para os defeitos no coração induzidos por opioides (JIA et al., 2024). Os efeitos tóxicos de opioides em outros órgãos como cérebro e fígado (LIU et al., 2023) também foram avaliados em *zebrafish*. Seu uso para entender padrões de abuso relacionados a opioides e outras drogas também foi investigado (MULLER et al., 2020).

A exposição fetal a opioides está relacionada a possíveis malformações ligadas ao estresse oxidativo induzido pelos opioides, e distúrbios neurocomportamentais (GIOVANNINI et al., 2024). O *zebrafish* já foi utilizado em estudos para a avaliação de toxicidade de opioides no comportamento (SALES-CADENA et al., 2021; WANG et al., 2022); para avaliação da neurotoxicidade (BAO et al., 2019; WANG et al., 2022); indução de defeitos na transcrição do DNA (HERRERO-TURIÓN et al., 2014; CALDERON-GARCIA et al., 2022); e embriotoxicidade (SARMAH et al., 2020b; KIRLA

et al., 2021). Kirla e colaboradores (2021), utilizaram o *zebrafish* para avaliar os efeitos tóxicos de opioides no embrião, utilizando o modelo para estabelecer taxas de concentração letal e subletal para diversos opioides. Com isso, além de avaliar mortalidade causada por tais opioides, também se observou as malformações induzidas por opioides nos embriões. Atrasos no desenvolvimento também são possíveis de analisar utilizando o *zebrafish*, através da avaliação de seu desenvolvimento embrionário e monitoramento do momento de eclosão dos animais (SALES-CADENA et al., 2020; KIRLA et al., 2021). Tais estudos de embriotoxicidade dos opioides no *zebrafish* permite a avaliação da exposição fetal a opioides em um contexto de gravidez (SALES-CADENA et al., 2020).

2.5.4 Zebrafish como modelo animal para estudos comparativos e avaliação de terapêuticas

Mesmo em suas limitações em relação a outros modelos, o *zebrafish* precisa ser incluído em testes de embriotoxicidade, por questões comparativas. A utilização de mais de um animal modelo pode garantir uma maior segurança dos resultados apresentados, aumentar a relevância quando se extrapola os resultados para humanos, e abranger o escopo de resultados, com mais exemplos. Um exemplo clássico é o caso da talidomida, fármaco vendido para enjoo que foi responsável por malformações congênitas caracterizadas por deformidades nas pernas e nos braços de cerca de 10 mil bebês na década de 1950 (FACCIOL et al., 2019). Os testes clínicos de embriotoxicidade da talidomida haviam sido realizados apenas com modelos animais murinos, que não mostraram qualquer sinal de efeito tóxico, porém, quando realizados com o *zebrafish*, a talidomida causou os mesmos defeitos morfológicos nos membros que causou em humanos (FACCIOL et al., 2019). Essa possibilidade de uso para avaliar a embriotoxicidade de fármacos o torna um modelo animal utilizado em testes teratogênicos e triagem de novos fármacos e substâncias com potencial protetor e terapêutico (COLLIER et al., 2023). Utilizando o *zebrafish*, se pode tanto observar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias como álcool e opioides, quanto testar moléculas capazes de proteger o embrião contra efeitos tóxicos.

2.6 Uso de antioxidantes contra a exposição fetal a drogas: relevância do estado nutricional materno e o potencial antioxidante do ácido fólico e da quercetina

2.6.1 A importância da nutrição no período gestacional

Durante o período gestacional, o estado nutricional materno é de suma importância, da pré-concepção à lactação (REYNOLDS et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Em razão das diversas mudanças fisiológicas, o organismo materno acaba por apresentar uma deficiência de micronutrientes (REYNOLDS et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Tal situação pode afetar tanto a saúde materna, quanto o desenvolvimento fetal (REYNOLDS et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Em gestações humanas, o feto é totalmente dependente da interface materno-fetal para receber nutrientes e deficiências nutricionais podem interferir no crescimento fetal e na expressão gênica (REYNOLDS et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Uma má nutrição por parte da mãe pode aumentar o risco de perda fetal (REYNOLDS et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Nos estágios iniciais da gravidez, o blastocisto em desenvolvimento é muito sensível a desequilíbrios na disponibilidade de micronutrientes (STEANE et al., 2023). A má nutrição pode resultar em perda do embrião. Além disso, ainda pode induzir mudanças na plasticidade dos tecidos e na calibração de respostas metabólicas do organismo, principalmente em situações de desequilíbrio metabólico ou exposição a tóxicos que precisam ser compensados (ODHIAMBO et al., 2020; REYNOLDS et al., 2021). Um dos principais equilíbrios metabólicos que precisa ser mantido para que tanto o embrião quanto o organismo materno tenham um ambiente saudável para dar curso a gestação, é o equilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUSSAIN et al., 2021).

2.6.2 Papel das EROs no desenvolvimento embrionário

Em uma gestação normal, a necessidade de um fornecimento consistente e ininterrupto de nutrientes e oxigênio para os tecidos e órgãos do feto em desenvolvimento acaba por gerar EROs nos tecidos maternos e fetais (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023). EROs são resultado de uma redução incompleta do oxigênio que acontece, predominantemente, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (DINIZ et al., 2023). Em estágios iniciais, durante todo o primeiro trimestre, os níveis de oxigênio nos tecidos são mais baixos, para estimular a angiogênese (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Um nível mais baixo de oxigênio gera menos EROs, mas ainda existe a necessidade da atuação de antioxidantes para manter o equilíbrio (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023). No organismo, a depender de seus níveis e da manutenção do equilíbrio EROs-Antioxidantes, EROs têm um efeito bifásico (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023).

Em níveis moderados, com o equilíbrio metabólico mantido, EROs são importantes participantes na sinalização de processos do desenvolvimento fetal, como a replicação, diferenciação e maturação de células e órgãos (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023). EROs são essenciais para a progressão adequada do desenvolvimento fetal. No entanto, em excesso, sem o adequado contrabalanceamento de antioxidantes, pode levar a um estado de estresse oxidativo, que induz danos graves a tecidos e órgãos (DINIZ et al., 2023; VASKOVÁ et al., 2023). O estresse oxidativo compromete a integridade estrutural das membranas celulares e interfere no processo de organogênese (HUSSAIN et al., 2021; DINIZ et al., 2023). Em razão disso, à exposição fetal a substâncias que podem aumentar os níveis de EROs na mesma medida em que reduzem os níveis de antioxidantes ou afetam o seu papel no organismo pode ser muito prejudicial. A exposição a álcool e opioides tem potencial para induzir exatamente esse tipo de desequilíbrio metabólico. Por ter os níveis de EROs mais baixos, de forma equilibrada, os níveis de antioxidante durante o primeiro trimestre serão mais baixos (DINIZ et al., 2023). Por isso, o organismo em estágios tão iniciais muito provavelmente não estará preparado para responder a um nível maior de EROs (DINIZ et al., 2023). Além disso, a produção de antioxidantes endógenos do feto pode ser prejudicada. Em situações de má nutrição materna, a exposição a álcool e opioides em estágios iniciais do desenvolvimento fetal pode exacerbar ainda mais os efeitos descritos acima.

2.6.3 O uso de antioxidantes durante a gestação

Em condições normais, o corpo humano é capaz de produzir antioxidantes endógenos, como a glutatona e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, que atuam em vários processos biológicos como a função mitocondrial, inflamação e o equilíbrio metabólico com as EROs (DINIZ et al., 2023). Antioxidantes são muito importantes para impedir quadros de estresse oxidativo, prevenindo danos às proteínas e lipídios que compõem as membranas das células e organelas e ao DNA (DINIZ et al., 2023; VASKOVÁ et al., 2023). Além disso, podem atuar como cofator de enzimas que participam da diferenciação e desenvolvimento celular. Antioxidantes exógenos podem ser alimentares ou sintéticos. Os alimentares, como as vitaminas e polifenóis, podem ser encontrados em frutas, vegetais, cereais e peixes (ZARBAKHS et al., 2021). Eles têm conhecidas propriedades antioxidantes, mas, também, antiinflamatórias, antibacterianas e antienvhecimento (STEAGE et al.,

2023). Os antioxidantes sintéticos são manipulações laboratoriais, geralmente para melhorar a absorção e a biodisponibilidade. O mais famoso dentre eles, é o ácido fólico (AF). A suplementação com antioxidantes para mulheres grávidas, ou que planejam engravidar, é uma das principais recomendações do acompanhamento pré-natal (KALDYGULOVA et al., 2023). Embora o corpo tenha mecanismos para produzir antioxidantes, as fontes exógenas ainda são necessárias no período gestacional (HUSSAIN et al., 2023). As fontes alimentares são incluídas na dieta da gestante, mas, por segurança, a suplementação com antioxidantes sintéticos também é indicada, por não terem tanta flutuação na concentração (HUSSAIN et al., 2023). O AF é um antioxidante sintético amplamente aceito como suplemento para gestantes, até mesmo na fase de planejamento da gravidez (KALDYGULOVA et al., 2023).

2.6.4 O uso do ácido fólico durante a gestação

O AF é a forma sintética do folato, também conhecido como vitamina B9. O folato não é sintetizado pelo organismo e deve ser adquirido pela dieta, através de alimentos ricos em folato como vegetais verdes e frutas (LIU, 2020). Porém, o folato em seu estado natural é muito instável, e uma parte de sua concentração é perdida durante o processamento dos alimentos (LIU, 2020). Por isso, se criou o AF. O AF pode ser obtido em suplementos dietéticos e adicionado a alimentos fortificados, o que já é feito por muitos países, como o Brasil (LIU, 2020). No início dos anos 2000, estudos ligaram a suplementação com AF a diminuição de distúrbios na gravidez, como retardo no crescimento, defeitos no tubo neural, anencefalia, malformações congênitas em geral e abortos espontâneos (VASKOVÁ et al., 2023). Por isso, a suplementação com AF durante a gestação é mundialmente aceita. Em 2006, a OMS recomendou, também, a suplementação com AF para mulheres em idade fértil. (LIU, 2020). A atuação do AF na gestação se dá, principalmente, através da sua atuação na metilação do DNA, que é muito importante para a replicação do DNA (STEANE et al., 2023). O AF é uma importante coenzima para o transporte dos grupos metil que serão utilizados no DNA para a geração de nucleotídeos (STEANE et al., 2023). Os nucleotídeos são necessários para a replicação do DNA, o que acontece durante a divisão celular, processo especialmente importante durante o desenvolvimento embrionário, com a formação de tecidos e órgãos (STEANE et al., 2023). Além disso, como coenzima, também atuará na reparação do DNA, principalmente contrabalançando danos causados por estresse oxidativo (STEANE et al., 2023).

Durante o desenvolvimento inicial do embrião, o AF, além de participar na biossíntese de nucleotídeos, também atua na reprogramação epigenética que acontece no blastocisto (STEANE et al., 2023). Além disso, atua no transporte de aminoácidos, na expressão de RNAm e na expressão gênica através de seu papel na metilação do DNAm (STEANE et al., 2023).

Outra atuação importante do AF é como neuroprotetor. Ele é amplamente aceito como um protetor do desenvolvimento do tubo neural, a estrutura embrionária que dará origem ao SNC. Liu e colaboradores (2020), reuniu, entre dados epidemiológicos e estudos experimentais, informações que relatam que a deficiência de AF nos estágios iniciais de gestação pode gerar danos no neurodesenvolvimento fetal. A suplementação com AF está associada às funções motoras e linguísticas, e ao desempenho neurocognitivo em crianças (LIU et al., 2020; STEANE et al., 2023). Também, está associada a uma redução de anomalias comportamentais (CHEN et al., 2021). Muitos estudos o utilizam como protetor do desenvolvimento embrionário e neuroprotetor, especialmente contra os danos causados pela exposição fetal ao álcool, como em modelos de TEAF (CADENA et al., 2020a; 2020b; JIANG et al., 2020). É conhecido que o álcool, como teratogêno, causa malformações congênitas e distúrbios neurocomportamentais (POPOVA et al., 2023). Ele pode aumentar os níveis de EROs e induzir estresse oxidativo, interferir na metilação do DNA, interferir nas vias de enzimas antioxidantes e no metabolismo do AF (CADENA et al., 2020a; ZHENG et al., 2023). A ingestão de álcool durante a gravidez, um momento de vulnerabilidade nutricional com maior susceptibilidade a deficiências de micronutrientes, é especialmente perigoso para a saúde materna e para o desenvolvimento fetal (LANGE et al., 2017). A associação entre o álcool e outras substâncias que também causam estresse oxidativo e interferem em vias enzimáticas, como opioides, tem potencial para causar muitos danos ao feto (KANNAN et al., 2024). Os danos são em vias de atuação de antioxidantes, por isso, os antioxidantes são geralmente escolhidos para avaliação de seu potencial protetor e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Dentre os antioxidantes escolhidos, o AF acaba sendo uma das principais opções, não apenas por suas propriedades já comprovadas, mas por seu uso mundialmente aceito na suplementação de gestantes (KALDYGULOVA et al., 2023). Fazer combinações do AF com outros antioxidantes parece ter efeito positivo no desenvolvimento embrionário (HUSSAIN et al., 2021). É comum que estudos utilizem mais de um potencial protetor.

2.6.5 O uso da quercetina durante a gestação

A quercetina (QUE) é um antioxidante exógeno, um flavonoide do grupo dos polifenóis, podendo ser encontrado em frutas e vegetais. Os flavonoides são muito estudados, também, por seu potencial antiinflamatório (VASKOVÁ et al., 2023). Seu mecanismo de ação é principalmente na via de transdução de sinais que compensa os níveis de EROs, e impede o estresse oxidativo ao interromper as reações em cadeia geradas pelos radicais livres (HUSSAIN et al., 2021; SSILVA; SILVA, 2023). Polifenóis como a QUE podem, também, inibir enzimas produtoras de EROs, prevenindo danos celulares e apoptose (DINIZ et al., 2023). Por ser naturalmente abundante em alimentos e ter propriedades antioxidantes e inflamatórias com potencial protetor contra distúrbios metabólicos, já vem sendo utilizada como suplemento alimentar (VASKOVÁ et al., 2023). Porém, sua segurança para uso por gestantes e para exposição fetal ainda vem sendo avaliada. O uso da QUE no desenvolvimento fetal ainda está sendo estudado. Em diferentes modelos animais como murinos e o *zebrafish*, a QUE não induziu efeitos tóxicos (CADENA et al., 2020a; YOSHIDA et al., 2024) e reduziu o retardo no crescimento e a mortalidade fetal. Yoshida e colaboradores (2024) observaram uma possível influência da QUE na prevenção de alterações esqueléticas e na promoção do crescimento fetal. Em alguns estudos, a QUE é utilizada, também, como protetora do desenvolvimento fetal (PÉREZ-PASTÉN et al., 2010) e contra os efeitos de substâncias teratogênicas que causam estresse oxidativo como o álcool (CADENA et al., 2020a).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar um modelo animal de intoxicação fetal ao poliuso de álcool e opioides em *zebrafish*, e investigar o potencial efeito protetor do ácido fólico e da quercetina contra a intoxicação fetal por poliuso.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar a intoxicação por poliuso de álcool e opioides, de forma isolada e em associação, em *zebrafish*;
2. Avaliar os possíveis efeitos teratogênicos induzidos pela intoxicação por poliuso de álcool e opioides, de forma isolada e em associação, analisando a porcentagem da epibolia, a taxa de desenvolvimento embrionário, e a taxa de eclosão;
3. Avaliar o efeito protetor do ácido fólico e da quercetina, de forma isolada e em associação, contra a intoxicação por poliuso de álcool e opioides, também de forma isolada e em associação, analisando a porcentagem da epibolia, a taxa de desenvolvimento embrionário, e a taxa de eclosão;
4. Analisar o uso do *zebrafish* como modelo animal para avaliação do efeito protetor do ácido fólico e da quercetina contra a intoxicação por poliuso de álcool e opioides.

4 RESULTADO

Artigo a ser enviado para revista internacional

Efeitos protetores do ácido fólico e da quercetina contra os defeitos induzidos pelo uso concomitante de etanol e opioides em modelo de zebrafish

Resumo

Este estudo avaliou o potencial protetor do ácido fólico (AF) e da quercetina (QUE), bem como da mistura binária de ambos, frente aos efeitos tóxicos induzidos pelo álcool (EtOH) e opioides (TL) em modelo embrionário de zebrafish. Embriões de zebrafish foram expostos a EtOH (150 mM), TL (cloridrato de tramadol como opioide) (24 μ M) e à mistura binária dessas substâncias por 6 ou 22 hpf, sendo tratados com coexposição a AF (75 μ M), QUE (75 μ M) e suas combinações. Foram avaliados parâmetros de desenvolvimento, tais como porcentagem de epibolia (2–8 hpf), efeitos teratogênicos (2–24 hpf), taxa de desenvolvimento (2–24 hpf) e taxa de eclosão (2–144 hpf). A exposição ao EtOH reduziu a porcentagem de epibolia, bem como as taxas de desenvolvimento e eclosão. A exposição ao TL induziu efeitos teratogênicos, como edemas no pericárdio. A coexposição EtOH+TL reduziu a porcentagem de epibolia e a taxa de desenvolvimento, porém sem diferença significativa em relação aos efeitos induzidos apenas pelo EtOH. Somente o AF apresentou efeito protetor frente às alterações induzidas pelo EtOH, revertendo totalmente a redução na porcentagem de epibolia e na taxa de eclosão, e parcialmente a redução na taxa de desenvolvimento. O AF não protegeu contra os efeitos induzidos pelo TL, mas apresentou proteção frente à redução da epibolia causada pela coexposição EtOH+TL. A QUE não demonstrou efeito protetor contra os defeitos induzidos por EtOH, TL ou EtOH+TL, e indicou possível toxicidade quando coadministrada com TL, ao reduzir a porcentagem de epibolia. A combinação AF+QUE apresentou sinais de possível toxicidade, também reduzindo a porcentagem de epibolia, sem proteção frente aos efeitos induzidos por EtOH, TL ou EtOH+TL. Em conclusão, este estudo fornece novas evidências sobre os efeitos tóxicos da exposição embrionária ao EtOH e TL, corroborando resultados de pesquisas anteriores quanto à ação parcialmente protetora do AF frente aos defeitos induzidos pelo EtOH na epibolia e no desenvolvimento embrionário.

1. Introdução

A prevalência do uso simultâneo de substâncias psicoativas, como álcool e opioides, tem aumentado nos últimos anos (HOOD et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde relata um crescimento preocupante nos transtornos relacionados ao uso de drogas, que atualmente afetam 39,5 milhões de pessoas — um aumento de 45% na última década (WHO, 2023). O uso de uma substância frequentemente predispõe o indivíduo ao consumo de outras, intensificando as preocupações globais com comportamentos abusivos e episódios de consumo excessivo. A pandemia de COVID-19 impactou significativamente essa questão, agravando problemas de saúde mental como ansiedade, estresse e transtorno de estresse pós-traumático (HOOD et al., 2020; SMITH et al., 2020; POPOVA et al., 2021).

As mulheres apresentam maior incidência de problemas de saúde mental, e o número de mulheres em idade fértil que consomem drogas como álcool e opioides tem aumentado de forma alarmante. Nessa faixa etária, a suscetibilidade à gravidez não planejada é elevada (44–65%), o que resulta em gestações com planejamento pré-natal inadequado e maior consumo de substâncias durante esse período (POPOVA et al., 2021; COOK, 2022). Tanto o álcool quanto os opioides são capazes de atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica, promovendo estresse oxidativo e interferindo nos padrões das enzimas antioxidantes. O uso concomitante de substâncias apresenta maior risco de desfechos adversos maternos e neonatais, com possíveis comprometimentos neurológicos, morfológicos e comportamentais de longo prazo para a criança (INCE, 2020; BECKER; ROSA, 2022).

Diversos antioxidantes biológicos utilizados durante a gestação como suplementação nutricional para mãe e filho podem proteger células e tecidos contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (KALDYGULOVA et al., 2023). Dois antioxidantes amplamente conhecidos são a quercetina e o ácido fólico. O ácido fólico é comumente utilizado por gestantes e, juntamente com a quercetina, tem sido investigado como possível agente protetor contra distúrbios relacionados à exposição ao álcool, como o transtorno do espectro alcoólico fetal (TEAF) (INCE, 2020; CADENA et al., 2020a; 2020b).

O zebrafish é um modelo animal consolidado para estudos sobre TEAF e outras pesquisas envolvendo exposição embrionária a drogas desde a década de 1970 (FERNANDES et al., 2018). Também é utilizado em ensaios clínicos de toxicidade e triagem de terapias potenciais (COLLIER et al., 2023; MACRAE; PETERSON, 2023). Os resultados obtidos podem ser extrapolados para comparação com humanos, uma

vez que o zebrafish apresenta similaridade fisiológica com outros vertebrados, compartilhando cerca de 70% de similaridade genética com os seres humanos (MANIKANDAN et al., 2022; COLLIER et al., 2023). Devido à natureza evolutivamente conservada dos mecanismos de desenvolvimento precoce, as primeiras 24 horas após a fertilização do zebrafish podem ser comparadas ao primeiro trimestre da gestação humana (FERNANDES et al., 2015). Estudos indicam maior exposição embrionária a drogas no início da gravidez em comparação aos trimestres posteriores, frequentemente devido à detecção tardia da gestação.

O desenvolvimento do zebrafish ocorre fora do organismo materno, em ovos transparentes, permitindo a observação em tempo real da divisão e movimentação celular (COLLIER et al., 2023). Isso possibilita o acompanhamento dos efeitos da exposição a drogas em marcos iniciais do desenvolvimento, como a epibolia durante a gastrulação (MANIKANDAN et al., 2022; COLLIER et al., 2023). Além disso, o rápido desenvolvimento do zebrafish permite a observação de diferentes períodos de desenvolvimento em curto intervalo de tempo, passando do estágio de gástrula ao de farínghula em 24 horas (KIMMEL et al., 1995). Esse modelo pode ser utilizado para avaliar como a exposição a drogas interfere em diferentes períodos do desenvolvimento, por meio da análise da taxa de desenvolvimento. O zebrafish representa um modelo de baixo custo para o estudo de diversas substâncias, sendo amplamente utilizado na avaliação dos efeitos tóxicos de misturas químicas durante o estágio embrionário (HOOD et al., 2020; PADILHA et al., 2024; GOMES et al., 2024).

Muitos estudos sobre exposição a drogas, transtornos relacionados ao uso de substâncias e suas consequências focam em critérios de “droga única” (HOOD et al., 2020). No entanto, essa abordagem pode não refletir adequadamente a complexa realidade dos transtornos por uso de substâncias nos últimos anos (CRUMMY et al., 2020; BOARD et al., 2023). É essencial compreender como diferentes drogas podem interagir e influenciar mutuamente seus efeitos quando utilizadas em conjunto. Modelos que avaliem o uso concomitante de álcool e opioides ainda são escassos, assim como os dados sobre alterações no desenvolvimento induzidas por essa combinação. As substâncias com potencial protetor frente ao uso concomitante de drogas — que poderiam levar ao desenvolvimento de novas farmacoterapias — permanecem amplamente desconhecidas. Neste estudo, foram realizados experimentos para testar os efeitos da exposição embrionária precoce ao álcool e opioides, bem como os possíveis efeitos protetores do ácido fólico e da quercetina em

zebrafish, por meio da análise da porcentagem de epibolia, efeitos teratogênicos, taxa de desenvolvimento e taxa de eclosão.

2. Material and methods

2.1. Manutenção e reprodução de zebrafish

Os experimentos foram realizados no biotério do Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da mesma instituição (número de licença 9558080922). Zebrafish adultos (*Danio rerio*, linhagem WT, com 12 meses de idade) foram mantidos em aquários aerados de 80 L (níveis de oxigênio de 11 mg/L). Os animais foram alimentados três vezes ao dia, sendo duas com ração comercial para peixes ($\approx 30\%$ de proteína bruta) e uma com alimento vivo (*Artemia* spp.). De acordo com as diretrizes da OECD 236 (OECD, 2013) e Westerfield (2000), os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 14:10 h, temperatura de 26 ± 1 °C e pH de $7,0 \pm 0,5$. Outros parâmetros abióticos, como níveis de amônia, nitrito e nitrato, estavam dentro dos limites aceitáveis para a espécie (OECD, 2013).

Câmaras de reprodução (Zebclean, Alesco) foram utilizadas para o acasalamento dos animais, com proporção macho/fêmea de 2:1 (Westerfield, 2000). Os ovos foram coletados 30 minutos após o cruzamento e, conforme a OECD 236 (2013), apresentaram mais de 90% de viabilidade, provenientes de um lote com taxa de fertilização geral $\geq 70\%$. Os ovos foram incubados seguindo os mesmos parâmetros abióticos descritos anteriormente.

2.2 Reagentes e preparação das soluções estoque

O ácido fólico (AF) (lote # WXBD472V, número CAS 50-30-3, pureza $\geq 97\%$) e a quercetina (QUE) (lote # WXBD7412V, número CAS 61-97-8, pureza $\geq 95\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). O EtOH anidro (lote # 51574, número CAS 64-17-5, pureza $\geq 99,8\%$) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (lote # 67754, número CAS 67-68-5, pureza $\geq 99,9\%$) foram adquiridos da Neon Comercial Reagentes Analíticos LTDA (Suzano, São Paulo, Brasil). O cloridrato de tramadol (TL) foi adquirido em farmácia comercial. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

As soluções estoque de quercetina (QUE) e ácido fólico (AF) foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, por meio da dissolução em solução aquosa de DMSO (0,1% v/v), obtendo-se a concentração nominal final de 75 μ M para ambos os compostos químicos (CADENA, 2020a). As soluções foram diluídas em água decolorada até o volume final de 80 mL, obtendo-se uma concentração final de DMSO de 0,0075% (v/v), valor inferior ao conhecido por causar alterações nos parâmetros de desenvolvimento embrionário em zebrafish, não afetando os parâmetros estudados (HOYBERGHS et al., 2021). Devido ao uso do DMSO nas soluções estoque, este foi utilizado como grupo controle, assim como a água decolorada.

Para a solução de TL, comprimidos comerciais contendo 50 mg de cloridrato de tramadol foram macerados e diluídos em 100 mL de água destilada sob agitação magnética (50 g). A partir dessa solução, foi realizada uma diluição fracionada: 1 mL foi misturado em 100 mL de água destilada para obtenção da segunda solução. Por fim, 48 μ L foram pipetados da segunda solução e misturados em 80 mL de água decolorada, obtendo-se a concentração nominal final de 24 μ M.

2.3. Exposição dos embriões

Os testes de toxicidade dos compostos químicos e de suas misturas foram baseados em Cadena et al. (2020a; 2020b). Em resumo, os embriões foram incubados em água decolorada em câmaras estéreis de poliestireno com volume de 80 mL até duas horas pós-fertilização (hpf). Em seguida, os embriões foram expostos a DMSO, água decolorada contendo 150 mM de etanol (correspondente à concentração sanguínea de um consumidor crônico [HARRISON et al., 2017]), água decolorada contendo 24 μ M de cloridrato de tramadol (concentração com potencial para produzir níveis plasmáticos próximos à faixa terapêutica em humanos [TANOUE et al., 2019]); e água decolorada contendo a mistura binária de etanol e cloridrato de tramadol.

Para os grupos com compostos de potencial efeito protetor, os embriões foram expostos, também às 2 hpf, à quercetina (QUE), ao ácido fólico (AF) e às suas misturas binárias, diluídas em água decolorada com ou sem etanol, cloridrato de tramadol e sua mistura binária. Os grupos experimentais foram descritos na Tabela 1. Os grupos contendo etanol foram mantidos em recipiente selado com etanol para criar uma “atmosfera alcoólica”, minimizando a volatilização do etanol (MURALIDHARAN et al., 2015). Todos os grupos experimentais foram mantidos em incubadora em

ambiente escuro para evitar a degradação dos compostos químicos, sob os mesmos parâmetros abióticos descritos anteriormente, até 24 hpf.

Tabela 1: Concentrations of single compounds and binary mixtures (A) to evaluate the protective effects of folic acid (FA) and quercetin (QUE) against EtOH and TL (tramadol hydrochloride) induced defects on zebrafish model. Experimental design layout in a simplex lattice experimental design (B) for evaluating interactions between chemical compounds (Cadena, 2020a).

A. Concentrações dos compotos e suas misturas binárias e ternárias			
Compostos	Concentração	Exposição ao etanol	Exposição ao cloridrato de tramadol
DMSO (Controle)	0.01 % (v/v)	0	0
Etanol (EtOH)	-	150 mM	0
Tramadol (TL)	-	0	24 µM
EtOH + TL	-	150 mM	24 µM
Ácido Fólico (AF)	75 µM	0	0
AF + EtOH	75 µM	150 mM	0
AF + TL	75 µM	0	24 µM
AF + EtOH + TL	75 µM	150 mM	24 µM
Quercetina (QUE)	75 µM	0	0
QUE + EtOH	75 µM	150 mM	0
QUE + TL	75 µM	0	24 µM
QUE + EtOH + TL	75 µM	150 mM	24 µM
QUE + AF	37.5 µM de cada composto = 75 µM	0	0
QUE + AF + EtOH	37.5 µM de cada composto = 75 µM	150 mM	0
QUE + AF + TL	37.5 µM de cada composto = 75 µM	0	24 µM
QUE + AF + EtOH + TL	37.5 µM de cada composto = 75 µM	150 mM	24 µM

B. Design experimental simplex lattice (compostos contra EtOH + TL)					
Compostos	Quercetina (μM)	Ácido fólico (μM)	Etanol (mM)	Cloridrato de tramadol (μM)	EtOH (150 mM) + TL (μM)
QUE	75	0	150	24	150 + 24
AF	0	75	150	24	150 + 24
QUE + AF	37.5	37.5	150	24	150 + 24

2.4. Endpoints de desenvolvimento

2.4.1. Epibolia

A porcentagem de epibolia dos embriões nos grupos experimentais descritos na Tabela 1 foi avaliada às 8 horas pós-fertilização, após 6 horas de exposição, conforme ilustrado na Figura 1. Os embriões foram fixados em paraformaldeído a 4% em solução tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) por 24 horas. Em seguida, foram lavados três vezes com a mesma solução tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e fotografados utilizando um microscópio óptico BEL Solaris-T (aumentos de 400x e 1000x), acoplado a uma câmera (Hayear Mod. HY212 2307) e software S-EYE 1.42.474.

A porcentagem de epibolia (35 animais por grupo, totalizando 21 grupos experimentais $\approx$ 735 embriões) foi determinada pela razão entre a distância do polo animal à margem do blastoderma e a distância entre o polo animal e o polo vegetal. As medições foram realizadas com o software Image J (versão 1.52A, 2019, National Institutes of Health, MD), e os dados foram apresentados em forma de porcentagem de epibolia (CADENA et al., 2020b).

2.4.2. Efeitos teratogênicos

Os efeitos teratogênicos foram avaliados após 22 horas de exposição (2–24 hpf). Os embriões foram eutanasiados por imersão em solução de eugenol a 300 mg/L por 10 minutos, em dose excessiva de anestésico, e posteriormente fixados em paraformaldeído a 4% em solução tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) por 24 horas. Em seguida, foram lavados três vezes com solução tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e fotografados utilizando um microscópio óptico BEL Solaris-T (aumentos de 400x e 1000x), acoplado a uma câmera (Hayear Mod. HY212 2307) e software S-EYE 1.42.474.

A avaliação das imagens foi realizada conforme versão modificada de Cadena et al. (2020a), por meio de análise qualitativa (presença ou ausência) de malformações embrionárias, tais como saco vitelino excessivamente grande, coagulação, deformações na coluna vertebral, deformações na cauda e edemas — incluindo edemas múltiplos no corpo, edema pericárdico e edema no saco vitelino. Os animais foram considerados afetados quando apresentaram pelo menos uma das malformações citadas sob observação microscópica, ou em caso de mortalidade (Cadena et al., 2020b). Esses dados foram apresentados como porcentagem de animais afetados por grupo experimental (35 animais por grupo, totalizando 21 grupos experimentais $\approx$ 735 embriões).

2.4.3 Taxa de desenvolvimento embrionário

A taxa de desenvolvimento embrionário foi determinada com base na classificação dos estágios embrionários observados no estudo e na porcentagem de embriões em cada estágio (KIMMEL et al., 1995; QUINTANEIRO et al., 2022). Os embriões com 24 hpf (após 22 horas de exposição, 2–24 hpf) foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) por 24 horas. Em seguida, os embriões foram lavados três vezes com solução tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e fotografados utilizando microscópio óptico (aumentos de 400x e 1000x), acoplado a uma câmera (Hayear Mod. HY212 2307) e software S-EYE 1.42.474 (CADENA et al., 2020a; 2020b).

A avaliação das imagens foi realizada conforme versão modificada de Kimmel et al. (1995) e Quintaneiro et al. (2022). Os embriões foram inicialmente divididos em três dos sete períodos da embriogênese descritos por Kimmel et al. (1995) e observados neste estudo: gastrulação, segmentação e faringula. Dentro de cada período, foram estabelecidos estágios de desenvolvimento embrionário, numerados de S1 (5 hpf) a S12 (24 hpf), de acordo com os intervalos de desenvolvimento do zebrafish observados no estudo (KIMMEL et al., 1995). Os embriões foram classificados por meio de avaliação qualitativa (presença ou ausência), utilizando características morfológicas distintas da forma geral do embrião observadas em cada um dos estágios estabelecidos (S1 a S12), conforme descrito na Tabela 2.

Um embrião de zebrafish com 24 hpf deve apresentar características compatíveis com o final do período de segmentação (S11) e início do período de faringula (S12). Dessa forma, o atraso no desenvolvimento foi considerado quando o

embrião não apresentava características compatíveis com esses estágios (KIMMEL et al., 1995; QUINTANEIRO et al., 2022). Os resultados foram apresentados como porcentagem por grupo experimental (35 animais por grupo, totalizando 21 grupos experimentais $\approx$ 735 embriões), sendo considerado para a taxa final de desenvolvimento o estágio com maior porcentagem em cada grupo.

Tabela 2: Determinação dos estágios de desenvolvimento de embriões de zebrafish às 24 horas pós-fertilização (hpf), com base no período de gastrulação (5–10 hpf), no período de segmentação (10–24 hpf) e no início do período de faringula (24 hpf), conforme adaptação de Kimmel et al. (1995) e Quintaneiro et al. (2022).

Período	Descrição do período	Estágio (S)	Descrição do estágio
Gastrulação	Este período é caracterizado pelo fim da epibolia, pelos movimentos celulares de involução e pela formação das camadas germinativas primárias.	S1	Durante o processo de epibolia, a margem do blastoderma é deslocada até o ponto médio (50%) entre os polos animal e vegetal. Simultaneamente, o anel germinativo emerge, e o disco embrionário torna-se mais facilmente visualizado, organizando-se em uma estrutura que se assemelha a um escudo.
		S2	A epibolia prossegue com o deslocamento da margem do blastoderma para 75% entre os polos animal e vegetal. O polo animal se alonga à medida que a borda do polo vegetal diminui, formando o tampão vitelino. A cada estágio, o tampão vitelino torna-se progressivamente menor.
		S3	No estágio de 90%, a margem do blastoderma é deslocada para próximo da totalidade entre os polos animal e vegetal. O tampão vitelino torna-se bastante distinto, com variação de espessura entre os polos animal e vegetal.
		S4	A epibolia é concluída (100%) quando as margens do blastoderma cobrem completamente o tampão vitelino. O tampão vitelino desaparece, e a região posterior do eixo embrionário apresenta uma saliência evidente, denominada broto caudal.
Segmentação	Esse período é caracterizado pelo aparecimento dos somitos e início da organogênese.	S5	O comprimento do embrião é equivalente ao do zigoto. A forma da cabeça torna-se visível.
		S6	A cabeça torna-se mais proeminente e o primórdio óptico passa a ser visível.
		S7	O broto caudal se estende e forma a estrutura inicial da cauda, conferindo ao embrião uma forma que começa a se assemelhar a um feijão.
		S8	A cauda torna-se mais proeminente e alongada. A extensão do vitelo torna-se muito distinta no animal em desenvolvimento.
		S9	A cauda começa a se endireitar. A extensão do vitelo está claramente distinguida do embrião em desenvolvimento.

		S10	O alongamento da cauda continua e ela começa a se desprender da extensão do vitelo. O tronco posterior começa a se endireitar, e a cabeça está completamente formada.
		S11	A cauda está completamente desprendida da extensão do vitelo. O tronco posterior encontra-se quase totalmente reto.
Farínghula	Estágio filotípico: período no qual todos os vertebrados apresentam características morfológicas semelhantes.	S12	Cauda completamente solta e reta. O tronco posterior está totalmente alinhado. Presença de pigmentação na cabeça e na cauda.

2.4.4. Taxa de eclosão

A taxa de eclosão foi avaliada entre 48 e 144 horas pós-fertilização (hpf), conforme os critérios estabelecidos pela OECD 236 (2013) para definição de atraso no processo de eclosão. Considerou-se que houve atraso na eclosão quando a taxa foi inferior a 80% após 96 hpf. Os resultados foram apresentados em forma de porcentagem por grupo experimental (35 animais por grupo, totalizando 21 grupos experimentais $\approx$ 735 embriões).

2.5. Análise estatística

O planejamento estatístico dos experimentos foi realizado por meio do delineamento experimental simplex lattice (Tabela 1), utilizado como base para determinar o número de grupos experimentais e avaliar a interação entre os compostos químicos (CADENA et al., 2020b). As concentrações de EtOH, TL, AF e QUE (ausência e presença), bem como suas misturas, foram utilizadas como fatores. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado para garantir a regularidade da distribuição dos grupos ($p < 0,05$). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para análise dos dados, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Origin Pro Academic 2024 (Origin Lab, Northampton, MA, EUA).

3. Resultados

Como condição para validação dos testes, a sobrevivência dos animais no grupo controle foi $\geq 90\%$ ao final de 96 hpf em todos os ensaios, conforme estabelecido pela OECD 236 (2013).

3.1. Endpoints de desenvolvimento

3.1.1. Epibolia

Embriões de zebrafish foram expostos (conforme descrito na Tabela 1) aos tratamentos químicos durante os períodos de clivagem até gastrulação, entre 2 e 8 hpf (Kimmel et al., 1995). Para avaliar possíveis interferências na porcentagem de epibolia, foi medida a área do saco vitelino coberta pelas células embrionárias em crescimento durante o movimento de epibolia. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Como esperado, os grupos Controle e DMSO não apresentaram redução na porcentagem de epibolia, nem diferença significativa entre si ($p = 0,99$). No entanto, conforme previsto, a exposição ao EtOH afetou a epibolia, e o grupo EtOH apresentou redução significativa na porcentagem de epibolia (Figura 3). O grupo TL não apresentou redução na porcentagem de epibolia. O grupo EtOH+TL apresentou redução na porcentagem de epibolia, porém sem diferença significativa em relação ao grupo EtOH isolado ($p = 1,00$), o que pode indicar que a exposição ao EtOH seja a única responsável pela redução observada nesse grupo.

Em relação aos compostos de potencial efeito protetor, a exposição ao AF não afetou a porcentagem de epibolia, não apresentando efeitos tóxicos. Além disso, o AF demonstrou proteção eficaz contra os defeitos induzidos por EtOH e EtOH+TL (Figura 3). A exposição à QUE também não apresentou efeitos tóxicos, mas não protegeu contra os defeitos induzidos por EtOH ou EtOH+TL (Figura 3). Adicionalmente, a combinação QUE+TL apresentou sinais significativos de toxicidade, uma vez que esse grupo foi estatisticamente diferente dos grupos TL ($p = 0,00$) e QUE ($p < 0,00$). Por fim, a exposição à combinação AF+QUE indicou possíveis efeitos tóxicos, com redução na porcentagem de epibolia (Figura 3), e não apresentou efeito protetor contra os defeitos induzidos por EtOH, TL ou EtOH+TL (Figura 3).

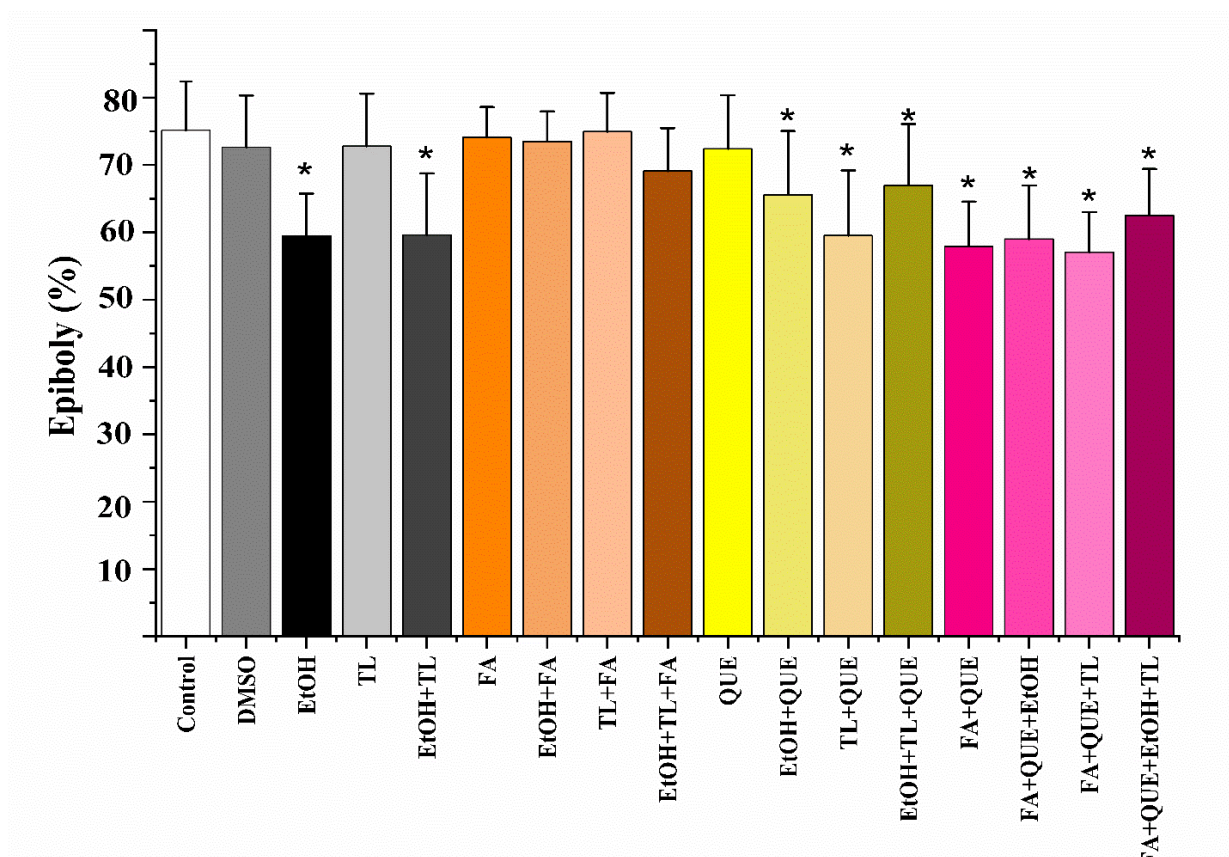


Figure 3: Porcentagem de epibolia em embriões de zebrafish às 8 horas pós-fertilização (hpf) após exposição ao etanol e cloridrato de tramadol durante a embriogênese. O processo de desenvolvimento embrionário foi considerado afetado quando * = $p < 0,05$. Legenda: Controle – água decolorada; DMSO – 0,01% (v/v) dimetilsulfóxido; EtOH – etanol; TL – cloridrato de tramadol; AF – ácido fólico; QUE – quercetina. Cada grupo experimental foi comparado ao grupo controle por meio de análise de variância (ANOVA). ($F(25,22931) = 25,22931$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (DMSO $p = 0,99$; EtOH $p < 0,001$; TL $p = 0,99$; EtOH+TL $p < 0,001$; FA $p = 1$; FA+EtOH $p = 1$; FA+TL $p = 1$; FA+EtOH+TL $p = 1$; QUE $p = 0,99$; QUE+EtOH $p < 0,001$; QUE+TL $p = 0$; QUE+EtOH+TL $p < 0,001$; FA+QUE $p < 0,001$; FA+QUE+EtOH $p = 0$; FA+QUE+TL $p < 0,001$; FA+QUE+EtOH+TL $p = 0$).

3.1.2. Efeitos teratogênicos

Em seguida, um novo conjunto de embriões foi exposto (conforme descrito na Tabela 1) aos tratamentos químicos até 24 hpf, com o objetivo de verificar se os defeitos induzidos por EtOH e o possível antagonismo entre AF+QUE observado na epibolia correlacionam-se com efeitos teratogênicos após 22 horas de exposição. A taxa de sobrevivência foi superior a 90% em todos os grupos experimentais, indicando baixa letalidade na exposição dos embriões de zebrafish aos tratamentos químicos.

Os grupos Controle e DMSO não apresentaram sinais de efeitos teratogênicos. A exposição ao EtOH também não induziu efeitos teratogênicos em nenhum dos

grupos expostos ao EtOH. No entanto, a exposição ao TL apresentou sinais significativos de efeitos teratogênicos, especialmente relacionados a edemas pericárdicos. A exposição à combinação EtOH+TL não induziu efeitos teratogênicos.

Em relação aos compostos de potencial efeito protetor, o AF não apresentou sinais de efeitos teratogênicos, mas também não protegeu contra os efeitos induzidos por TL. A exposição à QUE não demonstrou sinais de toxicidade e aparentou proteger contra os efeitos teratogênicos induzidos por TL. A exposição à combinação AF+QUE não apresentou sinais de toxicidade por não causar efeitos teratogênicos, e demonstrou proteção contra os efeitos induzidos por TL.

3.1.3. Taxa de desenvolvimento embrionário

Embriões de zebrafish foram expostos (conforme descrito na Tabela 1) aos tratamentos químicos até 24 hpf. A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada com base nos estágios determinados por uma versão modificada de Kimmel et al. (1995) e Quintaneiro et al. (2022) (Figura 2). O estágio com maior porcentagem por grupo foi considerado para a determinação da taxa de desenvolvimento de cada grupo. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Os grupos Controle e DMSO não apresentaram atraso no desenvolvimento embrionário, nem diferenças significativas entre si ($p = 1,00$). O grupo EtOH apresentou atraso significativo no desenvolvimento embrionário (Figura 4). O grupo TL não apresentou atraso no desenvolvimento. A exposição à combinação EtOH+TL causou atraso no desenvolvimento embrionário.

Em relação aos tratamentos com potencial efeito protetor, o AF não causou atraso no desenvolvimento embrionário e protegeu parcialmente contra os efeitos induzidos por EtOH. No entanto, a exposição ao AF não protegeu contra os efeitos induzidos pela combinação EtOH+TL. Além disso, a exposição à QUE não causou atraso no desenvolvimento embrionário, mas também não foi capaz de proteger contra os efeitos induzidos por EtOH ou EtOH+TL. A exposição à combinação AF+QUE não apresentou atraso no desenvolvimento embrionário, porém não protegeu os embriões quando combinada com TL (AF+QUE+TL), nem contra os efeitos induzidos por EtOH ou EtOH+TL.

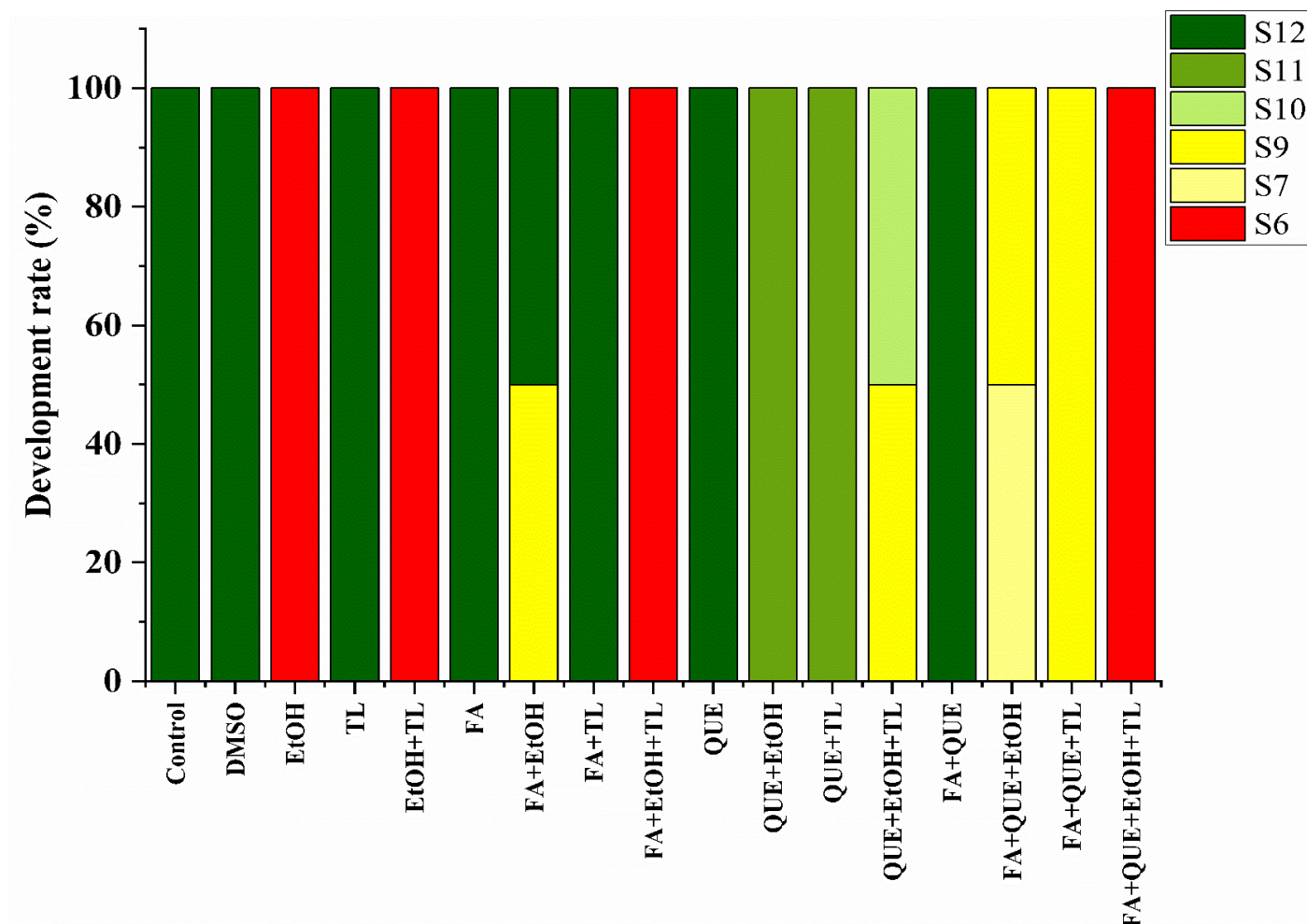


Figure 4: Porcentagem de animais conforme a taxa de desenvolvimento embrionário em zebrafish às 24 horas pós-fertilização após exposição ao etanol e cloridrato de tramadol durante a embriogênese. O processo de desenvolvimento embrionário foi considerado afetado quando $* = p < 0,05$. Legenda: Controle – água deionizada; DMSO – 0,01% (v/v) dimetilsulfóxido; EtOH – etanol; TL – cloridrato de tramadol; AF – ácido fólico; QUE – quercetina. Cada grupo experimental foi comparado ao grupo controle por meio de análise de variância (ANOVA de uma via) ($F(25,22931) = 25,22931$; $p < 0,05$), seguida pelo teste de Tukey. (DMSO $p = 1$; EtOH $p = 0$; TL $p = 1$; EtOH+TL $p = 0$; FA $p = 0,98$; FA+EtOH $p = 0$; FA+TL $p = 0,49$; FA+EtOH+TL $p < 0,001$; QUE $p = 0,98$; QUE+EtOH $p < 0,001$; QUE+TL $p = 1$; QUE+EtOH+TL $p = 0$; FA+QUE $p < 0,001$; FA+QUE+EtOH $p < 0,001$; FA+QUE+TL $p = 0$; FA+QUE+EtOH+TL $p < 0,001$).

3.3. Taxa de eclosão

A taxa de eclosão foi definida conforme as diretrizes da OECD 236 (2013). Neste teste, considerou-se que houve atraso na eclosão quando menos de 80% dos embriões eclodiram até 96 hpf. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

O grupo DMSO não afetou a taxa de eclosão e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p = 1,00$). No entanto, a exposição ao EtOH

(150 mM) afetou negativamente a taxa de eclosão. A exposição ao TL não interferiu na taxa de eclosão. A combinação EtOH+TL também não afetou a taxa de eclosão.

Em relação aos tratamentos com potencial efeito protetor, a exposição ao AF não afetou a taxa de eclosão e demonstrou proteção contra os efeitos induzidos por EtOH. A exposição à QUE também não afetou a taxa de eclosão e apresentou efeito protetor contra os efeitos induzidos por EtOH. Por outro lado, o grupo AF+QUE afetou a taxa de eclosão, apresentando redução quando combinado com EtOH+TL (AF+QUE+EtOH+TL), e não demonstrou proteção contra os efeitos induzidos por EtOH.

Os grupos que não atingiram mais de 80% de eclosão até 96 hpf apresentaram eclosão completa (100%) até 144 hpf.

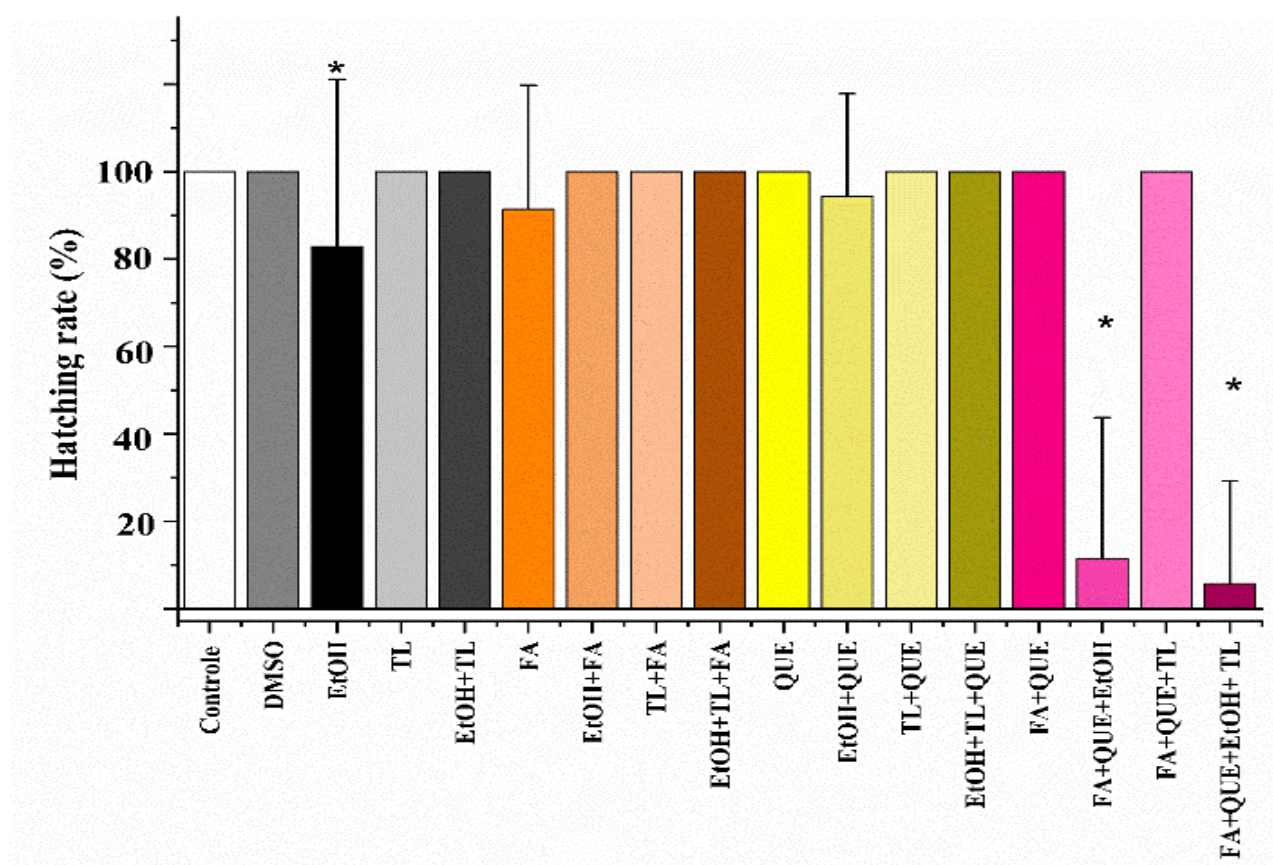


Figure 5: Taxa de eclosão aos 72 horas pós-fertilização em embriões de zebrafish após exposição ao etanol e cloridrato de tramadol durante a embriogênese. A eclosão foi considerada afetada quando * = $p < 0,05$. Legenda: Controle – água dechlorada; DMSO – 0,01% (v/v) dimetilsulfóxido; EtOH – etanol; TL – cloridrato de tramadol; AF – ácido fólico; QUE – quercetina. Cada grupo experimental foi comparado ao grupo controle por meio de análise de variância (ANOVA de uma via) ($F(25,22931) = 25,22931$; $p < 0,05$), seguida pelo teste de Tukey (DMSO $p = 1$; EtOH $p < 0.001$; TL $p = 1$; EtOH+TL $p = 1$; FA $p = 0.99$; FA+EtOH $p = 1$; FA+TL $p = 1$; FA+EtOH+TL $p = 1$; QUE $p = 1$; QUE+EtOH $p = 0.99$; QUE+TL $p = 1$; QUE+EtOH+TL $p = 1$; FA+QUE $p = 1$; FA+QUE+EtOH $p = 0$; FA+QUE+TL $p = 1$; FA+QUE+EtOH+TL $p = 0$).

4. Discussão

O uso concomitante de etanol e opioides é bastante prevalente mundialmente, mesmo quando o comportamento não apresenta todas as características necessárias para ser classificado como um transtorno. A amplitude dos riscos associados ainda é pouco conhecida. A maioria dos estudos adota critérios baseados em “substância única”, o que gera uma lacuna no conhecimento sobre o uso combinado de substâncias e não contempla cenários reais de abuso de drogas. Essa situação evidencia a necessidade de mais estudos que forneçam dados sobre o uso concomitante de etanol e opioides (HOOD et al., 2020; COOK et al., 2022).

Estudos indicam um aumento de 70% no uso combinado de substâncias após a pandemia, devido à influência desse período na saúde mental (MANCHIKANTI et al., 2021). As mulheres representam a população com maior incidência de problemas de saúde mental, e gestantes vivenciam níveis elevados de estresse e ansiedade ao longo da gravidez, especialmente no contexto pós-pandêmico (COOK et al., 2022). Pesquisas sobre o uso concomitante de substâncias em gestantes são necessárias para identificar suas consequências, tanto para a mãe quanto para o bebê, além de investigar substâncias com potencial efeito protetor contra os efeitos induzidos por esse tipo de exposição.

Neste estudo, os efeitos da mistura de etanol e opioides foram avaliados por meio de testes de desenvolvimento embrionário, como a porcentagem de epibolia, a taxa de desenvolvimento embrionário e a taxa de eclosão. Além disso, os grupos foram observados para a identificação de possíveis efeitos teratogênicos. Esses testes também foram úteis para analisar o potencial protetor do ácido fólico (AF) e da quercetina (QUE) contra os efeitos do uso combinado de substâncias em um modelo de zebrafish.

Os efeitos induzidos pelo EtOH foram observados como atraso no desenvolvimento embrionário precoce, com redução na porcentagem de epibolia, na taxa de desenvolvimento aos 24 hpf e na taxa de eclosão. Os animais expostos ao EtOH apresentaram algum nível de atraso no desenvolvimento, o que corrobora os dados já conhecidos sobre os efeitos do EtOH em humanos e outros modelos animais (SARMAH et al., 2013; CADENA et al., 2020a; POPOVA et al., 2021). A exposição ao EtOH pode interferir em vias metabólicas importantes, levando a defeitos de sinalização. No desenvolvimento embrionário precoce, essa interferência pode

comprometer a diferenciação e migração celular (WALLÉN et al., 2021). Além disso, o EtOH está associado a defeitos de adesão celular e à desorganização dos microtúbulos, ao perturbar a rede E-caderina–microtúbulo na célula vitelina, o que provavelmente causa a redução na porcentagem de epibolia (SARMAH et al., 2013). O EtOH também pode aumentar o estresse oxidativo, o que pode levar ao aumento da apoptose celular e danos teciduais. Esses efeitos geralmente não aumentam a mortalidade, mas causam atraso no desenvolvimento embrionário e na eclosão (MANIKANDAN et al., 2022).

Apesar dos resultados demonstrarem os efeitos do EtOH no desenvolvimento embrionário, os efeitos teratogênicos induzidos pelo EtOH observados em outros estudos — como edemas pericárdicos e corporais (CADENA et al., 2020a; 2020b) — não foram observados neste estudo. Isso provavelmente se deve à linhagem de zebrafish utilizada.

A linhagem de zebrafish utilizada em um estudo é altamente relevante devido às diferenças genéticas, fisiológicas e comportamentais entre elas (VAN DEN BOS et al., 2017). Outros estudos que utilizaram zebrafish como modelo para exposição ao EtOH utilizaram a linhagem AB (SARMAH et al., 2020; CADENA et al., 2020a; 2020b). A linhagem AB é obtida por cruzamentos extensivos que tornam a maioria dos loci genômicos homozigotos, o que aumenta a sensibilidade à exposição a substâncias (COE et al., 2009; KHATIWADA et al., 2024). Neste estudo, foi utilizada a linhagem WT (Wild-Type), escolhida com base em sua variabilidade genética, resultante de maior heterozigosidade devido a cruzamentos menos controlados. Isso pode oferecer uma nova perspectiva ao extrapolar os resultados para comparação com humanos (KHATIWADA et al., 2024).

Devido à variabilidade genética da linhagem WT, os animais são menos sensíveis à exposição a drogas. Sob as mesmas condições de concentração e tempo de exposição, zebrafish da linhagem WT apresentam menos efeitos tóxicos do que os da linhagem AB (KHATIWADA et al., 2024). Além da variabilidade genética, o córion da linhagem WT pode ser relevante para compreender os resultados deste estudo. Em zebrafish da linhagem AB, a quantidade de EtOH que realmente alcança o embrião corresponde a apenas um vigésimo a um trigésimo da concentração do banho externo, devido à barreira coriônica (FERNANDES et al., 2015). Por isso, é interessante considerar se, entre as diferenças fisiológicas entre as linhagens de zebrafish, as características do córion também divergem. A ausência dos defeitos

morfológicos induzidos pelo EtOH observados em outros estudos pode estar associada às diferenças fisiológicas e genéticas entre as linhagens AB e WT. Quando a diferença ocorre dentro do mesmo tipo de linhagem, pode ser atribuída a variações nas condições de manutenção, regiões geográficas e variabilidade genética (KHATIWADA et al., 2024).

O opioide utilizado neste estudo foi o cloridrato de tramadol (TL), selecionado devido às suas altas taxas de prescrição e uso indevido. No Brasil, é o segundo opioide mais prescrito. Além disso, tem-se observado um aumento global no uso indevido do TL, com algumas regiões, como a Austrália e países do continente africano, enfrentando condições epidêmicas (UN, 2020). Nos Estados Unidos, a epidemia de opioides entrou em sua quarta onda, representando uma preocupação significativa de saúde pública (WHO, 2024).

Os opioides não são reconhecidos como substâncias teratogênicas, e o uso de TL durante a gestação é considerado não letal. No entanto, há potencial para interferência nas enzimas antioxidantes, além de risco aumentado para defeitos cardiovasculares e ocorrência da síndrome de abstinência neonatal por opioides (NOWS) (TANOUE et al., 2019; KIRLA et al., 2021).

Em relação ao desenvolvimento embrionário normal, observamos que o TL causou edemas pericárdicos, mas não interferiu na porcentagem de epibolia, na taxa de desenvolvimento embrionário ou na taxa de eclosão. Contudo, outros estudos demonstraram efeitos tóxicos do TL no desenvolvimento embrionário precoce. Um estudo com exposição embrionária ao TL em embriões de galinha mostrou aumento nas taxas de mortalidade, retardo no crescimento e malformações congênitas (LABIB et al., 2022). Esses resultados podem estar relacionados à concentração de TL utilizada, que foi superior à empregada em nosso estudo, além do modelo animal adotado.

No zebrafish, a barreira coriônica pode reduzir a quantidade de TL que atinge o embrião, como já observado em exposições ao EtOH (FERNANDES et al., 2015). Estudos com zebrafish que relataram alta embriotoxicidade ou malformações associadas ao TL apresentaram diferenças metodológicas, como tempo de exposição ou concentração (KIRLA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2023). Em modelos murinos, a exposição fetal ao TL também demonstrou certo nível de malformações, mas de forma dependente da concentração, sendo utilizadas doses superiores às do presente estudo (ELNAZSIROUS et al., 2020).

A concentração utilizada em nosso estudo é farmacologicamente relevante, pois corresponde a níveis plasmáticos próximos à faixa terapêutica em humanos (TANOUE et al., 2019). Em relação aos edemas pericárdicos, o grupo TL apresentou a maior incidência dessa malformação entre os grupos estudados. Opioides como o TL podem interferir nos canais de íons de sódio no tecido cardíaco, o que pode levar a disfunções cardíacas (JIA et al., 2023). Além disso, a exposição ao TL está associada ao estresse oxidativo nos rins, o que pode contribuir para a formação de edemas em modelos de zebrafish (WANG et al., 2024).

Esses achados corroboram resultados obtidos em zebrafish e outros modelos que observaram a formação de defeitos cardíacos após exposição a opioides (BLOOR et al., 2012; VAN HOOGDALÉM et al., 2021; JIA et al., 2023; WANG et al., 2024). Tais malformações congênitas no sistema cardiovascular também são observadas em recém-nascidos expostos ao TL durante a gestação ou lactação, e estão associadas a alguns dos desfechos clínicos esperados em casos de síndrome de abstinência neonatal por opioides (NOWS) (BLOOR et al., 2012; KIRLA et al., 2021; VAN HOOGDALÉM et al., 2021; BALDO, 2022).

A exposição combinada ao EtOH+TL causou atraso no desenvolvimento embrionário, evidenciado pela redução na porcentagem de epibolia e na taxa de desenvolvimento. No entanto, essa redução não foi significativamente diferente da observada no grupo EtOH isolado ($p = 1,00$). Por outro lado, a exposição ao TL não induziu redução na porcentagem de epibolia nem na taxa de desenvolvimento embrionário. Isso sugere que o EtOH pode ser o único responsável pela redução observada nos parâmetros de desenvolvimento no grupo EtOH+TL.

A exposição ao EtOH+TL não reduziu a taxa de eclosão, com mais de 80% dos animais eclodindo até 72 hpf. Esse resultado pode indicar algum nível de recuperação dos efeitos induzidos pelo EtOH, especialmente em casos de administração aguda (CHATERJEE et al., 2014; PAUL et al., 2020).

Quanto aos efeitos teratogênicos, o grupo EtOH+TL não apresentou nenhuma das malformações esperadas para essa combinação, como edemas pericárdicos e edemas corporais. Os defeitos cardiovasculares observados com a exposição ao TL não foram detectados no grupo EtOH, apesar de ambos serem descritos como indutores de comprometimentos cardiovasculares (LI et al., 2016; BALDO, 2022).

Para a avaliação dos efeitos teratogênicos no desenvolvimento embrionário precoce, os animais foram expostos até 24 hpf e fixados. Aos 24 hpf, a maioria dos

embriões dos grupos EtOH e EtOH+TL não ultrapassou o estágio 6 (S6), que se situa entre o final da gastrulação e o início da segmentação (11 a 12 hpf). Em zebrafish, a formação cardíaca inicia-se por volta de 5 hpf, e a circulação começa aos 24 hpf (BROWN et al., 2016). Isso pode explicar a ausência de defeitos cardiovasculares no grupo EtOH+TL, já que a maioria dos embriões desse grupo permaneceu estagnada em 12 hpf.

Em relação aos tratamentos químicos com potencial efeito protetor, o AF já é utilizado como suplemento para mães e crianças, sendo amplamente estudado em modelos animais. O AF é conhecido por prevenir danos causados por radicais livres e por interferências em vias metabólicas que podem levar à apoptose e danos teciduais (LIU et al., 2020; INCE, 2020; CADENA et al., 2020b). Neste estudo, o AF não apresentou sinais de toxicidade e protegeu efetivamente contra os efeitos da exposição ao EtOH, corroborando os resultados observados por Cadena et al. (2020a).

No entanto, em relação aos efeitos teratogênicos no grupo FA+TL, o AF não foi eficaz na proteção contra os efeitos cardíacos induzidos pelo TL. Como discutido anteriormente, o TL pode interferir nos canais de íons de sódio e aumentar o estresse oxidativo nos rins (JIA et al., 2023; WANG et al., 2024). Ainda assim, os mecanismos metabólicos utilizados pelo TL para induzir comprometimentos cardíacos permanecem desconhecidos, sendo necessárias investigações adicionais. É possível que os impactos do TL no sistema cardíaco de zebrafish não estejam relacionados ao metabolismo do folato, uma vez que essa via pode ser corrigida com suplementação de AF (CADENA et al., 2020a; JIANG et al., 2021). Contudo, é plausível afirmar que não se trata de um efeito tóxico induzido pela coexposição ao AF e TL, pois os grupos TL e FA+TL não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,99$).

O segundo antioxidante utilizado neste estudo foi a quercetina (QUE), um flavonoide com propriedades antioxidantes potentes, encontrado naturalmente em diversas frutas e vegetais (HUSSEIN et al., 2023). Os estudos sobre o potencial de suplementação da QUE durante a gestação foram majoritariamente realizados em modelos animais, pois sua segurança para exposição fetal ainda é incerta (INCE, 2020).

Neste estudo, a QUE não apresentou sinais de toxicidade e protegeu efetivamente contra os efeitos induzidos pelo EtOH, corroborando os resultados

observados por Cadena et al. (2020a). De forma inesperada, a associação entre QUE e TL demonstrou possível efeito tóxico ao afetar a porcentagem de epibolia. No entanto, quando administrados isoladamente, tanto QUE quanto TL não afetaram esse parâmetro, sendo significativamente diferentes do grupo QUE+TL. Esse possível efeito tóxico da coexposição no desenvolvimento embrionário requer investigação adicional.

Uma hipótese para esse resultado pode estar relacionada aos níveis de glutathione. A glutathione é um antioxidante sintetizado pelo organismo que influencia diretamente a atividade antioxidante da quercetina (NAKHAEE et al., 2021). Quando os níveis de glutathione estão reduzidos, a quercetina pode apresentar propriedades pró-oxidantes e citotóxicas (NAKHAEE et al., 2021). Estudos sugerem que opioides podem reduzir os níveis de glutathione (ROOT-BERNSTEIN et al., 2020; SAHIN et al., 2023). Assim, é possível que uma maior absorção de TL leve à diminuição dos níveis de glutathione, o que poderia explicar os efeitos tóxicos observados na coexposição entre QUE e TL.

Para ampliar o escopo de sintomas avaliados, ensaios clínicos frequentemente utilizam mais de um composto químico para triagem de tratamentos e substâncias protetoras. A mistura FA+QUE demonstrou possível efeito tóxico no desenvolvimento embrionário precoce ao afetar a porcentagem de epibolia, conforme relatado por Cadena et al. (2020a). O fato de essa mistura não ter afetado a taxa de desenvolvimento embrionário nem a taxa de eclosão provavelmente se deve à menor vulnerabilidade do embrião à medida que cresce. Ali et al. (2017) teorizaram que, à medida que o embrião se aproxima da eclosão, suas defesas tornam-se mais robustas e menos dependentes do córion, possivelmente porque a larva precisa começar a interagir com o ambiente externo.

Em relação ao potencial protetor da mistura FA+QUE, esta não foi capaz de proteger contra os efeitos induzidos pelo EtOH na porcentagem de epibolia, na taxa de desenvolvimento e na taxa de eclosão. Pode-se teorizar que nem o AF nem a QUE foram capazes de proteger os embriões quando suas concentrações foram reduzidas pela metade em uma mistura, conforme metodologia do delineamento simplex lattice (Cadena et al., 2020b). Mesmo em concentração total, apenas o AF demonstrou potencial protetor contra os efeitos induzidos pelo EtOH.

Quanto à redução na porcentagem de epibolia e na taxa de desenvolvimento observada no grupo FA+QUE+TL, os efeitos tóxicos entre os compostos e a idade embrionária podem ser uma possível explicação. Primeiramente, como discutido anteriormente, os grupos FA+QUE e QUE+TL apresentaram sinais de efeitos tóxicos ao reduzir a porcentagem de epibolia. Em segundo lugar, além dos potenciais efeitos tóxicos dessas combinações, os embriões estavam no período inicial de gastrulação durante o teste de epibolia, sendo, portanto, mais vulneráveis.

Sobre a baixa taxa de desenvolvimento, os grupos FA+QUE e QUE+TL não apresentaram sinais de toxicidade, diferindo dos resultados da porcentagem de epibolia devido à diferença de idade entre os embriões nos dois testes. No entanto, o grupo FA+QUE+TL apresentou redução na taxa de desenvolvimento, provavelmente porque, mesmo que os compostos isoladamente não tenham sido tóxicos nesse parâmetro, demonstraram toxicidade na porcentagem de epibolia. Assim, o atraso no desenvolvimento observado no grupo FA+QUE+TL pode ser atribuído às interações tóxicas entre os compostos, conforme discutido anteriormente.

Por fim, a mistura FA+QUE não foi capaz de proteger contra os efeitos induzidos por EtOH+TL na porcentagem de epibolia, na taxa de desenvolvimento e na taxa de eclosão. Isso possivelmente se deve às interações tóxicas entre os compostos mencionadas anteriormente.

5. Conclusão

Este estudo apresentou evidências sobre os efeitos tóxicos do etanol (EtOH) e do cloridrato de tramadol (TL) no desenvolvimento embrionário precoce, utilizando o zebrafish como modelo experimental, bem como sobre o potencial efeito protetor de dois antioxidantes: ácido fólico (AF) e quercetina (QUE). O AF demonstrou proteção parcial contra os efeitos tóxicos induzidos pelo EtOH. A QUE não protegeu contra os efeitos induzidos pelo EtOH e apresentou possível efeito tóxico quando associada ao TL. O TL induziu efeitos teratogênicos relacionados ao sistema cardiovascular, um efeito tóxico comumente associado à exposição embrionária a opioides. A coexposição entre EtOH e TL não apresentou efeitos significativamente diferentes do grupo EtOH isolado nos testes realizados neste estudo.

Infelizmente, o abuso de álcool e opioides continua sendo comum, e sua prevalência está em crescimento. No momento, ainda não se conhecem todos os

possíveis desfechos do uso concomitante de substâncias, tampouco os tratamentos terapêuticos ou substâncias protetoras eficazes contra os defeitos induzidos por essa prática.

Referências

- ALI, M. K. et al. The protective layer of zebrafish embryo changes continuously with advancing age of embryo development (AGED). *J. Toxicol. Pharmacol.*, v. 1, n. 009, 2017.
- BALDO, B.A. Current Research in Pathophysiology of Opioid-Induced Respiratory Depression, Neonatal Opioid Withdrawal Syndrome, and Neonatal Antidepressant Exposure Syndrome. *Current Research in Toxicology*, vol. 3, 1 Jan. 2022, pp. 100078–100078.
- BECKER, S.S.; ROSA, T. Efeitos do consumo de substâncias tóxicas em neonatos e as principais complicações obstétricas: Effects of substance abuse on neonates and the main obstetric complications. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 11, p. 75683-75697, 2022.
- BLOOR, M. et al. Tramadol in Pregnancy and Lactation. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, vol. 21, no. 2, 1 Apr. 2012, pp. 163–167.
- BOARD, A. et al. Polysubstance Use during Pregnancy: The Importance of Screening, Patient Education, and Integrating a Harm Reduction Perspective. *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 247, 1 June 2023, pp. 109872–109872.
- BROWN, D. et al. Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, vol. 3, no. 2, 9 Apr. 2016, pp. 13–13.
- CADENA, P.G., et al. Folic Acid Reduces the Ethanol-Induced Morphological and Behavioral Defects in Embryonic and Larval Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model for Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD). *Reproductive Toxicology*, vol. 96, Sept. 2020a, pp. 249–257.
- CADENA, P.G. et al. Protective Effects of Quercetin, Polydatin, and Folic Acid and Their Mixtures in a Zebrafish (*Danio Rerio*) Fetal Alcohol Spectrum Disorder Model." *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 82, Nov. 2020b, p. 106928.
- CHATTERJEE, D. et al. Chronic and Acute Alcohol Administration Induced Neurochemical Changes in the Brain: Comparison of Distinct Zebrafish Populations. *Amino Acids*, vol. 46, no. 4, 1 Jan. 2014, pp. 921–930.

- COE T.S. et al. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology*. 2009;18(1):144-150
- COLLIER, A. D. et al. Utility of the Zebrafish Model for Studying Neuronal and Behavioral Disturbances Induced by Embryonic Exposure to Alcohol, Nicotine, and Cannabis. *Cells*, vol. 12, no. 20, 23 Oct. 2023, pp. 2505–2505.
- COOK, J. L. Epidemiology of opioid use in pregnancy. *Baillière's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology/Baillière's best practice and research in clinical obstetrics and gynaecology*, 1 dez. 2022. v. 85, p. 12–17.
- CRUMMY, E. A. et al. One Is Not Enough: Understanding and Modeling Polysubstance Use. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 14, 16 June 2020.
- ELNAZSIROUS, H. et al. The evaluation of teratogenic effects of tramadol on mouse fetuses. *Java Microbenchmark Harness*, v. 14, n. 2, p. 1155, 2020.
- ETTITAOU, A. et al. Molecular docking of quercetin: a promising approach for the development of new anti-inflammatory and analgesic drugs. *Natural Product Research*, p. 1-10, 2024.
- FERNANDES, Y. et al. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 6, p. pyu089, 2015.
- FERNANDES, Y. et al. Diving into the World of Alcohol Teratogenesis: A Review of Zebrafish Models of Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 96, no. 2, Apr. 2018, pp. 88–97.
- GOMES, S.S. et al. Behavioral Effects of the Mixture and the Single Compounds Carbendazim, Fipronil, and Sulfentrazone on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Biomedicines*, v. 12, n. 6, p. 1176, 2024.
- HOOD, L. E. Pharmacotherapeutic management of co-morbid alcohol and opioid use. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(7), 2020, 823–839.
- HOYBERGHS J. et al. DMSO Concentrations up to 1% Are Safe to Be Used in the Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Assay. *Frontiers in Toxicology*, vol. 3, 21 Dec. 2021.
- HUSSAIN T. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. *Mediators of Inflammation*, vol. 2021, 27 Sept. 2021, pp. 1–11.
- HUSSEIN H.A., et al. Protective Effect of Quercetin on Fetal Development and Congenital Skeletal Anomalies against Exposure of Pregnant Wistar Rats to Crude Oil Vapor. *Birth Defects Research*, vol. 115, no. 17, 19 Aug. 2023, pp. 1619–1629.

- INCE, E., 2020. The protective effect of quercetin in the alcohol-induced liver and lymphoid tissue injuries in newborns. *Mol. Biol. Rep.* 47, 451–459.
- JIA, L. et al. The Opioid Tramadol Blocks the Cardiac Sodium Channel Nav1.5 in HEK293 Cells. *Europace*, vol. 25, no. 9, 12 July 2023.
- KALDYGULOVA, L. et al. Biological Role of Folic Acid in Pregnancy and Possible Therapeutic Application for the Prevention of Preeclampsia. *Biomedicines*, vol. 11.
- KHATIWADA, B. et al. Comparison of Baseline Cataract Rates in AB and TL Wildtype Zebrafish Strains. *Experimental Eye Research/Experimental Eye Research*, 1 Apr. 2024, pp. 109908–109908.
- KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.
- KIRLA, K.T. et al. Zebrafish Early Life Stages as Alternative Model to Study “Designer Drugs: Concordance with Mammals in Response to Opioids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 419, May 2021, p. 115483.
- LABIB, M.M. et al. Effect of Tramadol on the Development of Chick Embryos. *Journal of Scientific Research in Science*, v. 39, n. 2, p. 194-218, 2022.
- LI, X. et al. Alcohol Exposure Leads to Unrecoverable Cardiovascular Defects along with Edema and Motor Function Changes in Developing Zebrafish Larvae. *Biology Open*, vol. 5, no. 8, 15 July 2016, pp. 1128–1133.
- LIU, H. et al. Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reproductive Sciences*, vol. 27, no. 4, 2 Mar. 2020, pp. 963–976.
- MACRAE, C. A., PETERSON R.T.. Zebrafish as a Mainstream Model for in Vivo Systems Pharmacology and Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 63, no. 1, 20 Jan. 2023, pp. 43–64.
- MANCHIKANTI, L. et al. COVID-19 and the opioid epidemic: two public health emergencies that intersect with chronic pain. *Pain and Therapy*, v. 10, p. 269-286, 2021.
- MANIKANDAN, P. et al. Ethanol Effects on Early Developmental Stages Studied Using the Zebrafish. *Biomedicines*, vol. 10, no. 10, 13 Oct. 2022, pp. 2555–2555.
- MURALIDHARAN, P., et al. 2015. Zebrafish retinal defects induced by ethanol exposure are rescued by retinoic acid and folic acid supplement. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 49, 149–163.

- NAKHAE, S., et al. A Review on Tramadol Toxicity: Mechanism of Action, Clinical Presentation, and Treatment. *Forensic Toxicology*, vol. 39, no. 2, 24 Mar. 2021, pp. 293–310.
- OECD, 2013. *Education at a Glance 2013: OECD Indicators*. OECD Publishing.
- PADILHA, R.M.O. et al. Assessment of toxicity of pyriproxyfen, *Bacillus thuringiensis*, and malathion and their mixtures used for mosquito control on embryo-larval development and behavior of zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-14, 2024.
- PAUL, I. et al. Short exposure to moderate concentration of alcohol during embryonic development does not alter gross morphology in Zebrafish. *Zebrafish*, v. 17, n. 4, p. 253-260, 2020.
- POPOVA, S. et al. Alcohol's Impact on the Fetus. *Nutrients*, v. 13, n. 10, p. 3452, 29 set. 2021.
- QUINTANEIRO C. et al. Embryonic development of zebrafish. 482 *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*. 2022;11:8.
- RODRIGUES, P. et al. Carbamazepine, Venlafaxine, Tramadol, and Their Main Metabolites: Toxicological Effects on Zebrafish Embryos and Larvae. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 448, 1 Apr. 2023, pp. 130909–130909.
- ROOT-BERNSTEIN, R. et al. Glutathione and Glutathione-like Sequences of Opioid and Aminergic Receptors Bind Ascorbic Acid, Adrenergic and Opioid Drugs Mediating Antioxidant Function: Relevance for Anesthesia and Abuse. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 17, 28 Aug. 2020, pp. 6230–6230.
- ŞAHİN, E.K. et al. Erythrocytic Reduced/Oxidized Glutathione and Serum Thiol/Disulfide Homeostasis in Patients with Opioid Use Disorder. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, v. 33, n. 3, p. 170, 2023.
- SARMAH S. et al. Ethanol exposure disrupts extraembryonic microtubule cytoskeleton and embryonic blastomere cell adhesion, producing epiboly and gastrulation defects. *Biology Open*. 2013;2(10):1013-1021
- SARMAH, S. et al. Embryonic ethanol exposure alters expression of sox2 and other early transcripts in zebrafish, producing gastrulation defects. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 3951, 2020.
- SMITH, L. et al. Correlates of Symptoms of Anxiety and Depression and Mental Wellbeing Associated with COVID-19: A Cross-Sectional Study of UK-Based Respondents. *Psychiatry Research*, vol. 291, Sept. 2020, p. 113138.

- TANOUE, R. et al. Protecting the Environment from Psychoactive Drugs: Problems for Regulators Illustrated by the Possible Effects of Tramadol on Fish Behaviour. *Science of the Total Environment*, vol. 664, May 2019, pp. 915–926.
- VAN DEN BOS, R. et al. Behavioral research in zebrafish (*Danio rerio*): strain as source of variation. In: *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. Academic Press, 2020. p. 245-262.
- VAN HOOGBALEM, M.W. et al. Pharmacotherapy of neonatal opioid withdrawal syndrome: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 17, n. 1, p. 87-103, 2021.
- WALLÉN E. et al. The Effects of Early Prenatal Alcohol Exposure on Epigenome and Embryonic Development. *Genes*, vol. 12, no. 7, 19 July 2021, pp. 1095–1095.
- WANG, L. et al. Kidney Injury Contributes to Edema of Zebrafish Larvae Caused by Quantum Dots. *Science of the Total Environment*, vol. 908, 1 Jan. 2024, pp. 168420–168420.
- WESTERFIELD M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th ed. University of Oregon Press, Eugene, OR. 2000
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WORLD DRUG REPORT 2023*. Available in: https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_Exsum_fin_DP.pdf

5 CONCLUSÕES

1. O presente estudo caracterizou a intoxicação por álcool (EtOH) e opioides (TL), de forma isolada e em associação, em modelo embrionário de *zebrafish*;
2. A concentração de EtOH utilizada foi suficiente para induzir efeitos tóxicos no embrião de *zebrafish*, causando redução da porcentagem da epibolia, da taxa de desenvolvimento embrionário, e atraso na eclosão. Quanto ao opioide, a concentração de TL utilizada induziu efeitos tóxicos em apenas um dos testes realizados, causando edemas de pericárdio, o que corrobora outros estudos que avaliaram a embriotoxicidade desse opioide em *zebrafish*. Quanto a associação das drogas, com a intoxicação por EtOH+TL, foi possível observar efeitos tóxicos, na redução da porcentagem epibólica e da taxa de desenvolvimento embrionário. Porém, estatisticamente, tais resultados não foram significativamente diferentes dos obtidos com exposição apenas ao EtOH, o que pode sugerir que os efeitos tóxicos observados no modelo de poliuso foram induzidos pelo EtOH. Com base nisso, é possível concluir que os mecanismos indutores de toxicidade do EtOH interferem de maneira mais proeminente na morfologia do animal durante o desenvolvimento embrionário, causando um maior *delay* no processo;
3. A concentração de AF utilizada não induziu efeitos tóxicos e protegeu totalmente contra a redução da porcentagem da epibolia e da taxa de eclosão e parcialmente contra a redução na taxa de desenvolvimento induzidas pelo EtOH. Porém, não protegeu contra os efeitos induzidos por TL. Contra os efeitos induzidos por EtOH+TL, o AF protegeu contra a redução da porcentagem da epibolia. Quanto a QUE, a concentração utilizada também não

induziu efeitos tóxicos, mas não protegeu contra os efeitos tóxicos induzidos pelo EtOH, TL e EtOH+TL. Além disso, a co-exposição a QUE e TL induziu efeitos tóxicos ao reduzir a porcentagem epibólica, o que requer investigação. A associação AF+QUE induziu efeitos tóxicos ao reduzir a porcentagem da epibolia, e não protegeu contra os efeitos tóxicos induzidos pelo EtOH, TL e EtOH+TL;

4. O uso do *zebrafish* como modelo animal para estudar o potencial protetor do AF e da QUE contra a intoxicação por EtOH e TL no período embrionário também se mostrou adequado. Pois foi possível caracterizar os efeitos tóxicos induzidos pelo EtOH, TL e EtOH+TL, avaliar a segurança da exposição embrionária ao AF e a QUE, e seu potencial protetor contra a intoxicação, e comparar os resultados com estudos realizados em outros modelos animais, inclusive mamíferos.

REFERÊNCIAS

- ABU, Y.; ROY, S. Prenatal Opioid Exposure and Vulnerability to Future Substance Use Disorders in Offspring. **Experimental Neurology**, vol. 339, 1 May 2021, pp. 113621–113621.
- ADDILAA.E., et al. Alcohol Consumption and Its Associated Factors among Pregnant Women in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis' as given in the Submission System. **Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy**, vol. 15, no. 1, 15 Apr. 2020.
- ALVES-PIMENTA, S., et al. Development Features on the Selection of Animal Models for Teratogenic Testing. **Methods in Molecular Biology**, 1 Jan. 2024, pp. 67–104.
- ASRATIE MH. Unintended pregnancy during COVID-19 pandemic among women attending antenatal care in Northwest Ethiopia: magnitude and associated factors. **International Journal of Women's Health**, 2021; 13: 461.
- BALDO, B.A. Current Research in Pathophysiology of Opioid-Induced Respiratory Depression, Neonatal Opioid Withdrawal Syndrome, and Neonatal Antidepressant Exposure Syndrome. **Current Research in Toxicology**, vol. 3, 1 Jan. 2022, pp. 100078–100078.
- BAO, W., et al. Opioid Neurobiology, Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish. **Neuroscience**, vol. 404, Apr. 2019, pp. 218–232.
- BECKER, S.S.; ROSA, T. Efeitos do consumo de substâncias tóxicas em neonatos e as principais complicações obstétricas: Effects of substance abuse on neonates and the main obstetric complications. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 11, p. 75683-75697, 2022.

- BIAZOTTO, T.A. Aristóteles e a História dos animais: a questão do antropocentrismo entre zoologia e ética. **História da Historiografia**, v. 15, n. 40, p. 116–143, set. 2022.
- BOARD, A. et al. Polysubstance Use during Pregnancy: The Importance of Screening, Patient Education, and Integrating a Harm Reduction Perspective. **Drug and Alcohol Dependence**, vol. 247, 1 June 2023, pp. 109872–109872.
- BOILEAU-FALARDEAU, M. et al. Patterns and Motivations of Polysubstance Use: A Rapid Review of the Qualitative Evidence. **Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada**, vol. 42, no. 2, 1 Feb. 2022, pp. 47–59.
- BROWNE, C. J. et al. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction. **Biological Psychiatry**, vol. 87, no. 1, 1 Jan. 2020, pp. 22–33.
- BUNTING, A. M. et al. Are you thinking what I'm thinking? Defining what we mean by polysubstance use. **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, 50(1), 2023, 1–7.
- CALDERON-GARCIA, A.A. et al. Exposure to morphine and cocaine modify the transcriptomic landscape in zebrafish embryos. **Neuroscience**, v. 507, p. 14-27, 2022.
- CALVETE, C.S.; SOUZA, T.S. História e formação do mercado das drogas. **Revista de Estudos Sociais**, v. 12, n. 3, p. 45-67, 2020.
- CHAGAS, L. S., et al. Neuroinflammation and Brain Development: Possible Risk Factors in COVID-19-Infected Children. **Neuroimmunomodulation**, vol. 28, no. 1, 2021, pp. 22–28.
- CHAVATTE-PALMER, P. et al. Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them. **International Journal of Environmental Research and Public Health/International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 13, no. 6, 14 June 2016, pp. 586–586.
- CHEN, H., et al. Neurodevelopmental effects of maternal folic acid supplementation: a systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 63(19), 2021, pp. 3771–3787.
- CISNEROS, I.E, and CUNNINGHAM K.A. Covid-19 Interface with Drug Misuse and Substance Use Disorders. **Neuropharmacology**, vol. 198, 1 Oct. 2021, pp. 108766–108766.
- CLAYMAN, C.L. et al. Ethanol and caffeine age-dependently alter brain and retinal neurochemical levels without affecting morphology of juvenile and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Plos one**, v. 18, n. 7, p. e0286596, 2023.

- COLLIER, A. D. et al. Utility of the Zebrafish Model for Studying Neuronal and Behavioral Disturbances Induced by Embryonic Exposure to Alcohol, Nicotine, and Cannabis. **Cells**, vol. 12, no. 20, 23 Oct. 2023, pp. 2505–2505.
- CONRADT E. et al. Early life stress and environmental influences on the neurodevelopment of children with prenatal opioid exposure. **Neurobiology of stress**, 1 nov. 2018. v. 9, p. 48–54.
- COOK, J. L. Epidemiology of opioid use in pregnancy. **Baillière's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology/Baillière's best practice and research in clinical obstetrics and gynaecology**, 1 dez. 2022. v. 85, p. 12–17.
- CRUMMY, E. A. et al. One Is Not Enough: Understanding and Modeling Polysubstance Use. **Frontiers in Neuroscience**, vol. 14, 16 June 2020.
- DINIZ, M. S., et al. Nurturing through Nutrition: Exploring the Role of Antioxidants in Maternal Diet during Pregnancy to Mitigate Developmental Programming of Chronic Diseases. **Nutrients**, vol. 15, no. 21, 31 Oct. 2023, pp. 4623–4623.
- DOZET, Danijela et al. Screening for Alcohol Use in Pregnancy: A Review of Current Practices and Perspectives. **International Journal of Mental Health and Addiction**, 22 set. 2021.
- ESPOSITO, D. B. et al. Characteristics of prescription opioid analgesics in pregnancy and risk of neonatal opioid withdrawal syndrome in newborns. **JAMA network open**, v. 5, n. 8, p. e2228588-e2228588, 2022.
- FACCIOL, A. et al. Alcohol Exposure during Embryonic Development: An Opportunity to Conduct Systematic Developmental Time Course Analyses in Zebrafish. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews/Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, vol. 98, 1 Mar. 2019, pp. 185–193.
- FACCIOL, A.; GERLAI, R. Zebrafish shoaling, its behavioral and neurobiological mechanisms, and its alteration by embryonic alcohol exposure: a review. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 14, p. 572175, 2020.
- FAMA, R. Alcohol's Unique Effects on Cognition in Women: A 2020 (Re)View to Envision Future Research and Treatment. **Alcohol Research**, vol. 40, no. 2, 1 Jan. 2020.
- FERNANDES, Y. et al. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 6, p. pyu089, 2015.

- FERNANDES, Y. et al. Diving into the World of Alcohol Teratogenesis: A Review of Zebrafish Models of Fetal Alcohol Spectrum Disorder. **Biochemistry and Cell Biology**, vol. 96, no. 2, Apr. 2018, pp. 88–97.
- FERNER, K.; MESS A.. Evolution and Development of Fetal Membranes and Placentation in Amniote Vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, vol. 178, no. 1, 1 Aug. 2011, pp. 39–50.
- FIOCRUZ. III Levantamento Nacional Sobre O Uso de Drogas Pela População Brasileira. **Fiocruz.br**, 2019.
- FOGELMAN, N. et al. Substance use patterns, quantities, and associated risk factors in women with polysubstance misuse. **Addiction Biology**, v. 29, n. 4, 2024.
- FRAGAA, A. M. et al. Síndrome Alcoólica fetal–Consequências e diagnóstico. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, 2022; v. 48, n. 1: 8771.
- GARCIA, L. P.; SANCHEZ, Z. M. Consumo de álcool durante a pandemia da COVID-19: uma reflexão necessária para o enfrentamento da situação. **Cadernos de Saúde Pública** [online]. v. 36, n. 10.
- GEORGIEFF, M.K., et al. “Atypical Fetal Development: Fetal Alcohol Syndrome, Nutritional Deprivation, Teratogens, and Risk for Neurodevelopmental Disorders and Psychopathology.” **Development and Psychopathology**, vol. 30, no. 3, Aug. 2018, pp. 1063–1086.
- GILI, A. et al. Long-term impacts of the COVID-19 pandemic on drug/alcohol use prevalence in a population with substance use disorders. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 13, p. 6261-6261, 30 jun. 2023.
- GIOVANNINI, E. et al. Fetal and Infant Effects of Maternal Opioid Use during Pregnancy: A Literature Review Including Clinical, Toxicological, Pharmacogenomic, and Epigenetic Aspects for Forensic Evaluation. **Children**, v. 11, n. 3, p. 278–278, 23 fev. 2024.
- GOMES, S.S. et al. Behavioral Effects of the Mixture and the Single Compounds Carbendazim, Fipronil, and Sulfentrazone on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. **Biomedicines**, v. 12, n. 6, p. 1176, 2024.
- GOODWIN, S.R. et al. A Scoping Review of Gender, Sex and Sexuality Differences in Polysubstance Use in Adolescents and Adults. **Alcohol and Alcoholism**, vol. 57, no. 3, 12 Mar. 2022, pp. 292–321.

- GRIFFITH, O. W. Novel Tissue Interactions Support the Evolution of Placentation. **Journal of Morphology**, vol. 282, no. 7, 18 Jan. 2021, pp. 1047–1053.
- HERRERO-TURRIÓN, M.J. et al. Whole-genome expression profile in zebrafish embryos after chronic exposure to morphine: identification of new genes associated with neuronal function and mu opioid receptor expression. **BMC genomics**, v. 15, p. 1-23, 2014.
- HOOD, L. E. Pharmacotherapeutic management of co-morbid alcohol and opioid use. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 21(7), 2020, 823–839.
- HUMPHRIES A. et al. A Review of the Literature: How Does Prenatal Opioid Exposure Impact Placental Health and Fetal Brain Development? **Developmental Psychobiology**, vol. 65, no. 3, 2 Mar. 2023.
- HUSSAIN T. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. **Mediators of Inflammation**, vol. 2021, 27 Sept. 2021, pp. 1–11.
- JIA, L. et al. The Opioid Tramadol Blocks the Cardiac Sodium Channel Nav1.5 in HEK293 Cells. **Europace**, vol. 25, no. 9, 12 July 2023.
- JIANG, Q. et al. Folic Acid Supplement Rescues Ethanol-Induced Developmental Defects in the Zebrafish Embryos. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, vol. 52, no. 5, 1 May 2020, pp. 536–545.
- JOHNSTON, Nancy A.; NEVALAINEN, Timo. Impact of the biotic and abiotic environment on animal experiments. **Handbook of Laboratory Animal Science**, v. 1, p. 311, 2002.
- JOTA, Catarina V. et al. Animal Models in Pharmacology: A Brief History Awarding the Nobel Prizes for Physiology or Medicine. **Pharmacology**, v. 106, n. 7-8, p. 356–368, 1 jan. 2021.
- KALDYGULOVA, L. et al. Biological Role of Folic Acid in Pregnancy and Possible Therapeutic Application for the Prevention of Preeclampsia. **Biomedicines**, vol. 11.
- KANNAN, S.R. et al. Embryonic Ethanol Exposure Induces Oxidative Stress and Inflammation in Zebrafish Model: A Dose-Dependent Study. **Toxicology**, 1 June 2024, pp. 153876–153876.
- KIRLA, K.T. et al. Zebrafish Early Life Stages as Alternative Model to Study “Designer Drugs: Concordance with Mammals in Response to Opioids. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 419, May 2021, p. 115483.
- KO, J.Y. Vital signs: prescription opioid pain reliever use during pregnancy—34 US jurisdictions, 2019. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020.

- KHADKA S, et al. Opioid-Related Polysubstance Use and Its Effect on Mortality and Health Resource Utilization among Trauma Patients. **Injury Epidemiology**., vol. 10, no. 1, 23 Oct. 2023.
- KOZHIMANNIL, K.B. et al. Nonmedical use of prescription opioids among pregnant US women. **Women's Health Issues**, v. 27, n. 3, p. 308-315, 2017.
- LOSS, C.M. et al. Combining animal welfare with experimental rigor to improve reproducibility in behavioral neuroscience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 763428, 2021.
- LIND, J.N., et al. "Maternal Use of Opioids during Pregnancy and Congenital Malformations: A Systematic Review." **Pediatrics**, vol. 139, no. 6, 1 June 2017.
- LIU, H. et al. Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. **Reproductive Sciences**, vol. 27, no. 4, 2 Mar. 2020, pp. 963–976.
- LIU, M. et al. Comparative analysis of the metabolites and biotransformation pathways of fentanyl in the liver and brain of zebrafish. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1325932, 2023.
- MANIKANDAN, P. et al. Ethanol Effects on Early Developmental Stages Studied Using the Zebrafish. **Biomedicines**, vol. 10, no. 10, 13 Oct. 2022, pp. 2555–2555.
- MARTÍNEZ-BURNES, J. et al. Parturition in Mammals: Animal Models, Pain and Distress. **Animals**, vol. 11, no. 10, 14 Oct. 2021, pp. 2960–2960.
- MARCEL, P.; CAIRE-JUVERA, G. Changes in Diet, Physical Activity, Alcohol Consumption, and Tobacco Use in Adults During the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review. **INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing**, 2023.
- MARANGONI, S.R. et al. CONSUMPTION of DRUGS of ABUSE during PREGNANCY ANALYZED by MEANS of the OPPORTUNISTIC SCREENING METHOD. **Cogitare Enfermagem**, v. 27, 13 jun. 2022, p. e79282.
- MÜLLER, T. E. et al. Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 100, p. 109873, 2020.
- MURALIDHARAN, P. et al. Retinal Wnt signaling defect in a zebrafish fetal alcohol spectrum disorder model. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0201659, 2018.
- NUNES, L. M.; JÓLLUSKIN, G. O uso de drogas: breve análise histórica e social. **Revista da Faculdade de Ciências Humanas e Sociais**, Universidade Fernando Pessoa, p. 230-237, 2004.

ODHIAMBO, J.F. et al. A review of maternal nutrition during pregnancy and impact on the offspring through development: evidence from animal models of over-and undernutrition. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 18, p. 6926, 2020.

OEI J.L. Alcohol Use in Pregnancy and Its Impact on the Mother and Child. **Addiction**, vol. 115, no. 11, 3 June 2020, pp. 2148–2163.

PACHECO, M. A. B. et al. Abusive use and non-abusive care: Assistance to crack users in historic city. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e8410917905, 2021.

PATTON, E. et al. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 8, p. 611-628, 2021.

PATRICK, S. W. et al. Neonatal Opioid Withdrawal Syndrome. **PEDIATRICS**, 1 nov. 2020. v. 146, n. 5.

PÉREZ-PASTÉN, R. et al. Quercetin and naringenin reduce abnormal development of mouse embryos produced by hydroxyurea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1003-1009, 2010.

PETERSON, C. et al. Assessment of Annual Cost of Substance Use Disorder in US Hospitals. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 3, 5 mar. 2021, p. e210242–e210242.

POPOVA, S. et al. Alcohol's Impact on the Fetus. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3452, 29 set. 2021.

POPOVA, Svetlana et al. Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 9, n. 1, 23 fev. 2023.

POON, L.C. et al. The First-Trimester of Pregnancy – a Window of Opportunity for Prediction and Prevention of Pregnancy Complications and Future Life. **Diabetes Research and Clinical Practice**, vol. 145, 1 Nov. 2018, pp. 20–30.

REBECA, A. et al. Women's Health and the Phenomenon of Drugs in Brazilian Magazines. **Texto & Contexto Enfermagem** (Impresso), vol. 23, no. 1, 1 Mar. 2014, pp. 92–100.

REYNOLDS, L.P. et al. Nutritional Regulation of Embryonic Survival, Growth, and Development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 23 Nov. 2021, pp. 63–76.

- SALES-CADENA, M. R. et al. Zebrafish (Danio Rerio) Larvae Show Behavioral and Embryonic Development Defects When Exposed to Opioids at Embryo Stage. **Neurotoxicology and Teratology**, vol. 85, May 2021, p. 106964.
- SARMAH, S. et al. Embryonic ethanol exposure dysregulates Bmp and Notch signaling, leading to persistent atrio-ventricular valve defects in zebrafish. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161205, 2016.
- SARMAH, S.; MARRS, J.A. Embryonic ethanol exposure affects early-and late-added cardiac precursors and produces long-lasting heart chamber defects in zebrafish. **Toxics**, v. 5, n. 4, p. 35, 2017.
- SARMAH, S. et al. Embryonic ethanol exposure alters expression of sox2 and other early transcripts in zebrafish, producing gastrulation defects. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3951, 2020a.
- SARMAH, S. et al. Marijuana and opioid use during pregnancy: using zebrafish to gain understanding of congenital anomalies caused by drug exposure during development. **Biomedicines**, v. 8, n. 8, p. 279, 2020b.
- SMITH, L. et al. Correlates of Symptoms of Anxiety and Depression and Mental Wellbeing Associated with COVID-19: A Cross-Sectional Study of UK-Based Respondents. **Psychiatry Research**, vol. 291, Sept. 2020, p. 113138.
- SHAMS, S. et al. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 85, p. 176-190, 2018.
- SILVA, B.R.; SILVA, J.R.V. Mechanisms of Action of Non-Enzymatic Antioxidants to Control Oxidative Stress during in Vitro Follicle Growth, Oocyte Maturation, and Embryo Development. **Animal Reproduction Science**, vol. 249, 1 Feb. 2023, pp. 107186–107186.
- STEANE, S.E. et al. The Role of Maternal Choline, Folate and One-Carbon Metabolism in Mediating the Impact of Prenatal Alcohol Exposure on Placental and Fetal Development. **Journal of Physiology**, vol. 601, no. 6, 21 Feb. 2023, pp. 1061–1075.
- STENGEL, C. The risk of being ‘too honest’: Drug use, stigma and pregnancy. **Health, risk & society**, v. 16, n. 1, p. 36-50, 2014.
- STRAUB, L. et al. Chronic prescription opioid use in pregnancy in the United States. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 30, n. 4, p. 504-513, 2021.

- SYVERTSEN, J. L. et al. Conceptualizing stigma in contexts of pregnancy and opioid misuse: a qualitative study with women and healthcare providers in Ohio. **Drug and alcohol dependence**, v. 222, p. 108677, 2021.
- TOBON, A.L. et al. Opioid Use in Pregnancy. **Current Psychiatry Reports**, vol. 21, no. 12, 16 Nov. 2019.
- TERPLAN M. Women and the Opioid Crisis: Historical Context and Public Health Solutions. **Fertility and Sterility**, vol. 108, no. 2, 1 Aug. 2017, pp. 195–199.
- TRAN, E.L et al. Systematic Review: Polysubstance Prevalence Estimates Reported during Pregnancy, US, 2009–2020. **Maternal and Child Health Journal**, vol. 27, no. 3, 8 Feb. 2023, pp. 426–458.
- VAŠKOVÁ J. et al. The Importance of Natural Antioxidants in Female Reproduction. **Antioxidants**, 11 abr. 2023. v. 12, n. 4, p. 907–907.
- WANG, B. et al. Embryonic exposure to fentanyl induces behavioral changes and neurotoxicity in zebrafish larvae. **PeerJ**, v. 10, p. e14524, 2022.
- WANG, L. et al. Kidney Injury Contributes to Edema of Zebrafish Larvae Caused by Quantum Dots. **Science of the Total Environment**, vol. 908, 1 Jan. 2024, pp. 168420–168420.
- WEBER, A. et al. Substance use in pregnancy: identifying stigma and improving care. **Substance Abuse and Rehabilitation**, p. 105-121, 2021.
- WEEKS, O. et al. Embryonic alcohol exposure in zebrafish predisposes adults to cardiomyopathy and diastolic dysfunction. **Cardiovascular Research**, p. cvae139, 2024.
- WEINSTEIN, A.A. et al. Relationships among neurotransmitters, cytokines and cognitive performance for individuals with hepatitis C achieving sustained virologic response: A pilot study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 335, p. 577022, 2019.
- YADAV, P.K. et al. Ethics, Welfare, 3Rs, and Legislation in Biomedical Research: A Practical Approach. In: Vijayakumar Sreelatha, H., Patel, S., Nagarajan, P. (eds) **Animal Models in Research**. Springer, Singapore. 2024.
- YEE, L.M. et al. Marijuana, opioid, and alcohol use among pregnant and postpartum individuals living with HIV in the US. **JAMA network open**, v. 4, n. 12, p. e2137162-e2137162, 2021.
- YIN, G. et al. Notch signaling pathway inhibitor DAPT improves alcohol-induced neuronal differentiation impairment in zebrafish. *Nan Fang yi ke da xue xue bao*= **Journal of Southern Medical University**, v. 43, n. 6, p. 889-899, 2023.

YOSHIDA, K. et al. Quercetin Stimulates Trophoblast Fusion via the Mitochondrial Function. **Scientific Reports**, vol. 14, no. 1, 2 Jan. 2024.

ZHANG, C. et al. Embryonic Ethanol but Not Cannabinoid Exposure Affects Zebrafish Cardiac Development via Agrin and Sonic Hedgehog Interaction. **Cells**, v. 12, n. 9, p. 1327, 2023.

ZARBAKHSH, S.. Effect of antioxidants on preimplantation embryo development in vitro: a review. **Zygote**, v. 29, n. 3, p. 179-193, 2021.

ZHENG, Q. et al. DNA methylation in alcohol use disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 10130, 2023.

APÊNDICE A – Artigo publicado



Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Síndrome alcoólica fetal no contexto de pós-pandemia da COVID-19

Fetal alcohol syndrome in a post-pandemic of COVID-19 context

Síndrome alcohólico fetal en el contexto de la postpandemia del COVID-19

Maria Leticia Santos Carnaúba da Silva¹, Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco¹, Pabyton Gonçalves Cadena¹.**RESUMO**

Objetivo: Traçar relação entre as consequências secundárias do pós-pandemia da COVID-19 e fatores de risco para o desenvolvimento dos transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF) e da síndrome alcoólica fetal (SAF). **Revisão bibliográfica:** No contexto atual de pós-pandemia é correto afirmar que houve um crescimento de alguns dos principais fatores que influenciam em um maior risco do desenvolvimento do TEAF. Dentre eles se tem um aumento do estresse e da ansiedade, que empobreceram a saúde mental e aumentaram o consumo de álcool, as taxas de desemprego aumentaram a insegurança alimentar e o impacto nos serviços de saúde diminuíram a realização de serviços básicos. Todos esses fatores já existiam, mas foram exacerbados pela pandemia, podendo ser considerados consequências secundárias dela. **Considerações finais:** A pandemia da COVID-19 certamente trouxe maior dificuldade para as gestações e aumentou fatores associados ao desenvolvimento de agravos do desenvolvimento como o TEAF e a SAF. Pesquisas a respeito da relação desses fatores, em contexto de pós-pandemia, relacionados a um crescimento de casos do TEAF e da SAF ainda são escassas, embora a relação exista. Isso deve ser avaliado, pois estes são agravos que comprometem permanentemente a vida das pessoas afetadas, mas são previsíveis e evitáveis.

Palavras-chave: Transtornos do espectro alcoólico fetal, Gestantes, COVID-19, Revisão.**ABSTRACT**

Objective: To delineate a connection between the secondary consequences of the COVID-19 pos pandemic and the risk factors for fetal alcohol spectrum disorders (FASD) and fetal alcohol syndrome (FAS). **Bibliographic review:** In the current post-pandemic context, it is correct to say that there has been an increase in some of the major factors that influence an increased risk of developing FASD. These include increased stress and anxiety, which have impoverished mental health and increased alcohol consumption, unemployment rates have increased food insecurity, and the impact on health services has decreased the delivery of basic services. All these factors already existed, but were exacerbated by the pandemic, and can be considered secondary consequences of it. **Final considerations:** The pandemic of COVID-19 certainly made pregnancies more difficult and increased factors associated with the development of developmental disorders such as FASD and FAS. Research on the relation of these factors, in a post-pandemic context, to an increase in FASD and FAS cases is still scarce, although the relation exists. This should be evaluated, as

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife - PE.

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-0972-2.10/22), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) bolsa de estudo para Amanda Santos Magnabosco e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade a Pabyton Cadena (306947/2020-0).

SUBMETIDO EM: 9/2022

| ACEITO EM: 10/2022

| PUBLICADO EM: 11/2022

APÊNDICE B – Participação em artigo publicado

Environmental Science and Pollution Research
<https://doi.org/10.1007/s11356-024-33955-x>

RESEARCH ARTICLE



Assessment of toxicity of pyriproxyfen, *Bacillus thuringiensis*, and malathion and their mixtures used for mosquito control on embryo-larval development and behavior of zebrafish

Renata Meireles Oliveira Padilha¹ · Samara da Silva Gomes¹ · Jadson Freitas da Silva¹ · Renatta Priscilla Ferreira Silva¹ · André Lucas Corrêa de Andrade¹ · Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco¹ · Thamiris Pinheiro Santos¹ · Andressa Raphaely de Lima Silva¹ · Maria Leticia Santos Carnaúba da Silva¹ · Marília Ribeiro Sales Cadena² · Pabyton Gonçalves Cadena^{1,3}

Received: 12 July 2023 / Accepted: 5 June 2024
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

Abstract

Pyriproxyfen (PPF), *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI), and malathion (MLT) are widely used worldwide to control the population of mosquitos that transmit arboviruses. The current work aimed to evaluate the toxicity of these single pesticides and their binary mixtures of PPF + BTI, PPF + MLT, and MLT + BTI on the embryo-larval stage of zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model. Epiboly, mortality, apical endpoints, affected animals, heart rate, morphometric, thigmotaxis, touch sensitivity, and optomotor response tests were evaluated. PPF and MLT and all mixtures reduced the epiboly percentage. Mortality increased significantly in all exposed groups, except BTI, with MLT being the most toxic. The observed apical endpoints were pericardial and yolk sac edemas, and tail and spine deformation. Exposure to MLT showed a higher percentage of affected animals. A reduction in heart rate was also observed in MLT- and PPF + MLT-exposed groups. The PPF + MLT mixture decreased head measurements. Behavioral alterations were observed, with a decrease in thigmotaxis and touch sensitivity responses in PPF + MLT and MLT + BTI groups. Finally, optomotor responses were affected in all groups. The above data obtained suggest that the MLT + PPF mixture has the greatest toxicity effects. This mixture affected embryo-larval development and behavior and is close to the reality in several cities that use both pesticides for mosquito control rather than single pesticides, leading to a reevaluation of the strategy for mosquito control.

Keywords Pesticides · *Danio rerio* · Heart rate · Toxic effects · Behavior

Introduction

The microcephaly epidemic in Brazil began in 2015 and in 2016; it was declared a public health emergency of international concern by the WHO (de Araujo et al. 2018; Ximenes et al. 2023). Microcephaly is a neurodevelopmental disorder in which the size of the head of a newborn is smaller by two standard deviations than other newborns of the same age and sex (Becerra-Solano et al. 2021). Debates were raised in relation to the cause of the epidemic by the scientific community and the results put forward were that the treatment of drinking water reservoirs with pyriproxyfen to control *Aedes* spp. larvae could be the cause of microcephaly (Albuquerque et al. 2016). However, other studies (de Araujo et al. 2018; Ximenes et al. 2023) proposed that the cause of microcephaly was the Zika virus infection in pregnant women. Between 2015 and 2020, the Brazilian Ministry of

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Pabyton Gonçalves Cadena
pabyton.cadena@ufrpe.br

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil

² Departamento de Biologia (DB), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil

³ Laboratório de Ecofisiologia E Comportamento Animal (LECA), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil

Published online: 14 June 2024

Springer

APÊNDICE C – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v04/07/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 04/07/2024) da proposta intitulada "Desenvolvimento de fármacos nanotecnológicos a base de óleos essenciais para a terapêutica dos transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF) usando zebrafish (Danio rerio) como modelo animal no contexto pós-pandemia de COVID-19. Parte 1.", CEUA nº 9558080922 (ID 085119), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena e equipe; Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco; Katarine Evelyn Falcão e Falcão; Maria Letícia Santos Carnaúba da Silva; Andressa Raphaely de Lima Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) em 08/07/2024.

Pedido apresentado à CEUA: Solicito extensão do prazo para a realização da pesquisa até dezembro de 2026 em virtude da complexidade dos experimentos em virtude do cronograma atualizado do projeto de pesquisa.

Considerações da CEUA: Após análise de solicitação de Emenda da licença CEUA Nº 9558080922, esta Comissão decidiu Ad Referendum manter o parecer do relator como APROVADO

Término previsto: 12/2026

Origem: Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA

Espécie: Peixes

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 0 a 144 horas

Quantidade mantida: 0

Linhagem: Variadas

Peso: 0 a 1 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Peixes	Machos e Fêmeas	2700	0

Recife, 08 de julho de 2024

