

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA CECILIA MANENTI ALEXANDRE

**CONSUMO ABUSIVO DO ÁLCOOL ALTERA PARAMÊTROS
DOPAMINÉRGICOS: ABORDAGEM EXPERIMENTAL E REVISÃO
SISTEMÁTICA**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2019

MARIA CECILIA MANENTI ALEXANDRE

**CONSUMO ABUSIVO DO ÁLCOOL ALTERA PARAMÊTROS
DOPAMINÉRGICOS: ABORDAGEM EXPERIMENTAL E REVISÃO
SISTEMÁTICA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês da Rosa
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A382c Alexandre, Maria Cecilia Manenti.
Consumo abusivo do álcool altera parâmetros
dopaminérgicos: abordagem experimental e revisão sistemática /
Maria Cecilia Manenti Alexandre. - 2019.
73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Maria Inês da Rosa.

Coorientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Alcoolismo. 2. Beber em binge. 3. Álcool – Consumo –
Efeitos colaterais. 4. Sistema dopaminérgico. I. Título.

CDD 23. ed. 616.861

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional e Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho à Deus e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e estiveram presentes comigo nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a quem estendo toda minha fé; Porque Dele, por Ele, e para Ele, são todas as coisas.

Aos meus queridos pais Deiva e Reginaldo, pelo amor incondicional, paciência e incentivo a construção do conhecimento que me fizeram alcançar mais este objetivo.

A toda minha família, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e pelo apoio, independentemente da forma. Um agradecimento especial a minha madrinha, Elisabete pelo exemplo de mulher que é, pela força e fé que deposita em mim.

Aos meus orientadores, Prof^a Dra. Maria Inês da Rosa e Prof Dr. Eduardo Pacheco Rico, por acreditar em mim, pela compreensão, por fortalecer cada vez mais a importância da pesquisa, não apenas orientando este trabalho, mas por todo conhecimento guiado por sábias experiências. Obrigado por cada vez que cobraram e exigiram de mim, pois um bom profissional não se faz de rascunhos.

A todos àqueles que me auxiliaram durante esses anos e neste trabalho em especial, Ana Cláudia, Carla, Daniela, Eduardo, Maria Laura, Tamy, Sarah, Henrique, Samira Leila, Niuany, Carol, Louyse, Rahísa e Emily. Cada um, de seu modo, tornou possível a realização deste trabalho. Minha consideração por vocês é $p < 0,05$.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense, local que representa todos os ângulos do meu aprendizado: onde cursei Biomedicina, onde me dediquei à pesquisa como aluna de iniciação científica e de mestrado, onde conheci grandes amigos e onde passei boa parte destes seis anos.

Aos professores avaliadores Josiane, Alexandra e Lisiane pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho. A CAPES, CNPq e ao PPGCS pelo apoio financeiro.

Ao meu incrível namorado Gabriel, meu grande incentivador e companheiro, por me mostrar o que é um amor verdadeiro. Isto, com certeza, foi fundamental nesse trabalho.

A vida, por me proporcionar vencer mais esta etapa acadêmica e profissional. Nada acontece por acaso, as coisas só precisam do seu tempo para acontecer.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

RESUMO

O consumo do álcool em excesso é considerado um grave problema de saúde, causando danos não somente ao indivíduo adicto, mas também ao ciclo social, familiar e profissional. O consumo abusivo do álcool ocorre de diversas formas, incluindo o binge alcoólico (*weekly-binge*), no qual consiste em um padrão de consumo caracterizado pela ingestão eventual de doses relativamente altas de álcool seguido de um período de abstinência. Entre as vias de sinalização envolvidas no consumo de álcool encontra-se a via de recompensa dopaminérgica, estimulando a liberação de dopamina. Para mimetizar esses efeitos, o peixe-zebra vem sendo utilizado como modelo animal para estudar os efeitos do álcool no cérebro dos vertebrados devido a uma série de vantagens práticas desta espécie e sua similaridade neural com os humanos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o sistema dopaminérgico envolvido no binge alcoólico no modelo de peixe-zebra e realizar uma revisão sistemática em humanos a fim de avaliar as alterações funcionais da dopamina em indivíduos alcoolistas através do exame tomografia por emissão de pósitrons (PET). Durante a fase experimental, os animais foram expostos ao etanol (1,4% v/v) por 30 minutos, uma vez por semana por três semanas consecutivas. Os grupos foram divididos conforme o tempo de análise após a terceira e última exposição ao etanol, sendo eles: *weekly-binge* imediato (WB-I), analisado imediatamente após a última exposição, *weekly-binge* 2 dias (WB-2), após 2 dias e *weekly-binge* 9 dias (WB-9), após 9 dias. Após esse período, os cérebros foram dissecados e a atividade dos transportadores de dopamina (DATs) foi avaliada utilizando ³H]Dopamina marcada radioativamente. A atividade da monoamina oxidase (MAO) foi verificada por método de fluorescência, utilizando quinuramina como substrato não-seletivo. Foi realizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliar os níveis totais de dopamina e noradrenalina. Para a etapa da revisão sistemática foi realizada uma busca a partir das bases de dados utilizando os seguintes termos: "*dopamine*", "*ethanol*", "*alcohol*", "*positron-emission tomography*". Os grupos WB-I e WB-2 apresentaram um aumento significativo da atividade dos DATs comparado ao grupo controle. Os resultados demonstram que em relação a MAO os grupos WB-2 e WB-9 mostraram uma redução significativa na atividade da enzima. Nos níveis cerebrais totais de dopamina os grupos WB-2 e WB-9 apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo controle. A revisão sistemática permitiu a identificação de 293 estudos e após a leitura dos títulos e resumos 285 foram considerados irrelevantes, pois não preencheram os critérios de inclusão. Para leitura do texto completo, foram analisados 50 estudos, sendo nove estudos incluídos na revisão qualitativa. Quatro estudos apresentaram como resultado a redução na disponibilidade apenas no receptor D2 em diferentes regiões cerebrais. Em relação ao receptor D3 isoladamente apenas um estudo relatou esse achado e quatro estudos relataram diminuição em ambos receptores. Diante disso, o binge foi capaz de promover alterações suscetíveis no sistema dopaminérgico mesmo após dois e nove dias a partir da última exposição ao álcool. Em adição, alterações nos receptores D2 em diversas regiões cerebrais em humanos alcoolistas foram encontradas em uma revisão sistemática.

Palavras-chave: Binge, sistema dopaminérgico, peixe-zebra, revisão sistemática.

ABSTRACT

The consumption of alcohol in excess is considered a serious health problem, causing damage not only to the addicted individual, but also to the social, family and professional cycle. Abuse of alcohol occurs in a number of ways, including binge drinking (weekly binge), which consists of a pattern of consumption characterized by occasional ingestion of relatively high doses of alcohol followed by a period of abstinence. Among the signaling pathways involved in alcohol consumption is the dopaminergic reward pathway, stimulating the release of dopamine. To mimic these effects, zebrafish has been used as an animal model to study the effects of alcohol on the vertebrate brain due to a number of practical advantages of this species and its neural similarity with humans. Therefore, the objective of this study was to evaluate the dopaminergic system involved in the alcoholic binge in the zebrafish model and to perform a systematic review in humans in order to evaluate the functional alterations of dopamine in alcoholic individuals through the positron emission tomography (PET). During the experimental phase, the animals were exposed to ethanol (1.4% v/v) for 30 minutes, once a week for three consecutive weeks. The groups were divided according to the time of analysis after the third and last exposure to ethanol, being: weekly-binge immediate (WB-1), analyzed immediately after the last exposure, weekly-binge 2 days (WB-2), after 2 days and weekly-binge 9 days (WB-9), after 9 days. After this time, the brains were dissected and the activity of the dopamine transporters (DATs) was evaluated using radiolabeled [³H] Dopamine. The activity of monoamine oxidase (MAO) was verified by fluorescence method, using quinuramine as a non-selective substrate. The high efficiency liquid chromatography (HPLC) method was used to evaluate the total levels of dopamine and noradrenaline. For the systematic review, a search was made from the databases using the following terms: "dopamine", "ethanol", "alcohol", "positron-emission tomography." The WB-1 and WB-2 groups showed a significant increase in DAT activity compared to the control group. WB-9 presented a significant increase in relation to the control group. The results demonstrate that in relation to MAO the groups WB-2 and WB-9 showed a significant reduction in the activity of the enzyme. In the total brain dopamine levels the WB-2 and WB-9 groups showed a significant increase in relation to the control group. The systematic review allowed the identification of 293 studies and after reading the titles and abstracts 285 were considered irrelevant, since they did not meet the inclusion criteria. For the reading of the full text, 50 studies were analyzed, and nine studies were included in the qualitative review. Four studies have resulted in a reduction in availability only at the D2 receptor in different brain regions. Regarding to the D3 receptor alone only one study reported this finding and four studies reported a decrease in both receptors. In view of this, the binge was able to promote susceptible changes in the dopaminergic system even after two and nine days from the last exposure to alcohol. In addition, changes in D2 receptors in various brain regions in human alcoholics were found in a systematic review.

Key words: Binge, dopaminergic system, zebrafish, systematic review.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Metabolismo do álcool.....	18
Figura 2. Estrutura da dopamina.	22
Figura 3. Neurotransmissão dopaminérgica.....	24
Figura 4: Protocolo experimental weekly-binge (adaptado) em peixe-zebra adulto (Holcombe et al., 2013).....	37
Figura 5. Fluxograma de seleção dos estudos.....	40
Figura 6: Efeito do modelo de binge alcoólico sobre os níveis de dopamina (A) e noradrenalina (B) em cérebro total de peixe-zebra.....	44
Figura 7. Efeito do modelo do binge alcoólico sobre a atividade da enzima monoaminaoxidase em cérebro total de peixe-zebra.....	44
Figura 8. Efeito do modelo do binge alcoólico sobre a funcionalidade dos receptores de dopamina em cérebro total de peixe-zebra.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos estudos incluídos.....	40
Tabela 2. Métodos e resultados dos estudos incluídos	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Acetil-CoA - Acetil coenzima A (do inglês, *acetyl coenzyme A*)
- ACQ - Questionário sobre o desejo de álcool (do inglês, *Alcohol Craving Questionnaire*).
- ADH – Álcool desidrogenase (do inglês, *alcohol dehydrogenase*)
- ALDH – Aldeído desidrogenase (do inglês, *aldehyde dehydrogenase*)
- AMPc - Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico (do inglês, *adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*)
- ATV- Área Tegmental Ventral (do inglês, *ventral tegmental área*)
- AUDIT - Teste de Identificação de Distúrbios do Uso de Álcool (do inglês, *Alcohol Use Disorders Identification Test*)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- COMT - CatecolO-metil Transferase (do inglês, *catechol-methyltransferase*)
- CYP450 – Citocromo P450 (do inglês, *cytochrome P450*)
- D2 – Receptores de dopamina tipo 2
- D3 – Receptores de dopamina tipo 3
- DA – Dopamina
- DALYs - Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (do inglês, *Disability Adjusted Life Years*)
- DAT - Transportador de Dopamina (do inglês, *dopamine transporter*)
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ERK - Cinases Reguladas por Sinal Extracelular (do inglês, *extracellular signal regulated kinase*)
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *oxygen-reactive species*)
- FSCV - Voltametria cíclica de varredura rápida (do inglês, *fast scanning cyclic voltammetry*)
- GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *gamma-aminobutyric acid*)
- hum-DAT - Transportadores de Dopamina em humanos
- KLF11 - Fator 11 de Krüppel (do inglês, *kruppel like factor 11*)
- LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
- MAO – Monoamina Oxidase (do inglês, *monoamine oxidase*)
- MAO-A - Monoamina Oxidase tipo A
- MAO-B - Monoamina Oxidase B tipo B

MEDLINE - Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica (do inglês, *medical literature analysis and retrieval system online*)

MEOS - Sistema Microssomal de Oxidação do Etanol (do inglês, *microsomal ethanol oxidizing system*)

MORs - Receptores μ -opioides (do inglês, *μ -opioid receptors*)

NAc – Núcleo Accumbens (do latim, *nucleus accumbens*)

NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NaOH - Hidróxido de sódio

NIAAA – Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo (do inglês, *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*)

NMDA - N-metil D-Aspartato (do inglês, *N-methyl-D-aspartate*)

NOS - Avaliação de Qualidade Newcastle-Ottawa (do inglês, *Newcastle-Ottawa Scale*)

OMS - Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

PAHO – Organização Pan Americana da Saúde (do inglês, *Pan American Health Organization*)

PET - Tomografia por emissão de Pósitrons (Do inglês, *pósitron-emission tomography*)

PROSPERO – Registro prospectivo internacional de revisões sistemáticas (do inglês, *International Prospective Register of Systemic Reviews*)

SNC – Sistema Nervoso Central

TH - Tirosina Hidroxilase (do inglês, *tyrosine hydroxylase*)

VMAT - Transportador De Monoamina Vesicular (do inglês, *vesicular monoamine transporter*)

WB-1 - Weekly-binge Imediato

WB-2- Weekly-binge Dois dias

WB-9- Weekly-binge Nove dias

zDAT - Gene transportador de dopamina RNAm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ÁLCOOL E ALCOOLISMO	16
1.2 METABOLISMO DO ÁLCOOL.....	17
1.4 EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DE ÁLCOOL.....	20
1.5 ÁLCOOL E NEUROTRANSMISSÃO	21
1.5.1. Sinalização Dopaminérgica	22
1.5.2 Tomografia por Emissão de Pósitons (PET)	26
1.5 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DO ÁLCOOL.....	28
1.6 JUSTIFICATIVA.....	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	32
3.1.1 Local do Estudo	32
3.1.2 Critérios para Seleção dos Estudos	32
3.1.2.1 <i>Critérios de Inclusão dos Estudos</i>	32
3.1.2.2 <i>Critérios de Exclusão dos Estudos</i>	32
3.1.3 Desfechos Mensurados	32
3.1.4 Métodos de Busca para Identificação dos Estudos	33
3.1.4.1 <i>Estratégia de Busca no MEDLINE (PubMed)</i>	33
3.1.4.2 <i>Estratégia de Busca no EMBASE</i>	34
3.1.4.3 <i>Estratégia de Busca na Cochrane Library e LILACS</i>	34
3.1.4.4 <i>Estratégia de Busca na INSIGHT</i>	34
3.1.5 Seleção dos Estudos	34
3.1.6 Extração de Dados	35
3.1.7 Análise dos Dados	35
3.1.8 Avaliação da Qualidade e Risco de Viés	35
3.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	36
3.2.1 Animais	36
3.2.2 Grupos	36
3.2.3 Modelo de Binge Alcoólico	37
3.2.4 Captação de Dopamina	38
3.2.5. Parâmetros Dopaminérgicos	38
3.2.6 Condições Cromatográficas para Dosagem de Monoaminas	39
3.2.7 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	40
4.1.1. Risco de Viés	41
4.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM PEIXE-ZEBRA.....	43
5 DISCUSSÃO	43
5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	43
5.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM PEIXE-ZEBRA.....	50
6. CONCLUSÃO	56

REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	71
ANEXO A – ESCALA DE AVALIAÇÃO DE QUALIDADE NEWCASTLE-OTTAWA	72
ANEXO B – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁLCOOL E ALCOOLISMO

O etanol ou álcool etílico (C_2H_5OH) é um líquido incolor encontrado em todas as bebidas alcoólicas e apesar destas serem classificadas como “drogas” sua comercialização é lícita e com relevante aceitação social. É uma substância psicoativa amplamente utilizada e seu consumo excessivo acarreta em uma série de problemas físicos, sociais e mentais (Gouveia et al., 2009; Almeida e Campos, 2013).

O álcool exerce um importante papel cultural em muitas sociedades, estando presente tanto em rituais religiosos quanto em momentos de comemoração e confraternização. Com o aumento na oferta e comercialização das bebidas alcoólicas, conseqüente a Revolução Industrial, ocorreu uma mudança na maneira da sociedade relacionar-se com o álcool, principalmente por que essas bebidas produzidas artesanalmente passaram a ser preparadas por técnicas aprimoradas e em larga escala industrial devido ao surgimento do processo de destilação (Gigliotti e Bessa, 2004; Gouveia et al., 2009). Desse modo, o padrão de consumo do álcool vem alterando ao longo dos anos e seu uso nocivo constitui causa componente de mais de 200 condições de doenças e lesões, incapacidades e mortalidade (OMS, 2014).

No ano de 1790, o psiquiatra americano Benjamin Rush atestou que “beber inicia num ato de liberdade, caminha para o hábito e, finalmente, afunda na necessidade”. No entanto apenas em 1849 o médico suíço Magnus Huss propôs o termo “alcoholismo”, definindo-o como um conjunto de manifestações patológicas do sistema nervoso central (nas esferas psíquicas, sensoriais e motoras), observadas em sujeitos que consumiam o álcool excessivamente (Gigliotti e Bessa, 2004). Morton Jellinek (1960) redefiniu o conceito de alcoholismo que passou a ser classificado como doença com base nas quantidades de álcool consumidas (Jellinek, 1960; Heckmann e Silveira, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2016) define o alcoholismo como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetitivo de álcool, tipicamente associado aos seguintes sintomas: forte desejo de beber, dificuldade de controlar o consumo, uso contínuo apesar das conseqüências negativas, maior prioridade dada ao uso da substância em detrimento de outras atividades e obrigações; aumento da tolerância e por vezes um estado de abstinência física (OMS, 2016).

O consumo abusivo de álcool é um tema preocupante e de grande relevância para os órgãos de saúde. Cerca de 3,3 milhões de pessoas morreram no mundo em decorrência do consumo nocivo de álcool em 2012, o que equivale a 5,9% de todas as mortes daquele ano (OMS, 2014). Nas américas, a cada 100 mil mortes, 12 poderiam ter sido evitadas sem o uso do álcool (PAHO, 2015). Por ano, o álcool surge como causa de morte de 80 mil pessoas no continente americano, sendo no Brasil a quinta maior taxa. A proporção de óbitos associados ao álcool é superior à mortalidade por HIV/AIDS (2,8%), à violência (0,9%) e à tuberculose (1,7%). Além disso, 5,1% da carga global de doenças e lesões foram atribuíveis ao álcool, o que equivale a 139 milhões de Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (DALYs, do inglês, *Disability Adjusted Life Years*) (OMS, 2014).

1.2 METABOLISMO DO ÁLCOOL

O etanol é rapidamente dissolvido na corrente sanguínea onde é distribuído para a maioria dos órgãos e sistemas, devido as suas características hidrofílicas e lipofílicas. A maior parte da absorção do álcool ocorre no trato gastrointestinal, onde 75% é absorvido no intestino delgado e o restante pela mucosa bucal, esôfago, estômago e intestino grosso. Por serem órgãos altamente vascularizados, o cérebro e os pulmões recebem as doses iniciais de álcool de forma mais rápida (Heckmann e Silveira, 2009). O tempo desde a ingestão até a completa absorção é de aproximadamente uma hora. Todavia, este é dependente de vários fatores como a presença de alimento no estômago, o tipo de alimento ingerido antes de beber e a velocidade em que o indivíduo comeu. A taxa de absorção aumenta quando a evacuação gástrica é acelerada, por exemplo, na ausência de proteínas, gorduras e carboidratos no organismo, e ocorre mais rapidamente quando a bebida possui uma concentração de álcool de 20 a 30%, como por exemplo o vinho (NIAAA, 2004; Paton, 2005; Zakhari, 2006). O álcool também pode prejudicar a absorção de vitaminas no intestino delgado e diminuir o seu armazenamento no fígado, com efeitos no ácido fólico (B9), na piridoxina (B6), na tiamina (B1), na niacina (B3) e na vitamina A (McCabe, 2004).

Após o início da absorção no estômago e intestino, cerca de 90% da metabolização ocorre no fígado, onde o etanol é oxidado no seu principal metabólito, o acetaldeído, por três vias metabólicas: pela via da enzima álcool desidrogenase

(ADH) no citosol, com auxílio do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), o qual é reduzido a NADH; pela via da enzima catalase nos peroxissomos dos hepatócitos, onde o etanol doa elétrons reduzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), responsável por apenas cerca de 10% da oxidação do etanol; e pelo sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) nos microsomos do retículo endoplasmático liso (REL), através do citocromo P450 (isoforma CYP2E1) e seu cofator fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) (Zimatkin, 2006; NIAAA, 2007; Rhoads et al., 2012) (Figura 1). O acetaldeído formado é oxidado rapidamente a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) presente nas mitocôndrias dos hepatócitos. Em altas concentrações este aldeído pode produzir histaminas, e por vários mecanismos causam uma diminuição dos níveis de pressão arterial, náuseas e vômitos. Grande parte do acetato formado é oxidado em dióxido de carbono ou metabolizado em Acetil-CoA, podendo participar do ciclo de Krebs (Edenberg, 2007; Peanal et al., 2016). Em sua maioria, o álcool é eliminado pela urina, porém cerca de 5% é eliminado pela respiração, transpiração e salivação (Paton, 2005).

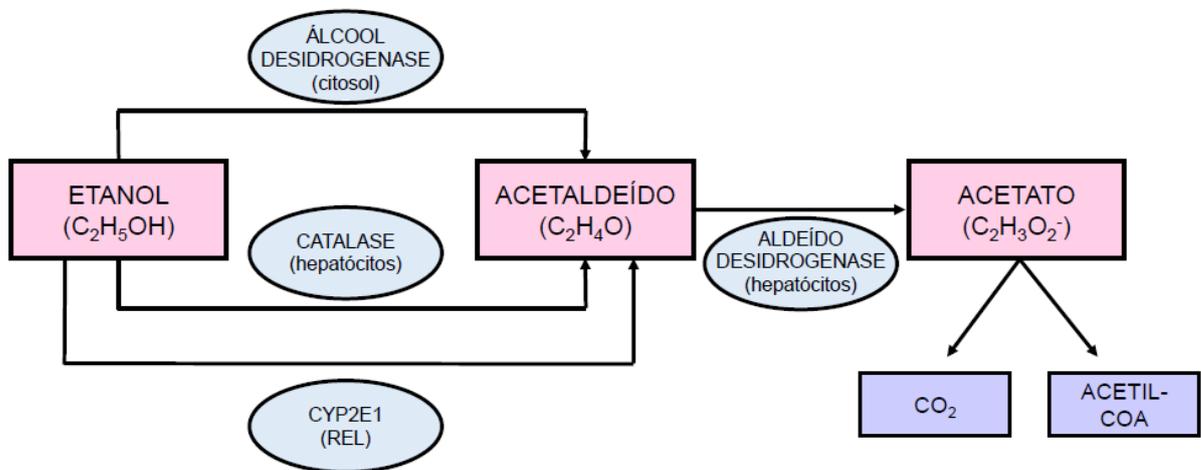


Figura 1: Metabolismo do álcool. O etanol é oxidado a acetaldeído por três vias metabólicas: Álcool desidrogenase, Catalase e CYP2E1. O acetaldeído formado é oxidado a acetato pela enzima Aldeído desidrogenase. Fonte: Adaptado de National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA, 2007).

1.3 PADRÕES DE CONSUMO DO ÁLCOOL

O uso e abuso de álcool são preocupações primárias de saúde pública. O consumo de álcool geralmente ocorre durante a adolescência, tem picos no início dos 20 anos e, em seguida, diminui ao longo da idade adulta. Quanto mais cedo é iniciado

o consumo, mais intensa é a associação a comportamentos de risco, abuso de substâncias, dependência e demais efeitos relacionados (Samhsa, 2011). A fim de estabelecer diretrizes para evitar os danos causados pelo álcool existem três principais padrões de consumo, variáveis conforme a quantidade e a frequência em que o álcool é ingerido e são classificados em: moderado, pesado e o binge alcoólico (do inglês, *binge drinking*) (NIAAA, 2015).

O padrão de consumo moderado é descrito como “beber socialmente”, ou seja, beber em quantidades moderadas e que não causam problemas para o consumidor e a sociedade (Almeida e Campos, 2013). Segundo o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) (2004) este padrão é distinto para homens e mulheres e é definido como a ingestão de 1 dose de álcool por dia, até 7 doses por semana para as mulheres e 2 doses de álcool por dia, até 14 doses por semana para os homens. Sendo que 1 dose equivale a aproximadamente 355mL de cerveja, 150mL de vinho ou 45mL de uma bebida destilada, considerando que cada dose contém entre 10 e 15g de etanol. Mesmo dentro dessas limitações, é aconselhado um ou dois dias da semana sem a ingestão de álcool e evitá-la completamente em situações em que o indivíduo possui alguma patologia que pode ser agravada com o consumo de álcool, caso estiver conduzindo automóveis ou operando máquinas e mulheres durante a gestação (OMS, 2010). Já o consumo pesado excede o uso moderado de álcool, ultrapassando a dose diária ou semanal indicada para homens e mulheres (NIAAA, 2004).

O NIAAA (2004) define como binge a ingestão de altas doses de álcool, cinco doses ou mais no caso de homens e quatro doses ou mais no caso de mulheres, em um intervalo médio de duas horas, atingindo altos níveis de concentração alcoólica no sangue, em torno de 0,8g/L, correspondente a 0,8% do volume total sanguíneo. Também chamado de consumo de risco, está frequentemente associado a alterações neurológicas e psicológicas, incluindo comprometimento cognitivo e diminuição da qualidade de vida geral (Almeida e Campos, 2013; Holcombe et al., 2013). Além disso, pode afetar o humor, a memória e em longo prazo pode levar a sérios problemas de saúde mental resultando em comportamentos antissociais, agressivos e violentos (Ward, 2009). Embora o binge alcoólico seja um padrão de consumo mais encontrado em adolescentes, também é encontrado na população adulta, gerando danos tão severos quanto em populações jovens (Viner e Taylor, 2007).

Ao contrário dos indivíduos que bebem moderadamente, os consumidores em binge exibem uma forte resposta aos efeitos eufóricos primários, mas são menos sensíveis aos efeitos sedativos do álcool, indicando uma pré-disposição para o desenvolvimento do vício no álcool (Schuckit et al., 2008). Após uma série de exposições, a retirada do álcool é debilitante e pode promover aumento na ansiedade, nos comportamentos de busca pela substância e crises convulsivas. A gravidade destes sintomas depende da quantidade e da velocidade de álcool ingerido (Holcombe et al., 2013).

Semelhante à exposição crônica ao álcool, a alta quantidade de álcool ingerida no binge também induz uma série de consequências neurotóxicas como edema cerebral, estresse oxidativo, excitotoxicidade, neuroinflamação e cicatrizes gliais que resultam em neurodegeneração (Nixon e Crews, 2004; Haorah et al., 2008; Kelso et al., 2011; Shah et al., 2015). Estudos realizados em ratos expostos ao modelo de binge alcoólico durante quatro dias encontraram neurodegeneração induzida mesmo após uma única exposição ao binge (Obernier et al., 2002; Leasure e Nixon, 2010; Maynard e Leasure, 2013) e o dano cerebral aumentado conforme a duração da exposição (Obernier et al., 2002; Collins e Neafsey, 2012).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DE ÁLCOOL

O consumo mundial de álcool puro por indivíduos de 15 anos ou mais é estimado em torno de 6,4 litros, o que equivale a 13,5g por dia. Enquanto que no Brasil, o consumo estimado é superior à média mundial, correspondendo a 8,7 litros de álcool por pessoa. Diante disso, o Brasil ocupa a 53ª posição entre os países que mais consomem álcool. Utiliza-se a definição de “álcool puro” a fim de facilitar a comparação entre as bebidas alcoólicas, pois cada tipo apresenta porcentagem diferente de álcool. Em relação as variedades de bebidas alcoólicas, no Brasil 60% destas são consumidas na forma de cerveja (OMS, 2014).

Com relação ao sexo, estima-se que os homens consomem 13,6 litros por ano, enquanto as mulheres 4,2 litros de álcool puro. Apesar do consumo ser maior entre os homens, as mulheres são mais vulneráveis aos danos causados pelo álcool, uma vez que seu uso durante a gestação pode causar a síndrome alcoólica fetal (OMS, 2014; Garcia e Freitas, 2015). O consumo de álcool pelo menos uma vez ao

ano é realizado por mais da metade dos brasileiros, sendo a região sul o cenário mais preocupante, onde 11% dos homens bebem diariamente, superior as outras regiões cujo valor não ultrapassa 6% (Laranjeira et al., 2012).

Globalmente, em 2010 a prevalência do padrão binge foi estimada em 7,5% na população total com 15 anos ou mais, número superior no continente europeu (16,5%) e no americano (13,7%) (OMS, 2014). De acordo com Laranjeira et al. (2010), quase um quarto da população brasileira consome bebidas alcoólicas neste padrão.

Além de estar relacionado como fator de patogenia em diversas doenças hepáticas, cardíacas, pancreáticas e até mesmo implicado em vários tipos de câncer, o consumo em binge tem efeitos tóxicos no SNC, interferindo nos sistemas de neurotransmissores (NIAAA, 2013).

1.5 ÁLCOOL E NEUROTRANSMISSÃO

O etanol é uma pequena substância neurotrópica lipossolúvel que penetra na barreira hematoencefálica e interage com diversos sistemas de neurotransmissores no cérebro. Esta substância pode afetar o SNC causando um desequilíbrio nos neurotransmissores excitatórios (aspartato e glutamato) e inibitórios, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e taurina (De Witte, 2004). Comumente classificado como uma droga depressora, o álcool é um agonista de receptores GABA, favorecendo a atividade inibitória pós-sináptica. Com a exposição crônica ao álcool os receptores glutamatérgicos N-metil-Daspartato (NMDA) são estimulados em resposta aos efeitos depressivos do etanol para reestabelecer o balanço energético inibitório/excitatório. (De Witte, 2004; Quertemont et al., 2005; Addicott et al., 2007).

Além desses neurotransmissores a dopamina é um importante neurotransmissor suscetível a alterações causadas pelo álcool alterando a plasticidade sináptica (Chen et al., 2007). Ji et al. (2017) examinaram a relação entre o consumo de álcool em binge e a plasticidade dependente do tempo de disparo nos neurônios do *núcleo accumbens* (NAc) e descobriram que repetidos binges alcoólicos modulam a plasticidade sináptica em neurônios espinhosos médios das vias direta e indireta do NAc, evidenciando a dopamina como um alvo interessante no estudo do álcool.

1.5.1. Sinalização Dopaminérgica

A dopamina ($C_8H_{11}NO_2$) é um neurotransmissor pertencente à família das catecolaminas e está envolvida em uma variedade de processos do sistema nervoso central, incluindo cognição, atividade motora, motivação e recompensa, humor, atenção e aprendizado (Ma e Zhu, 2014).

A estrutura das catecolaminas consiste em um núcleo de catecol (3,4-dihidroxibenzeno) com uma cadeia lateral de etilamina (grupo R) no caso da dopamina (Figura 2) (Standaert e Galanter, 2012). O aminoácido tirosina é o precursor de todas as catecolaminas, sendo que nos neurônios dopaminérgicos, o produto final da síntese é a dopamina. Além da sua função como neurotransmissor, a dopamina também atua como precursor de noradrenalina e a adrenalina (Feldman et al., 1997; Vallone et al., 2000).

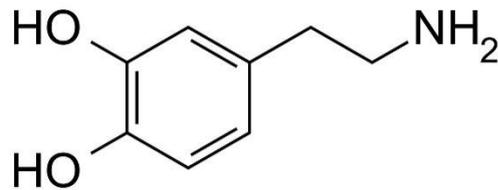


Figura 2: Estrutura da dopamina. Fonte: Standaert e Galanter, 2012.

O sistema dopaminérgico inclui a via nigrostriatal, a via mesolímbica e a via tuberoinfundibular. A maior área dopaminérgica no cérebro é a via nigrostriatal, a qual contém cerca de 80% da dopamina cerebral, onde esta é produzida na substância negra (Adinoff, 2004).

O álcool aumenta a transmissão dopaminérgica e aumenta a taxa de disparo desses neurônios, aumentando a liberação de dopamina (Ward, 2009). Entretanto, esta substância não conduz a um aumento da dopamina em toda a parte do cérebro, mas apenas causa um aumento deste neurotransmissor na área da via de recompensa (Boileau et al., 2003). Medialmente à substância negra, existe a área tegmental ventral (ATV), onde a dopamina produzida nesta região, é liberada no NAc e segue para o córtex pré-frontal (Tupala e Tiihonen, 2004). A via de recompensa modula as funções fisiológicas primárias relacionadas à sobrevivência, incluindo a ingestão de alimentos, água e comportamento sexual. Esta via também é alvo de substâncias psicoativas, incluindo álcool, cocaína, anfetaminas e opióides (Jones e Miller, 2008).

Durante o consumo abusivo, podem ser necessárias quantidades maiores de álcool para provocar a liberação de dopamina, a fim de obter os efeitos prazerosos da ingestão de álcool. Durante a retirada de álcool, a liberação de dopamina é diminuída, reduzindo dramaticamente o disparo de neurônios relacionados, levando a disforia, mal-estar e depressão (Boileau et al., 2003; Ward, 2009).

Responsável pela síntese da dopamina, a enzima tirosina hidroxilase (TH) converte a L-tirosina em L-DOPA que, por sua vez, é descarboxilada em dopamina pela DOPA descarboxilase. Uma vez sintetizada, a dopamina é transportada e armazenada em vesículas sinápticas através do transportador de monoamina vesicular (VMAT) e, em resposta a um potencial de ação pré-sináptico, é liberada da célula. Uma vez liberada, a dopamina ativa uma variedade de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos que são acoplados a vários mecanismos de sinalização celular. A transmissão dopaminérgica é inativada pela sua recaptação através do transportador de dopamina (DAT) para o neurônio pré-sináptico onde pode ser rearmazenada em vesículas para posterior uso na neurotransmissão (pelo VMAT) ou pode ser metabolizada pela ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) ou catecol-O-metil transferase (COMT) (Tupala e Tiihonen, 2004; Jones e Miller, 2008; Standaert e Galanter, 2012). A dopamina na fenda pode ligar-se tanto a receptores dopaminérgicos pós-sinápticos quanto a auto-receptores dopaminérgicos pré-sinápticos.

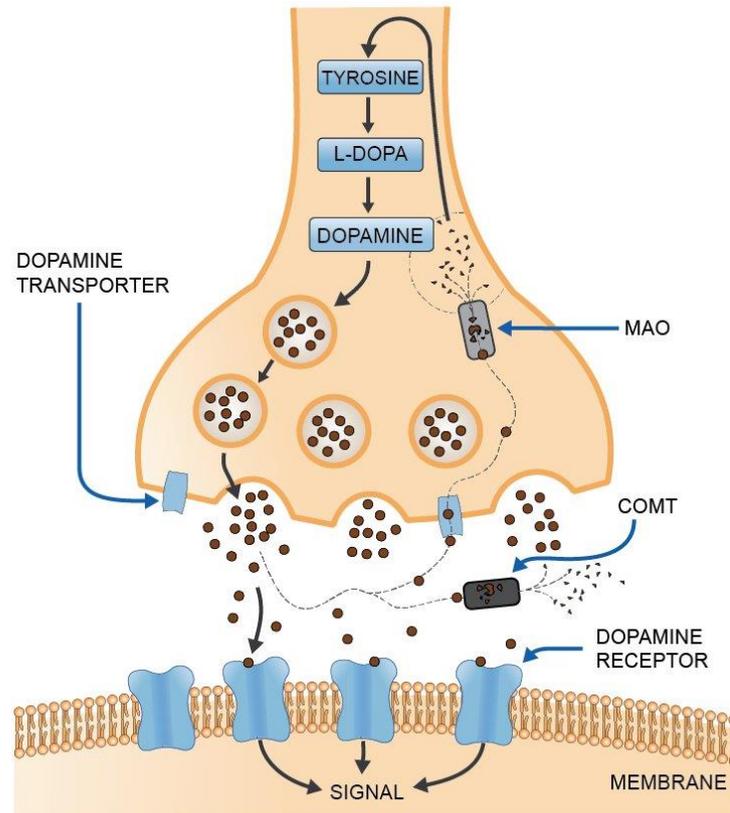


Figura 3: Neurotransmissão dopaminérgica. A dopamina é sintetizada através da enzima tirosina hidroxilase e é transportada e armazenada em vesículas pela ação do transportador de monoamina vesicular (VMAT). Com um estímulo nervoso, a dopamina é liberada na fenda sináptica ativando vários receptores. A transmissão dopaminérgica é interrompida pela sua recaptção através do Transportador de Dopamina (DAT) para o neurônio pré-sináptico. A dopamina recaptada pode ser rearmazenada em vesículas para subsequente uso na neurotransmissão (pelo VMAT) ou pode ser degradada pela ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) ou catecolO-metil transferase (COMT). Fonte: Biolution, 2016.

Grande parte da dopamina liberada na fenda sináptica é recaptada ao neurônio pré-sináptico pelos DAT, uma proteína de onze domínios transmembrana pertencente à família de transportadores dependentes de sódio e cloreto. Os DATs têm o papel de mediar a recaptção de dopamina extracelular, regulando a neurotransmissão dopaminérgica e suas funções. Diante disso, estes transportadores têm sido implicados como alvos de ação de drogas psicoativas, dentre elas o álcool (Ciliax et al., 1995; Robinson et al., 2005; Standaert e Galanter, 2012). Reduções na disponibilidade dos DATs podem desempenhar um papel fisiopatológico no desenvolvimento da dependência do álcool (Laine et al., 1999; Repo et al., 1999; Tupala et al., 2003; Yen et al., 2015). No entanto, há resultados controversos, sem nenhuma alteração nos transportadores (Volkow et al., 1996; Tiihonen et al., 1998). Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos ao fato de que a dependência do álcool é um transtorno complexo e que a presença de diferentes subtipos clínicos pode influenciar a disponibilidade de DAT (Yen et al., 2015).

A enzima MAO oxida aminas de fontes endógenas e exógenas, aumentando a concentração de aminas neurotransmissoras regulando sua disponibilidade e atividade fisiológica. Existem duas isoformas: a monoamina oxidase A (MAO-A) expressa no cérebro e periferia e a monoamina oxidase B (MAO-B) concentrada no SNC, ambas localizadas na membrana externa da mitocôndria, mas são codificadas por genes diferentes. Tanto a MAO-A quanto a MAO-B regulam a neuroquímica degradando os neurotransmissores de monoamina (serotonina, dopamina e norepinefrina). Qualquer alteração nos níveis de MAO pode ter efeitos devastadores no cérebro e no comportamento, diminuindo ou aumentando os níveis de neurotransmissores e produzindo Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Anichtchik et al., 2006; Duncan et al., 2012).

Além disso, a MAO está envolvida no alcoolismo pois é regulada positivamente em resposta ao fator 11 de Krüppel (KLF11), um gene responsivo ao etanol envolvido na neurodegeneração cerebral. O KLF11 é um ativador transcricional de ambas as isoformas da MAO que contribuem para a produção de EROs através do catabolismo das monoaminas (Shih et al., 1999; Grunewald et al., 2012; Ou et al., 2014). Logo, a cascata KLF11-MAO tem um papel na disfunção e dano celular relacionado aos transtornos por uso de álcool (Duncan et al., 2016).

Cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3, D4 e D5) foram identificados e clonados e todos eles funcionam de forma individual e interativa como receptores acoplados à proteína G (Ma e Zhu, 2014). Em sua maioria, os receptores de dopamina são distribuídos pelo cérebro e são expressos sobre a superfície de neurônios pós-sinápticos, sendo responsáveis pela metabolização posterior da dopamina. Estes receptores também podem ser expressos em nível pré-sináptico, atuando como auto receptores e realizando a recaptação do neurotransmissor em excesso na fenda sináptica (Standaert e Galanter, 2012).

O etanol estimula a liberação de dopamina e afeta o funcionamento dos receptores dopaminérgicos, particularmente dos receptores do tipo 2 (D2) e 3 (D3) (Beaulieu et al., 2011). Em humanos, a ingestão crônica de álcool reduziu a disponibilidade dos receptores D2, o que pode representar uma regulação negativa compensatória que garante a homeostase da neurotransmissão dopaminérgica central. Esta hipótese tem sido apoiada por estudos clínicos utilizando o método de imagem PET *scan*, o qual relata uma redução de até 20% na disponibilidade do receptor D2 no estriado de indivíduos alcoolistas em comparação com os controles

(Hietala et al., 1994; Volkow et al., 1996; Heinz et al., 2005; Martinez et al., 2005; Spreckelmeyer et al., 2011).

O receptor D3 possui uma alta densidade no sistema dopaminérgico límbico e também tem um papel importante na mediação dos efeitos do estresse, levando ao comportamento de busca de drogas (Heidbreder e Newman, 2010). Em humanos, uma dose única de um antagonista seletivo de D3 foi mostrada para aliviar parcialmente o desejo por cigarro em fumantes abstinente de curto prazo (Mugnaini et al, 2013).

1.5.2 Tomografia por Emissão de Pósitons (PET)

É um exame de imagem que utiliza elementos radioativos que emitem um pósitron, um elétron positivo de existência efêmera, que ao atravessar o meio ambiente colide com um elétron negativo e ambos se anulam, dando origem a dois raios gama de alta energia (511 keV cada) que se propagam em sentidos opostos, a 180° um do outro. No momento da sua desintegração, o pósitron é detectado para formar as imagens do exame (Ginovart, 2005; Zhang e Fox, 2012)

Para exercer os seus efeitos no cérebro, o álcool e outras drogas atuam sobre neurotransmissores no cérebro, bem como em receptores, com os quais os neurotransmissores interagem. Compostos específicos que se ligam seletivamente a esses receptores e as enzimas que estão envolvidas na síntese ou metabolismo dos neurotransmissores podem ser marcadas com radiotraçadores de PET (Thanos et al., 2008; Yoder et., 2011).

A neuroimagem do sistema dopaminérgico através da PET tem sido fundamental na caracterização da dependência do álcool em humanos (Martinez et al, 2007). As técnicas de neuroimagem molecular tem importância na investigação de proteínas cerebrais, tais como de neuroreceptores, transportadores e enzimas, de forma segura e não invasiva (Baldaçara et al., 2011). Por meio da técnica é possível acompanhar a neurotransmissão dopaminérgica e suas alterações, porém, o PET não fornece uma medida direta dos níveis de dopamina endógenos. De fato, alterações nos níveis endógenos de dopamina são inferidos a partir de alterações na ligação de um radioligante aos receptores D2. Drogas que aumentam os níveis de dopamina endógena, como o álcool, diminuem a ligação desses radioligantes a receptores D2

pós-sinápticos, enquanto o efeito oposto é observado com drogas que diminuem os níveis de dopamina endógenos (Ginovart, 2005; Takano et al., 2016).

O exame PET tem a capacidade de detectar alterações funcionais, metabólicas e bioquímicas em órgãos ou tecidos, através de substâncias radioativas (carbono-11, nitrogênio-13, oxigênio-15 e flúor-18) que acompanham os processos metabólicos, sem interferir com eles. Quando um composto radioativo é introduzido no corpo como um traçador (ou um radioligante para um receptor), o traçador apresenta um sinal de emissão para indicar a localização do composto marcado. A imagem PET usa esses sinais para reconstruir a distribuição *in vivo* do traçador como tomografia tridimensional em vários intervalos de tempo e transformado em sinogramas. Após a reconstrução, estas imagens sequenciais emolduradas refletem a distribuição espacial do traçador ao longo do tempo como uma série de imagens volumétricas quantitativas (Zhang e Fox, 2012; Takano et al., 2016).

Apesar do avanço de tecnologias médicas não invasivas para estudar o cérebro humano como o PET, esses estudos *in vivo* não são uma tarefa fácil devido a limitações éticas e metodológicas, porque essas abordagens não são capazes de fornecer todas as informações sobre a fisiopatologia do abuso do álcool necessárias ao desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (Nestler e Hyman, 2010). Modelos animais são capazes de mimetizar o padrão de binge alcoólico observado em humanos e fornecem um meio para estudar sistematicamente os mecanismos relacionados aos danos induzidos pelo binge, bem como estudar potenciais intervenções terapêuticas (Collins et al., 1996; Obernier et al., 2002; Leasure e Nixon, 2010; Holcombe et al., 2013).

A fim de compreender o mecanismo da neurotransmissão frente ao álcool, diversos modelos animais têm sido propostos, dentre eles: roedores, cultura de células e o peixe-zebra (*Danio rerio*). O modelo de peixe-zebra é identificado como um “modelo alternativo”, em relação aos modelos clássicos de roedores, porém o termo “modelo complementar” é mais apropriado, pois aborda o uso de peixes além de modelos clássicos de mamíferos (Levin e Cerruti, 2009). Diante disso, o peixe-zebra representa um excelente compromisso entre a complexidade dos sistemas e a simplicidade prática, superando muitas limitações características desses modelos de roedores (Tran et al., 2016a).

1.5 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DO ÁLCOOL

O peixe-zebra é um pequeno teleósteo, de 3 a 4cm, de água doce pertencente à família *Cyprinidae* que vem sendo amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas da ciência, como genética, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997; Gerlai et al., 2000). Este peixe traz vantagens para a pesquisa devido ao pequeno espaço necessário para sua manutenção, baixo custo, fácil manipulação, rápido desenvolvimento, grande prole, embriões translúcidos e suscetíveis a manipulação e microinjeção (Lele e Krone, 1996). Outra característica importante é que esta espécie absorve as substâncias diretamente da água pelas brânquias, proporcionando uma manipulação simples e não invasiva (Yang et al., 2009; Mathur et al., 2011). Além disso, já tem seu genoma sequenciado possuindo aproximadamente uma homologia de 70 a 80% com o genoma humano (Stern e Zon, 2003).

Amplamente estudados em mamíferos, os sistemas de neurotransmissão já foram identificados e descritos em peixe-zebra, como o colinérgico (Behra et al., 2002), GABAérgico (Kim et al., 2004), glutamatérgico (Edwards e Michel, 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004) e purinérgico (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004; Savio et al., 2012).

Os neurônios dopaminérgicos são detectados no peixe-zebra entre 18 e 19 horas pós-fertilização em células do diencéfalo ventral. Esses neurônios caracterizam o sistema dopaminérgico ascendente para o estriado, comparado com a via nigroestriatal em humanos (Holzschuh et al., 2001). Os receptores D1, D2, D3 e D4 também foram identificados e encontram-se expressos neste animal (Boehmler et al., 2004).

As enzimas TH e MAO e os DATs já foram descritos e identificados no peixe-zebra, apresentando similaridade com os humanos. Quanto as duas enzimas, dois genes que codificam TH foram identificados no peixe-zebra provavelmente originados como resultado da duplicação do genoma, mostrando uma expressão complementar (Chen et al., 2009). Apesar de ambas possuírem similaridade entre si, a TH1 de peixe-zebra é significativamente mais semelhante da TH em humanos (Filippi et al., 2010). Já com a MAO, um estudo relatou propriedades clonais, de distribuição e funcionais da enzima no peixe-zebra e foi descoberta apenas uma forma

de MAO que é funcionalmente semelhante a ambas as isoformas de mamíferos, MAO-A e MAO-B. Além disso, identidades nucleotídicas razoavelmente altas (68,8%) foram observadas com a MAO-B bovina e humana (Anichtchik et al., 2006). Quanto aos DATs, suas sequências de aminoácidos em peixe-zebra foram comparadas com a dos DATs em humanos (hum-DAT) e encontrou uma alta homologia aos dos humanos, possuindo 76% de identidade dos aminoácidos e 9% de similaridade (Holzschuh et al., 2001).

Em relação à exposição de álcool em peixe-zebra, alterações neuroquímicas nos níveis cerebrais de dopamina, serotonina, regulação dos níveis de AMPc e da via de sinalização das cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) são descritas (Chatterjee e Gerlai, 2009; Peng et al., 2009). Estudos em peixe-zebra submetido a exposição aguda e crônica ao álcool tem mostrado aumento dos níveis de dopamina no cérebro inteiro (Chatterjee e Gerlai, 2009; Gerlai et al., 2009; Nowicki et al., 2015; Tran et al., 2016b; Tran et al., 2017). A exposição aguda e crônica do álcool em peixe-zebra em diferentes tempos promove respostas comportamentais do tipo ansiedade, depressora/sedativa e de preferência condicionada ao etanol (Mathur e Guo, 2011; Mathur et al., 2011). O etanol misturado ao ambiente do aquário é absorvido pelas brânquias e pele do peixe-zebra é rapidamente distribuído para todos os tecidos (Gerlai et al., 2000; Chatterjee e Gerlai, 2009). Após 15 minutos de exposição ao álcool em uma concentração de 0,50% (v/v) foi alcançado um equilíbrio entre o nível de etanol no aquário e no cérebro do peixe-zebra o qual foi mantido por 24 horas (Dlugos e Rabin, 2003).

Embora doses estimulantes de álcool aumentem os níveis completos de dopamina já tenham sido descritos, o sistema dopaminérgico frente ao modelo de exposição intermitente (binge) permanece desconhecido no peixe-zebra. Atualmente, apenas um estudo (Holcombe et al., 2013) na literatura avaliou o binge alcoólico em peixe-zebra adulto, no qual, apenas alterações comportamentais foram descritas. Devido a inexistência de parâmetros dopaminérgicos não explorados no estudo, esta dissertação buscou avalia-los em peixes-zebra submetidos ao binge para melhor compreender os efeitos do álcool neste padrão de consumo.

1.6 JUSTIFICATIVA

O consumo abusivo do álcool é considerado um grave problema de saúde pública e está associado com sérias consequências psicológicas, médicas, profissionais e sociais resultando num alto custo evitável. Embora o padrão de consumo em binge venha crescendo exponencialmente ao longo dos anos, devido aos hábitos contemporâneos por grande parte da população, os mecanismos da sinalização dopaminérgica ainda não estão completamente estabelecidos. Estudos de imagem em humanos como o PET têm avançado nas pesquisas, porém devido as suas limitações não fornece dados suficientes para compreender os mecanismos neuropatológicos envolvidos.

Considerando que o peixe-zebra possui receptores, enzimas e transportadores do sistema dopaminérgico previamente descritos, este animal se torna um importante e consolidado modelo experimental para mimetizar o padrão de binge. Com isso, torna-se importante a investigação da sinalização dopaminérgica tanto em estudos pré-clínicos como através de uma revisão sistemática da literatura em alcoolistas na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos na exposição ao etanol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o sistema dopaminérgico em peixe-zebra submetidos ao modelo de binge alcoólico e em humanos alcoolistas a partir de uma revisão sistemática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as possíveis alterações promovidas pela exposição excessiva ao etanol sobre a atividade da enzima MAO em cérebro de peixes-zebra adultos submetidos ao modelo de binge alcoólico;
- Determinar os níveis de dopamina em cérebro de peixes-zebra adultos submetidos ao modelo de binge alcoólico;
- Padronizar a funcionalidade dos DATs através de diferentes condições de ensaio da captação de dopamina em tecido cerebral de peixe-zebra;
- Avaliar a atividade dos DATs em cérebro de peixes-zebra adultos submetidos ao modelo de binge alcoólico;
- Avaliar alterações funcionais de dopamina no abuso de álcool nas diferentes faixas etárias, sexo, tempo de consumo e abstinência através de uma revisão sistemática em humanos alcoolistas submetidos ao exame de PET.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

3.1.1 Local do Estudo

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade do Extremo Sul Catarinense no Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

3.1.2 Critérios para Seleção dos Estudos

3.1.2.1 Critérios de Inclusão dos Estudos

Foram incluídos estudos observacionais do tipo caso-controle, realizados com humanos em situação de abuso de álcool submetidos ao exame de imagem PET para análise de dopamina, independente da dose, idade, sexo e tempo de consumo e abstinência comparados a um grupo controle.

3.1.2.2 Critérios de Exclusão dos Estudos

Foram excluídos estudos realizados com indivíduos com patologias ou uso de medicamentos capazes de alterar o funcionamento do sistema dopaminérgico e estudos pré-clínicos.

3.1.3 Desfechos Mensurados

a) Desfechos primários:

Alterações funcionais de dopamina no abuso do álcool.

b) Desfechos secundários:

Alterações funcionais de dopamina por faixa etária, sexo, tempo de consumo e abstinência.

3.1.4 Métodos de Busca para Identificação dos Estudos

Inicialmente foi realizado registro da pesquisa no PROSPERO (International Prospective Register of Systemic Reviews, <http://www.crd.york.ac.uk/prospero>) sob o código CRD42018108327. Por se tratar de uma revisão sistemática é dispensada a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

A pesquisa foi realizada fazendo-se uma busca exaustiva das bases de dados Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Excerpta Medical Database (Embase), Cochrane Library e Insight por publicações relevantes até março de 2018. Os bancos de dados foram pesquisados utilizando os seguintes termos: "dopamine", "ethanol", "alcohol", "binge drinking", "positron-emission tomography". A pesquisa foi limitada para humanos, mas não houve restrição de idioma.

3.1.4.1 Estratégia de Busca no MEDLINE (PubMed)

1. dopamine [MeSH Terms]
2. dopamine [All Fields]
3. #1 OR #2
4. ethanol [MeSH Terms]
5. ethanol [All Fields]
6. alcohol [All Fields]
7. alcohols [MeSH Terms]
8. alcohols [All Fields]
9. binge drinking
10. #4 OR #5 OR #6 OR #7 OR #8 OR #9
11. positron-emission tomography [MeSH Terms]
12. positron-emission [All Fields]
13. tomography [All Fields]
14. emission [All Fields]
15. #11 OR #12 OR #13 OR #14
16. #3 AND #10 AND #15

3.1.4.2. *Estratégia de Busca no EMBASE*

1. dopamine [ti.ab]
2. dopamine [ti.ab]
3. #1 OR #2
4. ethanol [ti.ab]
5. ethanol [ti.ab]
6. alcohol [ti.ab]
7. alcohols [ti.ab]
8. alcohols [ti.ab]
9. binge drinking [ti.ab]
10. #4 OR #5 OR #6 OR #7 OR #8 OR #9
11. positron-emission tomography [ti.ab]
12. positron-emission [ti.ab]
13. tomography [ti.ab]
14. emission [ti.ab]
15. #11 OR #12 OR #13 OR #14
16. #3 AND #10 AND #15

3.1.4.3 *Estratégia de Busca na Cochrane Library e LILACS*

Dopamine AND ethanol OR alcohol AND positron-emission tomography

3.1.4.4 *Estratégia de Busca na INSIGHT*

Dopamine AND ethanol OR alcohol AND tomography

3.1.5 Seleção dos Estudos

Após a realização das estratégias de busca os estudos foram exportados para o software Endnote com vistas a identificar os estudos duplicados e a seguir para a plataforma Covidence (www.covidence.com) para a leitura de títulos e resumos. Dois revisores, Maria Cecilia Manenti Alexandre (MCMA) e Tamy Colonetti (TC) analisaram de forma independente os títulos e os resumos dos estudos adquiridos pelas estratégias de busca. Os artigos potenciais para inclusão foram separados para

leitura na íntegra. As discordâncias foram resolvidas por um terceiro revisor, Maria Inês da Rosa (MIR), tanto para artigos em inglês como em outro idioma.

3.1.6 Extração de Dados

Os estudos que preencheram os critérios de inclusão tiveram seus dados extraídos por dois revisores, MCMA e TC. Qualquer discordância foi resolvida por um terceiro revisor (MIR), tanto para artigos em inglês como em outro idioma. A extração de dados foi realizada por meio do formulário de coleta contemplando as seguintes informações: país onde o estudo foi realizado, quantidade de participantes na população exposta e controle, sexo, tempo de consumo e de abstinência, método utilizado e resultados.

3.1.7 Análise dos Dados

Como os estudos eleitos para a revisão não trouxeram seus dados de forma quantitativa não houve a possibilidade de realização da metanálise nesta pesquisa. Os dados qualitativos em relação às populações de pacientes, idade, sexo, tempo de consumo, abstinência e média de consumo de álcool foram relatados descritivamente nos resultados.

3.1.8 Avaliação da Qualidade e Risco de Viés

Para avaliação do risco de viés dois revisores MCMA e MIR avaliaram de forma independente cada estudo selecionado usando a Escala de Avaliação de Qualidade Newcastle-Ottawa (NOS). A NOS avalia estudos observacionais com base em oito itens categorizados nos três seguintes grupos: (1) seleção dos participantes do estudo, (2) comparabilidade da população e (3) verificar se a exposição ou o resultado incluem qualquer risco de viés (ou seja, viés de seleção ou viés de perda para acompanhamento). O NOS é marcado variando de 0 a 9, e estudos com pontuações ≥ 7 são considerados de alta qualidade.

3.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

3.2.1 Animais

Foram utilizados 226 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos com aproximadamente quatro meses de idade de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo *short-fin*. Os animais foram obtidos através do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e mantidos no Laboratório de Neurologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Os animais foram mantidos em aquários de 20 litros com água dechlorada, salinizada e continuamente aerada, com o número de 30 animais por aquário. A temperatura da água foi regulada em $28,5 \pm 1^\circ \text{C}$ e os peixes foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14h/10h controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 21h), sendo que as condições físico-químicas da água foram frequentemente analisadas. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com artêmias. Todos os procedimentos com a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 010/2017-2 (ANEXO B).

3.2.2 Grupos

Os grupos foram formados a partir de uma seleção aleatória dos animais. Neste trabalho utilizou-se três grupos expostos ao etanol, sendo que a diferença entre eles foi o tempo de intervalo entre a última exposição ao etanol e os ensaios realizados. Os grupos expostos etanol foram chamados de grupo *weekly-binge*, sendo eles: grupo *weekly-binge* imediato (WB-I), grupo *weekly-binge* dois dias (WB-2) e grupo *weekly-binge* nove dias (WB-9).

Determina-se como grupo controle, para todos os ensaios, os animais que não foram expostos ao etanol em momento algum. Caracteriza-se o grupo WB-I os animais que foram testados imediatamente após a última exposição ao álcool, grupo WB-2 os animais que foram testados dois dias (48h) após à última exposição ao álcool e por fim o grupo WB-9 os animais que foram testados 9 dias após a última exposição ao etanol. Para as análises neuroquímicas (níveis de neurotransmissor e atividade enzimática) foi utilizado o número de 30 animais por cada grupo, formando um N de

seis amostras composta por um *pool* de cinco cérebros totais. Para a captação de dopamina foi utilizado um animal por n amostral (n=6).

3.2.3 Modelo de Binge Alcoólico

Foi utilizado o protocolo de exposição excessiva e intermitente ao etanol modificado de Holcombe e colaboradores (2013). Nesse modelo, os animais foram expostos ao etanol (1,4% v/v) por 30 minutos, uma vez por semana por três semanas consecutivas. No período entre as exposições ao etanol os animais permanecem no aquário habitat, sendo transferidos para o aquário experimento nos dias 1, 7 e 14. Após os experimentos, os animais foram anestesiados em solução de tricáina (160µg/mL) e posteriormente eutanasiados por decapitação para a obtenção dos cérebros para os ensaios neuroquímicos. Os animais do grupo WB-I foram eutanasiados imediatamente após o término da última exposição ao álcool, o grupo WB-2 após 48 horas e WB-9 nove dias após a última exposição, conforme a figura 4. Os animais do grupo controle foram manipulados igualmente aos grupos WB-I, WB-2 e WB-9 expostos em aquários com as mesmas dimensões. Porém, nos períodos de 1, 7 e 14 dias permanecem por 30 minutos em aquários de mesma dimensão e sem a presença de etanol. Este grupo sofreu eutanásia após 30 dias.

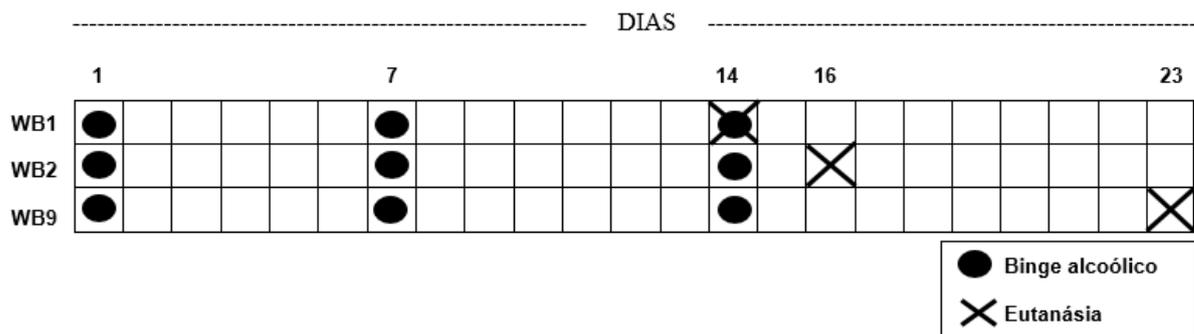


Figura 4: Protocolo experimental weekly-binge (adaptado) em peixe-zebra adulto (Holcombe et al., 2013). Os animais foram mantidos em seus aquários habitat (sem etanol) antes do experimento. Nos dias 1, 7 e 14 os animais foram transferidos para o aquário teste com etanol (1,4% v/v), onde permaneceram durante 30 minutos. Após a exposição, os animais foram transferidos para um aquário intermediário com água, a fim de eliminar o etanol no animal e evitar contaminação do aquário habitat. Os grupos weekly-binge foram determinados conforme o tempo após a terceira e última exposição ao etanol, sendo eles: grupo WB-I, o qual foi testado imediatamente após a terceira exposição; grupo WB-2, testado 48h após a última exposição e grupo WB-9 testado após 9 dias da última exposição ao etanol. Fonte: Da autora, 2018.

3.2.4 Captação de Dopamina

A metodologia empregada para a captação de dopamina foi de acordo com estudos prévios do grupo (Rico et al., 2010). Os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados, sendo que o cérebro total foi utilizado nos ensaios. As amostras foram pré-incubadas em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂ e 1.11 glicose, pH 7.2. Cada amostra foi transferida para um poço da placa de 24 poços contendo 300 µL de HBSS a temperatura ambiente onde permaneceram por 15 minutos. Posteriormente, foi retirado o meio e acrescentado 260 µL de HBSS em cada poço. O ensaio de captação foi realizado adicionando 20 µL de uma solução contendo 0,035 Ci/ml, correspondente a 10nM de [³H] Dopamina + 20 µL de uma solução contendo 0,75 nM de dopamina não marcada. As incubações foram interrompidas após 7 minutos pela lavagem da dopamina remanescente no meio de incubação seguida por duas lavagens com 1 mL de HBSS gelado. As estruturas cerebrais foram imediatamente transferidas para 0.5N NaOH e incubadas por 12 horas, resultando em uma solução homogênea. O teor de proteína foi quantificado utilizando alíquotas com 10 µL do homogeneizado seguindo o método descrito por Peterson (1977). O conteúdo intracelular de [³H] Dopamina foi determinado por cintilação e a captação específica foi calculada.

3.2.5. Parâmetros Dopaminérgicos

A atividade da MAO foi realizada por método de fluorescência, utilizando quinuramina como substrato. Os cérebros foram dissecados e foi utilizado um *pool* de 2 cérebros, os quais foram homogeneizados e incubados no meio de ensaio a 37°C por 20 minutos em uma placa preta de 96 poços. Cada poço continha 140 µL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7.4, isotônico com KCl), 8 µL de uma solução-estoque aquosa de quinuramina, correspondente a 0,75 M e 2 µL da solução da amostra. A incubação foi interrompida pela adição de 75 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M. A determinação do produto fluorescente formado na reação da MAO foi determinada nos comprimentos de onda de 315 nm (excitação) e 380 nm (emissão). A cinética de inibição foi avaliada para as 4 concentrações de substrato (5-

100 μ M) em presença e ausência de inibidores (Haraguchi et al., 2004; Van Diermen et al., 2009).

3.2.6 Condições Cromatográficas para Dosagem de Monoaminas

Para o preparo da amostra, os animais tiveram os cérebros dissecados e foi utilizado um *pool* de 3 cérebros. As amostras foram homogeneizadas em eppendorfs contendo 300 μ L de ácido perclórico 0.2M e posteriormente foram centrifugadas a 12000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi mantido em gelo por 5 minutos e seguiu para a realização da técnica de CLAE. O método cromatográfico proposto foi o De Benedetto et al. (2014) com adaptações. A separação cromatográfica foi realizada com Coluna de fase reversa, Ascentis® C18 (250 mm x 2.1 mm 5 μ m; Supelco®, USA) e sistema cromatográfico composto por uma bomba de distribuição da fase móvel LC-20AT acoplada a um autosampler SIL-20AHT e um detector de fluorescência RF-20A; Shimadzu (Kyoto, Japan), o software para aquisição de dados em cromatografia foi o LCSolution. As amostras utilizaram volume de injeção de 20 μ L, com temperatura de análise de 35 °C. A taxa de bombeamento da fase móvel foi de 0,3 mL/min. A detecção foi por fluorescência, monitorada nos comprimentos de onda de excitação em 279 nm e de emissão 320 nm. O perfil da fase móvel foi isocrático: tampão acetato (pH 3.5, ácido acético 12 mM, 0.26 mM EDTA) e metanol (86:14, v/v). Os picos foram identificados e quantificados por comparação do seu tempo de retenção na solução da amostra com a da solução padrão por meio de curva de calibração.

3.2.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental empregado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$). Para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste *post-hoc* de tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas

significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Graphpad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

Por meio da pesquisa nas bases de dados, utilizando-se as respectivas estratégias de busca, encontrou-se um total de duzentos e noventa e três (293) estudos. Após ler títulos e resumos através da plataforma Covidence, duzentos e oitenta e cinco (285) foram considerados irrelevantes, pois não preencheram os critérios de inclusão. Para leitura do texto completo, foram analisados cinquenta (50) estudos. A partir desses estudos, quarenta e um (41) artigos foram excluídos devido o desenho do estudo, população e diferentes desfechos. Nove (9) artigos foram incluídos na síntese qualitativa da revisão sistemática (Figura 5).

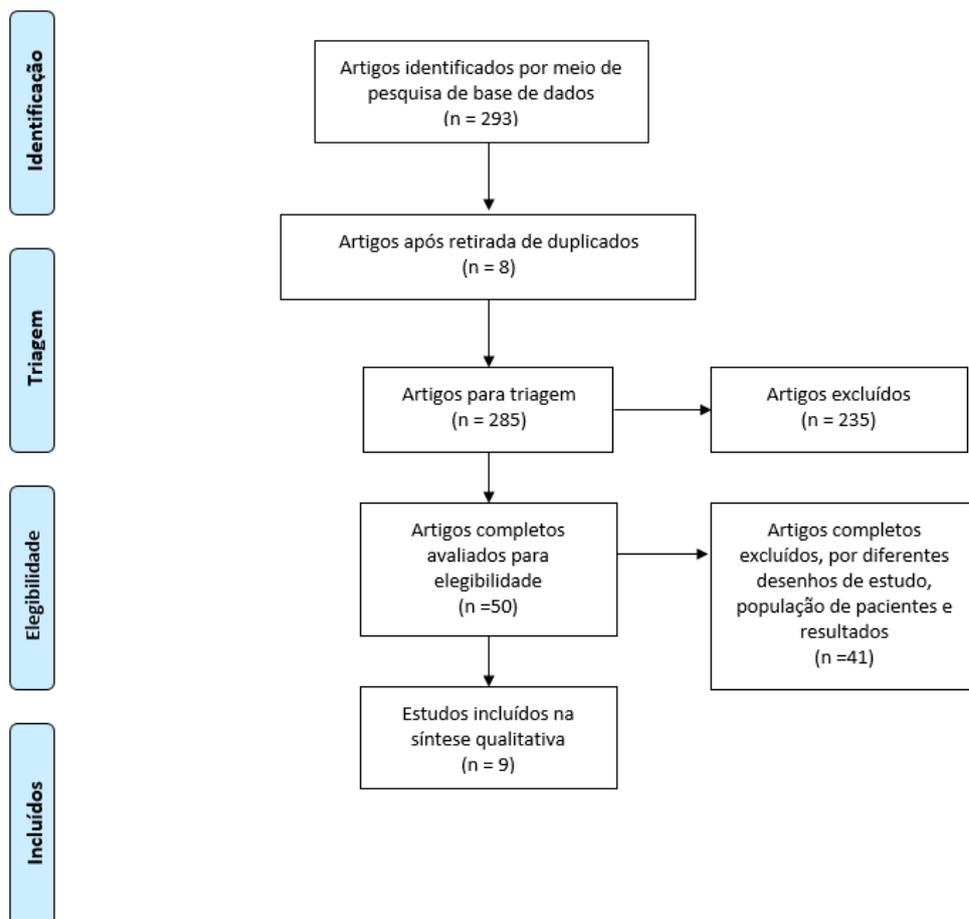


Figura 5: Fluxograma de seleção dos estudos. Fonte: Da autora, 2018.

Nove estudos primários, envolvendo 125 pacientes alcoolistas e 131 pertencentes ao grupo controle preencheram os critérios de inclusão e foram analisados. As características de todos os estudos incluídos estão resumidas na Tabela 1, enquanto a tabela 2 descreve os métodos e resultados dos estudos. Os estudos incluídos nesta revisão foram publicados entre 1994 e 2014. Todos os estudos envolveram homens e mulheres com médias de idade que variaram entre 35 ± 6 anos a $45,4\pm 7$ anos no grupo controle e 34 ± 6 anos a $47,9\pm 7$ anos no grupo álcool.

4.1.1. Risco de Viés

A quadro 2 demonstra a avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão sistemática segundo os critérios da Escala de Avaliação de Qualidade Newcastle-Ottawa (NOS) (ANEXO A) mostrados a seguir:

(1) Questões de seleção: Todos os artigos apresentaram boa fonte de seleção (a definição de caso foi adequada, bem como a representatividade dos casos foram adequadas; a seleção dos controles foi realizada na comunidade aleatoriamente e de acordo com critérios pré-definidos; e os controles não apresentavam histórico de doença).

(2) Questão de comparabilidade: Todos os artigos utilizaram exames de imagem (PET) para comparar parâmetros relacionados a dopamina em alcoólicos.

(3) Questões de exposição: Quanto a determinação da exposição, 8 dos 9 artigos realizaram um questionário/entrevista não cega para o *status* de caso-controle, enquanto apenas um artigo (Hietala; 1994), não apresentou a descrição de como foi realizada a determinação da exposição. Todos os artigos utilizaram o mesmo método de averiguação para casos e controles, além de que todos apresentaram a mesma taxa de não resposta para ambos os grupos avaliados.

Em relação a pontuação, dois estudos obtiveram 7,0 pontos (Hietala et al., 1994; Erritzoe et al., 2014), quatro estudos tiveram 7,5 pontos (Volkow et al., 1996; Volkow et al., 2007; Spreckelmeyer et al., 2011; Narendran et al., 2014) e três estudos (Heinz et al., 2004; Heinz et al., 2005; Martinez et al., 2005) alcançaram 8,0 pontos. Segundo a pontuação do NOS, nossa revisão sistemática apresentou alta qualidade (≥ 7)

Estudo	País	Idade		Sexo		N	
		Controle	Álcool	Controle	Álcool	Controle	Álcool
Martinez et al., 2005	EUA	35± 6 anos	34± 6 anos	12M/3F	13M/2F	15	15
Volkow et al., 1996	EUA	47±16 anos	44±10 anos	15M/2F	9M/1F	17	10
Hietala et al., 1994	Finlândia	36,3±6,7 anos	36,9±6,4 anos	8M	9M	8	9
Heinz et al., 2005	Alemanha	43,2±9,5 anos	42,5±7,5 anos	13M	12M	13	12
Heinz et al., 2004	Alemanha	43,2±9,5 anos	44,5±6,5 anos	13M	11M	13	11
Spreckelmeyer et al., 2011	Alemanha	45,4±7 anos	47,9±7 anos	11M	11M	11	11
Erritzoe et al., 2014	Inglaterra	41,5±10,3 anos	42,4±9,4 anos	13M	16M	13	16
Narendran et al., 2014	EUA	28±4 anos	28±5 anos	16M/5F	16M/5F	21	21
Volkow et al., 2007	EUA	41±6 anos	41±6 anos	20M	20M	20	20

Tabela 1: Características dos estudos incluídos
 Abreviaturas: M= Masculino; F= Feminino

Estudo	Tempo de consumo	Tempo de abstinência	Média de consumo	Método	Achados
Martinez et al., 2005	18 ±7 anos	3 semanas	20±8/dia 18±7/ano	PET e [¹¹ C] racloprida (radioligante do receptor D2) no <i>baseline</i> e após anfetamina (0,3 mg / kg, por via intravenosa)	Redução na disponibilidade do receptor D2 no estriado (límbico, associativo e sensorio-motor). Diminuição da liberação de dopamina no estriado límbico
Volkow et al., 1996	24±7 anos	5 dias	-	PET e [¹¹ C] racloprida (radioligante do receptor D2) + [¹¹ C] d-treo metilfenidato (antagonista dos DATs)	Redução na disponibilidade do receptor D2 no estriado
Hietala et al., 1994	6 anos (mínimo)	1 semana abstinência	etanol puro 300g (variação de 120-480g) por dia	PET e [¹¹ C] racloprida (radioligante do receptor D2) com dose de 3,0 mCi I.V.	Redução na disponibilidade do receptor D2 no estriado
Heinz et al., 2005	-	36 dias (apenas 5 permaneceram)	-	PET e [¹⁸ F] desmetoxifaliprida (radioligante do receptor D2) + carbidopa (2,5 mg/kg)	Baixos níveis de capacidade de síntese de dopamina no putâmen
Heinz et al., 2004	-	2-4 semanas abstinência	-	PET e [¹⁸ F] desmetoxifaliprida (radioligante do receptor D2)	Redução na disponibilidade do receptor D2 no estriado ventral (NAc) e putâmen
Spreckelmeyer et al., 2011	-	Entre 8 e 48 dias (média de 32/36 dias)	8,2±2 drinks/dia casos; 3,6±3 drinks/dia controles	PET e [¹⁸ F] faliprida (radioligante do receptor D2/D3) no <i>baseline</i> e 2 semanas após adm de Remifentanil (agonista MOR)	Redução da disponibilidade do receptor D2/D3 no estriado ventral, putâmen e amígdala
Erritzoe et al., 2014	26,4±9,5 anos de abuso de álcool	4 semanas abstinência	348±131 unidade/semana casos; 9,8±7,6 unidade/semana controle	PET e [¹¹ C] PHNO (radioligante do receptor D3), com um o GSK598809 60 mg (antagonista seletivo de D3)	Redução na disponibilidade do receptor D3 após a dose de GSK598809

Narendran et al., 2014	11±6 anos de abuso de álcool	14 dias abstinentes	13±5 drinks/dia	PET e [¹¹ C]FLB 457 (radioligante do receptor D2/D3) + anfetamina	Menor disponibilidade de receptores D2/D3 Diminuição da transmissão de dopamina no córtex.
Volkow et al., 2007	23±8 anos de abuso de álcool	79±38 dias abstinentes	16 cervejas por dia	PET e [¹¹ C] racloprida (radioligante do receptor D2) + [¹¹ C] d-treo metilfenidato (antagonista dos DATs)	Redução na Disponibilidade do receptor D2/D3 no estriado ventral Diminuição da liberação de dopamina no estriado ventral e putâmen

Tabela 2: Métodos e resultados dos estudos incluídos

Abreviaturas: D2 = Receptores de dopamina tipo 2; D3 = Receptores de dopamina tipo 3; DATs = Transportadores de dopamina; MOR= Ácido γ-aminobutírico; PET = Tomografia por emissão de pósitrons.

Autor; ano	Seleção				Comparabilidade	Exposição		
	1	2	3	4		1	2	3
Erritzoe et al., 2014	A	A	A	A	A (Avaliar os receptores D3 cerebrais de Dopamina por meio de exames de imagem)	C	A	A
Volkow et al., 2007	A	A	A	A	A (Verificar a diminuição nos receptores de Dopamina em alcoólicos, mas não nos transportadores de Dopamina por meio de exames de imagem)	C	A	A
Spreckelmeyer et al., 2011	A	A	A	A	A (Verificar a disponibilidade de receptores D2 e D3 em dependentes alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A
Heinz et al., 2004	A	A	A	A	A (Verificar a correlação dos receptores de Dopamina em alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A
Heinz et al., 2005	A	A	A	A	A (Comparar a capacidade de síntese de Dopamina no corpo estriado em alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A
Hietala et al., 1994	A	A	A	A	A (Verificar a ligação de Dopamina ao receptor dopaminérgico D2 em alcoólicos por meio de exames de imagem)	E	A	A
Martinez et al., 2005	A	A	A	A	A (Medir os receptores D2 e a transmissão de Dopamina em alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A
Volkow et al., 1996	A	A	A	A	A (Verificar a diminuição nos Receptores de Dopamina, mas não nos transportadores de Dopamina em alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A
Narendran et al., 2014	A	A	A	A	A (Verificar se transmissão de dopamina cortical pré-frontal está diminuída em alcoólicos por meio de exames de imagem)	C	A	A

Quadro 1. Avaliação da qualidade dos estudos incluídos.

Fonte: Da autora, 2018.

4.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM PEIXE-ZEBRA

Inicialmente, foram avaliados os níveis de dopamina em cérebro de peixes-zebra expostos intermitentemente ao etanol. Verificou-se um aumento nos níveis de dopamina nos grupos WB-2 e WB-9 ($F_{(3,16)} = 12.63$; $p=0,0002$) em relação ao controle. Já em relação aos níveis de noradrenalina, não houve diferença significativa ($F_{(3,19)} = 0.1750$; $p=0,9120$) (Figura 5).

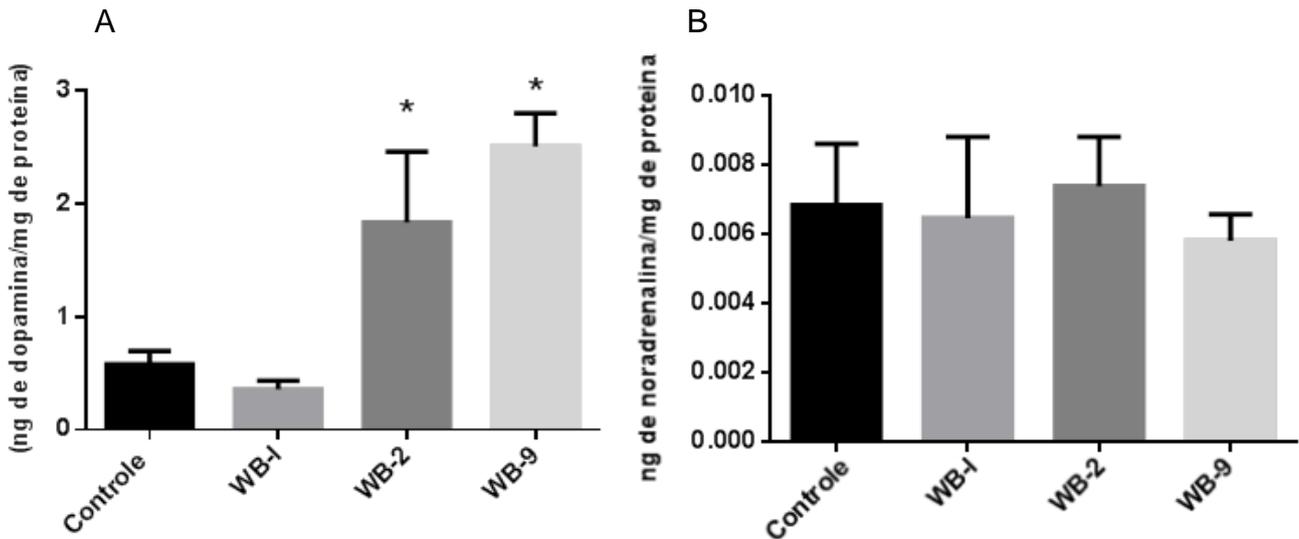


Figura 6: Efeito do modelo de binge alcoólico sobre os níveis de dopamina (A) e noradrenalina (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores estão expressos em ng de dopamina/mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Post-hoc de Tukey)

Considerando que a enzima MAO é responsável pela degradação da dopamina no seu metabólito foi avaliada sua atividade. Os resultados mostraram que a atividade da enzima MAO diminuiu nos grupos WB-2 e WB-9 ($F_{(3,28)} = 6.122$; $p = 0,0025$) em relação ao controle.

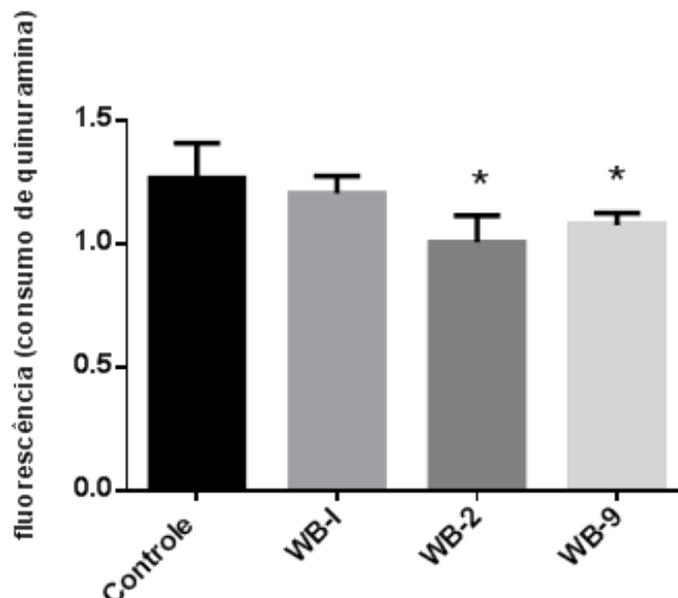


Figura 7: Efeito do modelo do binge alcoólico sobre a atividade da enzima monoaminaoxidase em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores estão expressos em fluorescência (consumo de quinuramina). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Post-hoc de Tukey)

Sabe-se que a transmissão dopaminérgica é inativada pela sua recaptação através dos DATs. Inicialmente foi avaliada a funcionalidade dos DATs utilizando Bupropiona, visto que é um inibidor clássico destes transportadores, e foi utilizado como controle positivo na concentração de 100 μm . O próximo passo foi investigar a funcionalidade desses receptores sobre cérebro de peixes-zebra expostos intermitentemente ao etanol. Foi observado um aumento na função dos DATs nos grupos WB-1 e WB-2 ($F_{(3,21)} = 45.42$; $p < 0,0001$) em relação ao controle.

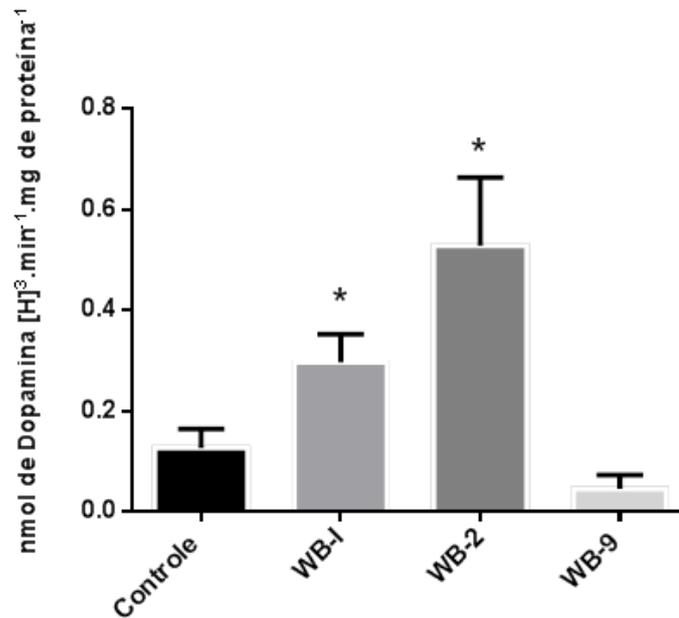


Figura 8: Efeito do modelo do binge alcoólico sobre a funcionalidade dos receptores de dopamina em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores estão expressos em nmol de dopamina [H]³. min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (consumo de quinuramina). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Post-hoc de Tukey)

5 DISCUSSÃO

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

A avaliação da neurotransmissão dopaminérgica pode ser realizada por meio de exames de imagem, através de técnicas de *scan* e rastreamento, como a PET. Muitos traçadores de PET são compostos que se ligam reversivelmente a uma proteína neuronal, tal como um receptor ou um transportador. O [¹¹C]racloprida é o radioligante mais comumente utilizado neste exame para avaliar de alterações na dopamina estriatal endógena devido sua afinidade para os receptores D2/D3, sensível a ambos aumento e diminuição na concentração de dopamina (Thanos et al., 2008; Yoder et al., 2011; Takano et al., 2016).

A presente revisão sistemática demonstrou que quatro estudos obtiveram como resultado a redução na disponibilidade apenas no receptor D2 em diferentes regiões cerebrais (Hietala et al., 1994; Volkow et al., 1996; Heinz et al., 2004; Martinez et al., 2005). Quatro estudos relataram diminuição em ambos receptores (Heinz et al., 2005; Volkow et al., 2007; Spreckelmeyer et al., 2011; Narendran et al., 2014) e em relação ao receptor D3 isoladamente apenas um estudo relatou esse achado (Erritzoe et al., 2014).

O estudo realizado por Martinez e colaboradores (2005) incluiu 15 indivíduos controles com idade média de 35±6 anos e 15 indivíduos dependentes de álcool com 34±6 anos, os quais eram consumidores em média de 18±7 anos. Os pacientes alcoolistas foram submetidos a três semanas de internação, com três a cinco dias de desintoxicação com clordiazepóxido. Neste estudo foi utilizado PET e o radioligante do receptor D2, [¹¹C]racloprida, a fim de avaliar a disponibilidade do receptor D2 no *baseline* e em seguida com uma injeção via intravenosa de anfetamina (0,3 mg/kg) para mensurar alterações na função pré-sináptica. Foi observado que a disponibilidade do receptor D2 está diminuída nas subdivisões do estriado (estriado límbico, associativo e sensorio-motor) em alcoolistas recentemente desintoxicados em comparação com indivíduos controle.

Esses resultados corroboram com estudos anteriores que sugerem redução de 15% a 20% na disponibilidade do receptor D2 na dependência de álcool e mostram que essa redução envolve estruturas cerebrais como o estriado e área tegmental ventral (ATV) (Hietala et al., 1994; Volkow et al., 1996). Diminuições na

disponibilidade do receptor D2 foram demonstradas em estudos PET de outros comportamentos de dependência química, como heroína, dependência de cocaína, abuso de metanfetamina até mesmo obesidade, sugerindo que este achado não é específico para uma única substância de abuso. As vias dopaminérgicas estão relacionadas também a sistemas de recompensa, justificando esses mecanismos de dependência (Wang et al., 2001; Baldaçara et al., 2011).

Após o desafio com anfetamina, os indivíduos alcoolistas mostraram uma diminuição da liberação de dopamina induzida por anfetamina apenas no corpo estriado límbico. Porém, este resultado é controverso visto que o estudo de Tiihonen et al (1998) sugere que os alcoolistas deveriam ter uma função aumentada da dopamina pré-sináptica em vez de uma diminuição.

Heinz e colaboradores (2004) também relataram uma diminuição na disponibilidade do receptor D2 no estriado ventral (que inclui o NAc) e putâmen. Este estudo foi realizado com 13 controles, com idade de $43,2 \pm 9,5$ anos e um grupo com 11 participantes alcoolistas, idade de $44,5 \pm 6,5$ anos, os quais se abstiveram de álcool em um programa de tratamento supervisionado de internação por 2 a 4 semanas. A severidade da compulsão alcoólica foi avaliada com o *Alcohol Craving Questionnaire* (ACQ). Foi realizada a PET utilizando $[^{18}\text{F}]$ desmetoxifaliprida ($[^{18}\text{F}]$ DMFP) como radioligante, o qual se liga com alta afinidade aos receptores D2. O estudo testou a hipótese de Robinson e Berridge (1993) a qual acredita-se que os alcoolistas exibem menos receptores D2 no estriado ventral e que o desejo pelo álcool é inversamente relacionado à disponibilidade de receptores D2. É sugerida a teoria de que a disfunção da dopamina no NAc, área central do sistema de recompensa do cérebro, está associada ao desejo por álcool avaliado através do ACQ. Nos alcoolistas, a maior gravidade do desejo pelo álcool associou-se significativamente e exclusivamente à baixa disponibilidade de receptores D2 no estriado ventral e putâmen (Heinz et al., 2004).

Volkow et al. (1996) avaliaram os receptores D2 em 10 alcoolistas (44 ± 10 anos) com um histórico em média de 24 ± 7 anos de abuso de álcool e 17 controles (47 ± 16 anos) saudáveis pareados usando dois radioligantes diferentes, $[^{11}\text{C}]$ racloprida para avaliar os receptores D2 e $[^{11}\text{C}]$ d-treo metilfenidato para mensurar os DATs. Todos os sujeitos foram examinados com $[^{11}\text{C}]$ racloprida e além disso, 5 dos alcoolistas e 16 dos controles foram submetidos a um segundo exame com $[^{11}\text{C}]$ d-treo metilfenidato dentro de uma semana. As medidas dos receptores D2 com PET refletem principalmente os receptores pós-sinápticos, já os DATs expressam o

elemento pré-sináptico, isto é, o próprio neurônio dopaminérgico. A disponibilidade de receptores de dopamina D2 foi significativamente menor no estriado de alcoolistas do que em controles e isso foi correlacionado com a idade superior a 40 anos. Em relação a disponibilidade dos DATs não houve mudanças significativas.

Diminuições nos receptores D2, em princípio, resultariam em uma atenuação do sinal dopaminérgico. Isso poderia fornecer uma explicação para a maior frequência de discinesia em alcoolistas do que em não-alcoolistas, bem como a maior sensibilidade a antagonistas dopaminérgicos em alcoolistas. A interpretação das alterações em D2 difere em relação aos DATs porque as diminuições nos receptores D2 resultam principalmente das alterações que ocorrem nos neurônios GABAérgicos do estriado, enquanto os DATs refletem as células dopaminérgicas. Então, a redução dos receptores D2 pode envolver de células GABAérgicas nas anormalidades dopaminérgicas em alcoolistas (Xiao e Ye, 2008; Spreckelmeyer et al., 2011).

As características do receptor de dopamina D2 no estriado de nove pacientes do sexo masculino (idade de $36,9 \pm 6,4$ anos) com dependência ao álcool abstinentes por uma a 68 semanas e oito voluntários do sexo masculino saudáveis ($36,9 \pm 6,7$ anos) foram estudados *in vivo* com PET (Hietala et al., 1994). [^{11}C]racloprida foi utilizado com dose de 3,0 mCi intravenosa para quantificar a disponibilidade do receptor D2. Os indivíduos alcoolistas abstinentes possuíam uma história de dependência de álcool por pelo menos 6 anos (variação de 6-16 anos) com um consumo médio diário de etanol puro de 300g. A disponibilidade do receptor D2 foi significativamente menor no estriado de alcoolistas do que nos controles e isto é compatível com uma reduzida acessibilidade da [^{11}C]racloprida para os receptores D2. Uma explicação teórica para esta baixa relação nos alcoolistas é que há níveis aumentados de dopamina estriatal estariam competindo com o radioligante [^{11}C]racloprida para se ligar aos receptores D2 (Hietala et al., 1994; Ginovart, 2005; Thanos et al., 2008). Apesar de não haver correlação estatisticamente significante entre idade e os parâmetros de ligação do receptor D2, foi encontrada uma tendência de diminuição da disponibilidade dos receptores D2 com o aumento da idade em alcoolistas corroborando com o estudo de Volkow et al. (1996). (Hietala et al., 1994).

O álcool, como as outras drogas de abuso, estimula a liberação de dopamina e induz a uma regulação negativa dos receptores dopaminérgicos D2 no estriado e esses efeitos mostram-se mais proeminente após a desintoxicação e demonstram uma recuperação durante o período de abstinência (Volkow et al., 1996).

Sugere-se que um mecanismo potencial pelo qual níveis persistentemente baixos de receptores D2 no corpo estriado ventral podem contribuir para o uso excessivo de álcool e motivação para recaída (Haber et al., 2000; Fiorillo et al., 2003; Yoder et al., 2011).

Para explorar ainda mais a interação entre a produção pré-sináptica de dopamina estriatal e a disponibilidade do receptor dopaminérgico D2/D3 em pacientes alcoolistas desintoxicados, Heinz et al. (2005) mensuraram a captação de substrato DOPA descarboxilase, um índice de capacidade de síntese de dopamina, nos mesmos pacientes alcoolistas e indivíduos controles, que também foram submetidos à avaliação dos receptores dopaminérgicos D2/D3 com [¹⁸F] desmetoxifalida ([¹⁸F] DOPA) (Heinz et al., 2004). A gravidade do desejo de álcool foi medida pelo ACQ na manhã antes dos indivíduos serem submetidos a imagem cerebral. O exame PET foi utilizado para mapear a [¹⁸F] DOPA a fim de revelar a capacidade de síntese de dopamina no cérebro *in vivo* calculando a depuração líquida sangue-cérebro. Todos os indivíduos receberam carbidopa (2,5 mg/kg) por via oral 60 minutos antes da pesquisa para bloquear a atividade da DOPA descarboxilase extracerebral. Cinco pacientes alcoolistas permaneceram abstinentes e sete recaíram durante o período de acompanhamento de seis meses (Heinz et al., 2005)

A magnitude da depuração líquida sangue-cérebro em pacientes alcoolistas relacionou baixos níveis de capacidade de síntese de dopamina no putâmen com altos níveis de desejo por álcool, associado ao risco de recaída (Heinz et al., 2005). Como relatado anteriormente por Heinz et al. (2004), a disponibilidade de receptores dopaminérgicos D2/3 foi significativamente menor nos pacientes alcoolistas do que nos indivíduos saudáveis.

Acredita-se que o uso crônico de drogas resulte em mudanças adaptativas em regiões (circuitos) moduladas por dopamina que fundamentam a neurobiologia da dependência (Nestler, 2004). Entre estes, o córtex pré-frontal é cada vez mais reconhecido como desempenhando um papel central no vício. A dopamina cortical pré-frontal modula as funções executivas, como atenção, memória de trabalho e tomada de decisão de risco/recompensa - todas as quais são prejudicadas no alcoolismo (Bickel et al., 2012). Diante disso, Volkow et al. (2007) testaram a hipótese de que o córtex pré-frontal regula o valor das recompensas modulando os aumentos de dopamina no NAc e que essa regulação é interrompida em indivíduos alcoolistas. Utilizou-se a PET para avaliar a atividade do córtex pré-frontal (medindo o

metabolismo da glicose cerebral com [¹⁸F] fluorodesoxiglicose) e aumentos de dopamina (medidos com [¹¹C] racloprida) induzidos antes e após a administração intravenosa da droga estimulante metilfenidato (0,5 mg/kg) em 20 controles e 20 alcoolistas desintoxicados, ambos com idade de 41±6 anos.

Em todos os indivíduos, o metilfenidato aumentou significativamente a dopamina no estriado. Como o metilfenidato é um bloqueador dos DATs, as alterações na dopamina refletem a sua liberação. Os aumentos de dopamina foram associados aos efeitos do metilfenidato e foram profundamente atenuados em alcoolistas, sugerindo que os alcoolistas têm menor liberação de dopamina que os controles. As diminuições foram mais acentuadas no estriado ventral, o que corrobora com achados anteriores de redução de dopamina após anfetamina em alcoolistas (Martinez et al., 2005). Também foi observada a redução da disponibilidade dos receptores D2/D3 receptores no estriado ventral nos alcoolistas.

Isso sugere que, em alcoolistas, a regulação da atividade das células dopaminérgicas por eferentes pré-frontais é interrompida e que sua atividade reduzida de células dopaminérgicas pode representar perda de regulação pré-frontal das vias mesolímbicas. Uma das principais contribuições para as células dopaminérgicas na ATV são os eferentes glutamatérgicos do córtex pré-frontal e há evidências crescentes de que eles desempenham um papel importante no vício (Kalivas e Volkow, 2005; Homayoun e Moghaddam, 2006; Volkow et al., 2007).

Em seres humanos utilizando o PET, o [¹¹C] racloprida após um teste de anfetamina aguda (ou metilfenidato) foi validado como uma medida não invasiva da alteração na indução da concentração de dopamina extracelular. Utilizando essa abordagem, dois estudos relataram diminuição da neurotransmissão de dopamina no estriado em indivíduos dependentes de álcool em comparação com os controles (Volkow et al., 1996; Martinez et al., 2005). Uma limitação desses estudos foi que as medidas de transmissão de dopamina estavam restritas ao estriado e suas subdivisões. Tais estudos limitaram-se a esta área, porque o [¹¹C] raclopride não fornece razão “sinal-ruído/resposta” suficiente para quantificar os receptores D2/D3 em áreas extrastriatais, como o córtex, onde a concentração de receptores D2/D3 é menor que no estriado. Assim, nenhum estudo anterior relatou o status *in vivo* da dopamina no córtex pré-frontal no alcoolismo.

Com base nisso, Narendran et al. (2014) utilizaram PET e o radioligante de alta afinidade [¹¹C] FLB 457 para medir a neurotransmissão de dopamina cortical

induzida por anfetaminas em um grupo de 21 alcoolistas recentemente abstinentes e 21 controles saudáveis pareados. Os indivíduos foram submetidos a um PET inicial e pós-anfetamina [^{11}C] FLB 457 na mesma sessão experimental. No *baseline*, os indivíduos receberam uma injeção intravenosa *in bolus* de [^{11}C] FLB 457 restrita a 0,6 μg . A varredura pós-anfetamina [^{11}C] FLB 457 foi realizada 3 horas após a administração de 0,5 mg/kg $^{-1}$ de anfetamina oral. Foi encontrado um menor deslocamento de [^{11}C] FLB 457 no córtex após administração de anfetamina em alcoolistas recentemente abstinentes em comparação com controles saudáveis, ou seja, uma menor disponibilidade de receptores D2/D3 em alcoolistas abstinentes. Em um estudo anterior utilizando PET e microdiálise, foi demonstrado que o deslocamento de 1% de [^{11}C] FLB 457 no córtex corresponde a um aumento de 57% na concentração de dopamina extracelular (Koob, 2013; Narendran et al., 2013). Isto sugere que a dopamina cortical em controles saudáveis e indivíduos dependentes de álcool aumenta em 513-798% e 0-228%, respectivamente, após a mesma dose de anfetamina. Este resultado, pela primeira vez, demonstrou que há diminuição da transmissão de dopamina no córtex no alcoolismo.

A redução da transmissão de dopamina nas regiões mesolímbicas, como o estriado ventral e o lobo temporal, contribui para a anedonia, a ausência de motivação e a diminuição da sensibilidade à recompensa na dependência de álcool. O fato de que há também menos dopamina no córtex pré-frontal, o qual governa as funções executivas, pode prejudicar a capacidade do adicto em aprender e utilizar estratégias informacionais/comportamentais críticas para a prevenção da recaída. Isso é apoiado pela literatura que vincula a dopamina cortical pré-frontal a funções que estão comprometidas em transtornos aditivos (Floresco et al., 2006; Bickel et al., 2012).

Evidências apontam que os efeitos reforçadores do álcool podem ser mediados pela interação entre os sistemas opióide e dopaminérgico do cérebro. Especificamente, a liberação de β -endorfinas induzida pelo álcool, estimula os receptores μ -opióides (MORs), que, acredita-se, causar liberação de dopamina no sistema de recompensa do cérebro (Hagelberg et al., 2002; Daglish et al., 2008). Spreckelmeyer et al. (2011) realizaram um estudo administrando uma dose única do remifentanil (0,3g/kg) que é um agonista MOR, em 11 pacientes dependentes de álcool (47,9 \pm 7 anos) desintoxicados por oito semanas em média e em 11 controles saudáveis (45,4 \pm 7 anos) para mimetizar as propriedades de liberação de endorfinas do etanol e para avaliar os efeitos da estimulação direta da MOR na liberação de

dopamina. A disponibilidade de receptores D2/D3 foi avaliada no *baseline* e duas semanas após a administração da dose única de remifentanil nos dois grupos através de tomografia por emissão de pósitrons com o radioligante [¹⁸F] faliprida. A gravidade da dependência de álcool foi avaliada com o *Alcohol Use Disorders Identification Test* (AUDIT). Obteve-se a redução da disponibilidade dos receptores dopaminérgicos D2/D3 após a administração do remifentanil em comparação com os valores basais no estriado ventral (9,5%), no putâmen (8,3%) e na amígdala (12,5%). No grupo dos alcoolistas, a diminuição relativa na disponibilidade do receptor D2/D3 foi associada à gravidade do consumo.

Este achado indica que a sensibilidade da via da dopamina e opioide à estimulação MOR não é igualmente pronunciada entre indivíduos dependentes de álcool. Pelo contrário, parece haver uma associação entre a resposta de dopamina mediada por MOR e a gravidade do abuso de álcool. Isto é baseado em relatos que o bloqueio MOR com o antagonista naltrexona, usado com sucesso como tratamento para reduzir as taxas de *craving* e recaída em dependentes de álcool e opiáceos, é desigualmente eficaz e difere na gravidade dos efeitos colaterais em diferentes indivíduos. No presente estudo, não foi avaliada a disponibilidade de MOR diretamente. Pode-se sugerir que a estimulação direta de MORs aumenta a liberação de dopamina no sistema de recompensa cerebral, fornecendo evidências importantes para o controle mediado pela MOR na via da dopamina mesolímbica (Hagelberg et al., 2002; Barr et al., 2007).

Evidências de estudos com animais sustentam evidências do papel do receptor D3 no reforço ou na preferência pelo álcool, sugerindo que o antagonismo seletivo de D3 reduz a preferência e o consumo de etanol em ratos (Thanos et al., 2005) e reduz o número de quantidade de álcool consumido em roedores (Andreoli et al., 2003). Apenas um estudo (Erritzoe et al., 2014) relatou o envolvimento do receptor D3 isoladamente. A disponibilidade de D3 cerebral foi comparada entre 16 pacientes dependentes de álcool (42,4 ± 9,4 anos) abstinentes por quatro semanas e 13 homens controles (41,5 ± 10,3 anos) pareados por idade utilizando PET e o radioligante agonista de D3, [¹¹C] PHNO antes e após o antagonista seletivo de D3, o GSK598809 (60 mg) via oral. A ligação basal de [¹¹C] PHNO foi maior em pacientes dependentes de álcool no hipotálamo (região na qual o [¹¹C] PHNO reflete quase inteiramente a disponibilidade de D3) e após a dose de GSK598809 houve uma diminuição na ligação do receptor.

Uma revisão de literatura de Martinez et al. (2007) avaliou os radioligantes antagonistas de D2/D3 [^{11}C] racloprida, (^{18}F) DOPA, [^{123}I] IBZM e [^{123}I] epideprida no alcoolismo e relataram consistentemente menor (7–22%) disponibilidade de D2/D3 no estriado dos pacientes em comparação com os controles. Erritzoe et al. (2014) não encontraram nenhuma diferença na ligação de [^{11}C] PHNO no estriado entre alcoolistas abstinente e controles com ou sem bloqueio de D3. A hipótese de um aumento global no D3 na dependência alcoólica abstinente não foi confirmada, embora a ligação aumentada de D3 tenha sido detectada no hipotálamo, uma região envolvida no controle da neurotransmissão de opióides, o qual é um modulador chave da via mesolímbica dopaminérgica (Rominger et al., 2012).

Devido às limitações éticas e metodológicas do exame PET, as alterações do sistema dopaminérgico frente ao alcoolismo ainda carecem de informações, já que não é possível obter todos os parâmetros necessários para intervenções terapêuticas. Através da técnica, a neurotransmissão dopaminérgica e suas alterações são observadas; porém, o exame só é capaz de inferir níveis de dopamina endógenas a partir da ligação de um radioligante aos receptores D2/D3. Diante desse contexto, os artigos da revisão sistemática englobaram diferentes subtipos de pacientes alcoolistas (abstinentes, desintoxicados, crônicos), constituindo uma população heterogênea. Para complementar este trabalho, a segunda estratégia foi realizar um estudo pré-clínico em um modelo animal de peixe-zebra, a fim de avaliar diretamente mecanismos dopaminérgicos induzidos pelo binge, um padrão de consumo de álcool relevante na atualidade.

5.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM PEIXE-ZEBRA

Neste estudo avaliou-se o sistema dopaminérgico e como este é susceptível aos efeitos do binge alcoólico no modelo experimental de peixe-zebra, além de parâmetros avaliados acima numa revisão sistemática.

O consumo de bebidas alcoólicas é um hábito comum, porém o seu abuso pode resultar em um número de problemas que incluem distúrbios de memória, doença hepática, pressão arterial alta, fraqueza muscular, problemas cardíacos, distúrbios do sistema digestivo e problemas pancreáticos. No entanto, a atenção recente da mídia tem sido direcionada ao binge alcoólico na geração mais jovem, 15-21 anos, onde as alterações neuroquímicas precoces associadas ao dano cerebral

são evidentes, particularmente na região corticolímbica e ocorrem após um período relativamente curto de tal abuso de álcool (Ward et al., 2009; Wen et al., 2012). Isto conduz a diferenças no humor e desempenho cognitivo, alterações na memória, um risco aumentado de demência bem como a susceptibilidade para o desenvolvimento de alcoolismo crônico (Hoepfner et al., 2012; Holcombe et al., 2013).

As mudanças neuroquímicas subjacentes no binge podem ser mediadas por um desequilíbrio entre os aminoácidos inibitórios e excitatórios e/ou alterações na liberação de monoaminas, o que poderia levar ao comportamento excessivo de beber. O sistema mesolímbico dopaminérgico desempenha um papel significativo nos mecanismos motivacionais e de reforço relacionados ao comportamento. O álcool aumenta a transmissão dopaminérgica, aumentando a taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos levando a liberação de dopamina. Além da via mesolímbica, outras áreas também são susceptíveis ao binge alcoólico, dentre elas regiões piramidais do córtex pré-frontal que prejudicam a extinção das respostas associadas ao medo através de alterações morfológicas prejudicando a plasticidade sináptica pré-frontal (Holmes et al., 2012; Ji et al., 2017).

O consumo em binge foi estudado em roedores (Collins e Neafsey, 2012; George et al., 2012; Kroener et al., 2012; Maynard e Leasure, 2013; Duncan et al., 2016; Ji et al., 2017), humanos (Beets et al., 2009; Hoepfner et al., 2012) e em peixe-zebra (Holcombe et al., 2013) porém nenhum avaliou o sistema dopaminérgico frente a este padrão de consumo. No estudo de Holcombe et al. (2013) foi desenvolvido o protocolo de exposição intermitente ao etanol (*binge drinking*) em peixe-zebra, porém os autores avaliaram apenas parâmetros comportamentais. Considerando a importância do sistema dopaminérgico no consumo do álcool em binge, este trabalho mostrou pela primeira vez alterações dopaminérgicas em um modelo experimental de peixe-zebra que mimetiza tal consumo. Para tanto foi avaliado os níveis de dopamina totais, a enzima responsável pela sua degradação, a MAO e os DATs.

No presente estudo, foram avaliados os níveis de dopamina e noradrenalina totais em cérebro de peixes-zebra expostos intermitentemente ao etanol. Foi encontrado um aumento dos níveis de dopamina nos grupos WB-2 (analisado dois dias após a última exposição) e WB-9 (analisado nove dias após) em relação ao grupo controle, já em relação aos níveis noradrenalina não houve diferença significativa. Estes achados evidenciam que há alterações nos níveis de dopamina

durante o período de retirada do álcool e é um fator importante a ser estudado neste modelo de exposição.

Resultados encontrados na literatura têm demonstrado aumento nos níveis de dopamina no cérebro de peixes-zebra expostos ao etanol na concentração aguda de 1,00% durante 60 minutos (Chatterjee e Gerlai, 2009; Gerlai et al., 2009; Chatterjee et al., 2014; Tran et al., 2016). Dois desses estudos (Chatterjee et al., 2014; Gerlai et al., 2009) avaliaram concomitante o consumo crônico em peixes-zebras pré-tratados com álcool (0,00% ou 0,50%) seguidos por diferentes concentrações agudas 0,00%, 0,50% ou 1,00%. Os peixes pré-tratados com água doce e expostos ao álcool a 0,50% apresentaram maiores níveis de dopamina quando comparados àqueles que foram pré-expostos ao álcool crônico e submetidos a mesma concentração de álcool (0,50%) agudamente. A adaptação ao álcool devido ao pré-tratamento crônico também é demonstrada pelo efeito atenuado da concentração aguda mais alta (1,0%) de álcool no neurotransmissor.

Visto que neste estudo foram avaliados parâmetros dopaminérgicos, estes podem ser relacionados com outros modelos experimentais, como o de roedores. Foi observado que a administração crônica de álcool em ratos prejudica a síntese de dopamina, reduz as concentrações de dopamina extracelular e reduz a sensibilidade dos receptores de dopamina, resultando em uma neuroadaptação (Diana et al. 1996; Rossetti et al. 1992). Com o consumo crônico de álcool, as neuroadaptações desenvolvem-se para se opor aos efeitos agudos do álcool e restabelecer a função celular neuronal normal. Essas neuroadaptações levam à tolerância ao álcool, ou seja, uma sensibilidade diminuída aos efeitos do álcool e dependência física evidenciada pela síndrome de abstinência aguda após a cessação do consumo de álcool (Tambour e Quertemont, 2007).

Hirth et al. (2016) realizou um estudo analisando o sistema dopaminérgico em ratos expostos cronicamente ao álcool e revelou um estado hiperdopaminérgico na abstinência a longo prazo. Os ratos foram expostos intermitentemente ao vapor de etanol durante 7 semanas e foram mortos imediatamente após o último ciclo de exposição (no dia 0) ou após 1, 3, 7 ou 21 dias de privação. Esta análise revelou um aumento na liberação de dopamina no dia 0, seguido por uma diminuição de 30% das concentrações basais nos primeiros 6 dias de retirada (estado hipodopaminérgico). Entretanto, nos dias 7 a 21 observou-se novamente um aumento de dopamina, gerando um estado hiperdopaminérgico. Este estudo sugere que mudanças

dinâmicas nos níveis de dopamina ocorrem durante a privação e/ou retirada com um estado hipodopaminérgico durante a abstinência aguda, seguido de um estado hiperdopaminérgico posteriormente.

Em relação a enzima MAO, encontrou-se uma redução da sua atividade nos grupos WB-2 e WB-9 em relação ao grupo controle. Na literatura, não há estudos avaliando a atividade desta enzima frente ao binge alcoólico em peixe-zebra. Sugere-se que este achado complementa o resultado dos níveis de dopamina descritos neste estudo, já que os níveis de dopamina estão elevados nos grupos WB-2 e WB-9 e a MAO encontra-se diminuída nestas condições, pois esta enzima é responsável pela degradação da dopamina. Supõe-se uma relação de causalidade que devido a atividade da MAO estar reduzida, os níveis de dopamina estariam elevados.

Na literatura, o único estudo em peixe-zebra que avalia a atividade da MAO frente ao álcool é o de Chatterjee et al. (2014) os quais os peixes foram submetidos a concentrações agudas crescentes de álcool (0,0%, 0,5% e 1,0%) e encontrou-se uma diminuição discreta da atividade da MAO na dose de 0,5%. Os resultados do presente estudo demonstraram que essa diminuição é observada no 2º e 9º dia após a última exposição na concentração de 1,4% de álcool em um modelo de exposição intermitente, sugerindo que mesmo em um período de retirada do álcool esta enzima encontra-se em níveis reduzidos.

Matthews et al. (2018) conduziram um estudo utilizando roedores expostos cronicamente ao vapor de etanol para avaliar a atividade da MAO imediatamente após a exposição, retirada aguda (24h), retirada prolongada (4 dias) e abstinência prolongada (3 semanas). A exposição crônica ao vapor de etanol elevou significativamente a atividade da MAO-A no córtex cingulado pré-frontal e anterior após a retirada aguda (24 horas), sugerindo uma relação causal entre a abstinência alcoólica aguda e níveis elevados de atividade da MAO-A. Estas elevações no nível da enzima estão associadas a maiores níveis de disforia e episódios depressivos (Chiucciariello et al., 2014; Matthews et al., 2014).

Em um modelo de binge em ratos, os quais recebiam uma dose de etanol (9g/kg/dia) três vezes por dia (às 7:00h, 15:00h e 23:00h) por quatro dias, encontrou-se um aumento na expressão da MAO nas suas duas isoformas, MAO-A e MAO-B (Duncan et al., 2016). Uma consequência do aumento da MAO-B pode resultar em oxidação e subprodutos elevados da dopamina, como o peróxido de hidrogênio, que formam radicais hidroxila altamente reativos que subsequentemente danificam

proteínas, lipídios da membrana e ácidos nucleicos, levando à degeneração neuronal (Duncan et al., 2012; Youdim et al., 2006).

O presente estudo avaliou a função dos DATs em cérebro de peixe-zebra após intermitentes exposições ao álcool. Os genes dos DATs já foram identificados em peixe-zebra, entretanto na literatura existente não há estudos analisando a funcionalidade do transportador. Diante disso, foi realizado uma análise prévia com o fármaco bupropiona, o qual é conhecido como um inibidor clássico dos DATs, atuando na inibição da recaptação de dopamina (Stahl et al., 2004). Como este estudo é o primeiro a mostrar a função dos DATs através da técnica de captação de dopamina marcada radioativamente em peixe-zebra, utilizou-se a bupropiona como controle positivo e foi observado uma redução da captação dos DATs na concentração de 100uM, comprovando a funcionalidade da técnica.

A partir disso, o modelo de exposição ao álcool proposto no presente estudo, encontrou um aumento na função dos DATs nos grupos WB-1 e WB-2 em relação ao controle e uma diminuição no grupo WB-9, assemelhando-se ao controle. Uma vez que os DATs são responsáveis pelo controle da dopamina extracelular na fenda sináptica, esses resultados poderiam sugerir que estes transportadores estariam impactando na diminuição dos níveis de dopamina devido ao seu aumento em relação ao controle. Pode-se supor o contrário, quando avaliado o grupo WB-9, onde há uma diminuição dos DATs e isto poderia estar relacionado a um aumento dos níveis de dopamina extracelulares.

Até agora, estudos sobre exposição aguda e crônica do etanol em roedores mostraram uma ligação potencial entre DAT e etanol; no entanto, resultados controversos foram observados. Diferentes estudos relataram que uma única injeção de etanol pode causar um aumento (Wang et al., 1997; Sabeti et al., 2003), diminuir (Lin e Chai, 1995; Robinson et al., 2005) ou nenhuma mudança (Budygin et al., 2000; Yim e Gonzales, 2000; Gonzales et al., 2004) na capacidade de captação de dopamina. Como o etanol é administrado sistemicamente nesses estudos, não está claro se o etanol tem a capacidade de alterar diretamente a função dos DATs. Apesar dos resultados mostrarem-se conflitantes, muitos fatores podem influenciar o sistema dopaminérgico sob este parâmetro, tais como a dose de etanol administrada, o tempo e frequência de consumo e o período de privação.

O estudo de Budygin et al. (2007) utilizou o modelo de consumo crônico e intermitente do álcool em ratos machos analisou os efeitos da exposição crônica na

dinâmica da dopamina utilizando Voltametria Cíclica De Varredura Rápida (FSCV) *in vitro*. Os animais foram expostos a vapores de etanol durante 12 h / dia durante 5 ou 10 dias em uma concentração de 20 a 25 mg/L de ar. Foi descoberto que a exposição crônica ao álcool aumentou as taxas de captação de dopamina no NAc e no corpo estriado do cérebro destes ratos em relação ao grupo controle. Uma vez que a exposição crônica ao etanol provoca o acúmulo de dopamina no espaço extracelular, o aumento da captação de dopamina poderia ser uma resposta compensatória do sistema dopaminérgico a fim de diminuir os níveis de dopamina extracelular. Assim, a captação aumentada de dopamina induzida pela exposição crônica ao álcool poderia ser explicada pelo aumento do número de DATs na superfície celular, sugerindo que o etanol altera a função e o tráfico dos DATs (Grace, 2000; Budygin et al., 2007). Como essas mudanças neuroquímicas resultariam na diminuição do impacto da exposição repetida ao álcool nos níveis de dopamina, tais alterações poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de tolerância (Grace, 2000).

Semelhante ao etanol, a retirada de cocaína administrada repetidamente provoca aumentos significativos nos níveis de dopamina em peixe-zebra, bem como diminui a expressão do gene transportador de dopamina (zDAT). Diminuições na proteína zDAT poderiam levar a diminuições na dopamina pré-sináptica, o que resultaria em aumentos na atividade da enzima TH como um processo compensatório para repor as vesículas do neurotransmissor. Sendo assim, é possível que a retirada do etanol induza uma cascata de alterações dependente de zDAT semelhante. Com isso, a retirada da cocaína e do álcool em peixe-zebra revela que este modelo animal é replicável em ambas condições e pode ser uma ferramenta promissora para compreender os mecanismos relacionados a droga adição (López Patiño, 2008; Tran et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados demonstrados no presente estudo, conclui-se que o binge alcoólico foi capaz de promover alterações na neurotransmissão dopaminérgica em peixe-zebra através de mudanças nos níveis de dopamina, atividade da MAO e dos DATs. Sugere-se que os parâmetros dopaminérgicos são suscetíveis após dois e nove dias a partir da última exposição alcoólica neste modelo experimental, resultando em um evento modulatório desta via de neurotransmissão. Em adição a isso, os estudos de PET em humanos alcoolistas sugerem alterações nos receptores D2/D3 em diversas regiões cerebrais, ressaltando assim o importante papel do sistema dopaminérgico frente ao abuso de álcool. Com isso os achados neste estudo permitem contribuir e expandir evidências para novas perspectivas no que se refere ao papel do sistema dopaminérgico e a importância de novas investigações no sentido de compreender os efeitos nocivos do álcool.

REFERÊNCIAS

- Addicott MA, Marsh-Richard DM, Mathias CW, Dougherty DM. The biphasic effects of alcohol: comparisons of subjective and objective measures of stimulation, sedation, and physical activity. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(11):1883-90.
- Adinoff, B. Neurobiologic Processes in Drug Reward and Addiction. *Harvard Review of Psychiatry*, 2004;12(6):305–320.
- Almeida JC, Campos JADB. Consumo de álcool por adultos brasileiros: uma revisão de literatura. *Rev Ciência Et Praxis.* 2013;6(12):7-12.
- Andreoli M, Tessari M, Pilla M, Valerio E, Hagan JJ, Heidbreder CA. Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28(7):1272-80.
- Anichtchik O, Sallinen V, Peitsaro N, Panula P. Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 2006 Oct 10;498(5):593-610.
- Baldaçara L, Araújo Filho GM, Jackowski A . Neuroanatomia funcional e comportamental. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. 3º edição. Porto Alegre: Artmed; 2011. P. 23-34.
- Barr CS, Schwandt M, Lindell SG, Chen SA, Goldman D, Suomi SJ, et al. (2007): Association of a functional polymorphism in the mu-opioid receptor gene with alcohol response and consumption in male rhesus macaques. *Arch Gen Psychiatry* 64:369 – 376.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):182-217.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strahle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002;5(2):111-8.
- Beets MW, Flay BR, Vuchinich S, Li KK, Acock A, Snyder FJ; Tobacco Etiology Research Network. Longitudinal patterns of binge drinking among first year college students with a history of tobacco use. *Drug Alcohol Depend.* 2009; 103(1-2):1-8.
- Bickel WK, Jarmolowicz DP, Mueller ET, Gatchalian KM, McClure SM. Are executive function and impulsivity antipodes? A conceptual reconstruction with special reference to addiction. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 221(3):361–87
- BIOLUTION. Dopaminergic synapse. 2016. Disponível em: <<http://www.biolution.net/portfolio/illustration/>>. Acesso em: 08 fev. 2018.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004;230(3):481-93.

Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse*. 2003; 49(4):226-31.

Budygin EA, Oleson EB, Mathews TA, Läck AK, Diaz MR, McCool BA, Jones SR. Effects of chronic alcohol exposure on dopamine uptake in rat nucleus accumbens and caudate putamen. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 193(4):495-501.

Budygin EA, Phillips PE, Robinson DL, Kennedy AP, Gainetdinov RR, Wightman RM. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 297(1):27-34

Chatterjee D, Gerlai R. High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009;200(1):208-13

Chatterjee D, Shams S, Gerlai R. Chronic and acute alcohol administration induced neurochemical changes in the brain: comparison of distinct zebrafish populations. *Amino Acids*. 2014; 46(4):921-30

Chen F, Andrew JL, Liang JH. Research progress in central neurotransmitters related to alcohol abuse and addiction. 2007;16(1):5-11.

Chen YC, Priyadarshini M, Panula P. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(4):375-81.

Chiucciariello, L., Houle, S., Miler, L., Cooke, R.G., Rusjan, P.M., Rajkowska, G., Levitan, R.D., Kish, S.J., Kolla, N.J., Ou, X., Wilson, A.A., Meyer, J.H. Elevated monoamine oxidase a binding during major depressive episodes is associated with greater severity and reversed neurovegetative symptoms. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39:973–980.

Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, et al. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci*. 1995; 15(3 Pt 1):1714– 23.

Collins MA, Corso TD, Neafsey EJ. Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 20: 284–92.

Collins MA, Neafsey EJ. Neuroinflammatory pathways in binge alcohol induced neuronal degeneration: oxidative stress cascade involving aquaporin, brain edema, and phospholipase A2 activation. *Neurotox. Res*. 2012; 21(1): 70-8.

Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J, Noronha A. Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res*. 2004; 28(2):350-64.

Daglish MR, Williams TM, Wilson SJ, Taylor LG, Eap CB, Augsburger M, Giroud C, Brooks DJ, Myles JS, Grasby P, Lingford-Hughes AR, Nutt DJ. Brain dopamine response in human opioid addiction. *Br J Psychiatry*. 2008 Jul;193(1):65-72.

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 98: 266-70.

Deeks JJ. Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. In: Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews In Health Care: Meta-Analysis In Context*. 2. ed. London: John Wiley Professional; 2001. p. 248-282.

De Witte P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict Behav*. 2004;29(7):1325-39.

Diana M., Pistis M., Muntoni A., Gessa G. Mesolimbic dopam-nergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome:evidence of protracted abstinence. *Neuroscience* 1996; 71:411–15.

Dlugos CA, Rabin RA. Ethanol effects on three strains of zebrafish: a model system for genetic investigations. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2003;74:471-80.

Duncan J, Johnson S, Ou XM. Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. *Drug Discov Ther*. 2012; 6(3):112-22. Review

Duncan JW, Zhang X, Wang N, Johnson S, Harris S, Udemgba C, Ou XM, Youdim MB, Stockmeier CA, Wang JM. Binge ethanol exposure increases the Krüppel-like factor 11-monoamine oxidase (MAO) pathway in rats: Examining the use of MAO inhibitors to prevent ethanol-induced brain injury. *Neuropharmacology*. 2016; 105:329-340.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research & Health* 2007;30(1):5-13.

Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002;454(3)294-309.

Erritzoe D, Tziortzi A, Bargiela D, Colasanti A, Searle GE, Gunn RN, Beaver JD, Waldman A, Nutt DJ, Bani M, Merlo-Pich E, Rabiner EA, Lingford-Hughes A. In vivo imaging of cerebral dopamine D3 receptors in alcoholism *Neuropsychopharmacology*. 2014 Jun;39(7):1703-12.

Fiorillo CD, Tobler PN, Schultz W: Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* 2003; 299:1898–1902

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Catecholamines, Principles of neuropsychopharmacology, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA. 1997;277–344.

Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W. Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes th1 and th2 reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol.* 2010 Feb 15;518(4):423-38.

Floresco SB, Magyar O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berl).* 2006; 188(4):567–85. [PubMed: 16670842]

Garcia, LP, Freitas, LRS. Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. *Epidemiol. Serv. Saúde* [online]. 2015, 24(2) 227-237.

George O, Sanders C, Freiling J, Grigoryan E, Vu S, Allen CD, Crawford E, Mandyam CD, Koob GF. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(44):18156-61

Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000 Dec;67(4):773-82.

Gerlai R, Chatterjee D, Pereira T, Sawashima T, Krishnannair R. Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. *Genes Brain Behav.* 2009;8(6):586-99.

Gigliotti A, Bessa MA. Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos. 2004. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2004;26 (Suppl1):11-13.

Ginovart N. Imaging the dopamine system with in vivo [¹¹C]raclopride displacement studies: understanding the true mechanism. *Mol Imaging Biol.* 2005 ;7(1):45-52. Review.

Gonzales RA, Job MO, Doyon WM. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther.* 2004; 103(2):121-46.

Gouveia VV, da Silva LD, Athayd RAA, Vione KC, Soares AKS. Atitudes frente ao álcool e o potencial bebedor-problema: correlatos demográficos e psicossociais. *Rev Bioet.* 2009;17(2):251–66.

Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction.* 2000; 95(Suppl 2):S119–S128.

Grunewald M, Johnson S, Lu D, Wang Z, Lomber G, Albert PR, Stockmeier CA, Meyer JH, Urrutia R, Miczek KA, Austin MC, Wang J, Paul IA, Woolverton WL, Seo S, Sittman DB, Ou XM. Mechanistic role for a novel glucocorticoid-KLF11 (TIEG2) protein pathway in stress-induced monoamine oxidase A expression. *J Biol Chem*. 2012;287(29):24195-206.

Haber SN, Fudge JL, McFarland NR: Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 2000; 20:2369–2382

Hagelberg N, Kajander JK, Nagren K, Hinkka S, Hietala J, Scheinin H (2002): Mu-receptor agonism with alfentanil increases striatal dopamine D2 receptor binding in man. *Synapse* 45:25–30.

Haraguchi H, Tanaka Y, Kabbash A, Fujioka T, Ishizu T, Yagi A. Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*. 2004;(15): 2255-60.

Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. .Mechanism of alcohol-Induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(11):1542-50.

Heckmann W, Silveira CM. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. In: Andrade AG, Anthony JC, Silveira CM. *Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual*. Barueri (SP): Minha Editora; 2009;67-87.

Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Buchholz HG, Gründer G, Kumakura Y, Cumming P, Schreckenberger M, Smolka MN, Rösch F, Mann K, Bartenstein P. Correlation of alcohol craving with striatal dopamine synthesis capacity and D2/3 receptor availability: a combined [¹⁸F]DOPA and [¹⁸F]DMFP PET study in detoxified alcoholic patients. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(8):1515-20

Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grüsser SM, Flor H, Braus DF, Buchholz HG, Gründer G, Schreckenberger M, Smolka MN, Rösch F, Mann K, Bartenstein P. Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry*. 2004;161(10):1783-9

Heidbreder CA, Newman AH. Current perspectives on selective dopamine D(3) receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1187: 4–34

Hietala J, West C, Syvälahti E, Nägren K, Lehtikoinen P, Sonninen P, Ruotsalainen U. Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994; 116(3):285-90

Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, Salgado H, Torres-Ramirez O, Uhrig S, Broccoli L, Vengeliene V, Roßmanith M, Perreau-Lenz S, Köhr G, Sommer WH, Spanagel R, Hansson AC. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(11):3024-9.

Hoepfner BB, Barnett NP, Jackson KM, Colby SM, Kahler CW, Monti PM, Read J, Tevyaw T, Wood M, Corriveau D, Fingeret A. Daily college student drinking patterns across the first year of college. *J Stud Alcohol Drugs*. 2012; 73(4):613-24.

Holcombe A, Howorko A, Powell RA, Schalomon M, Hamilton TJ. Reversed scototaxis during withdrawal after daily-moderate, but not weekly-binge, administration of ethanol in zebrafish. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63319

Holmes A, Fitzgerald PJ, Macpherson KP, Debrouse L, Colacicco G, et al. Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR-mediated fear extinction encoding. *Nat Neurosci*. 2012; 15: 1359–61.

Holzschuh J, Ryu S, Aberger F, Driever W Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev*. 2001;101: 237-243.

Homayoun H, Moghaddam B. Progression of cellular adaptations in medial prefrontal and orbitofrontal cortex in response to repeated amphetamine. *J Neurosci*. 2006; 26:8025–8039.

Jellinek EM. The disease concept of alcoholism. New Brunswick: Hillhouse Press, 1960.

Ji X, Saha S, Kolpakova J, Guildford M, Tapper AR, Martin GE. Dopamine Receptors Differentially Control Binge Alcohol Drinking-Mediated Synaptic Plasticity of the Core Nucleus Accumbens Direct and Indirect Pathways. *J Neurosci*. 2017 May 31;37(22):5463-5474.

Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(5):569-81.

Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005; 162:1403–1413

Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001;440(4):342-77.

Kelso ML, Liput DJ, Eaves DW, Nixon K. Upregulated vimentin suggests new areas of neurodegeneration in a model of an alcohol use disorder. *Neurosci*. 2011;197:381–93.

Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2004;355(1-2):29-32.

Koob GF. Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013; 13:3–30.

Kroener S, Mulholland PJ, New NN., Gass JT, Becker HC, et al. Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One*. 2012; 7: e3754.

Laranjeira R, Pinsky I, Sanches M, Zaleski M, Caetano R. Alcohol use patterns among brazilian adults. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2010, 32(3), 231-241

Laranjeira R, Madruga C S, Pinsky I, Caetano R, Mitsuhiko S S, Castello G. Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas – Relatório 2012, Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). 2012;1:34-43.

Leasure JL, Nixon K. Exercise neuroprotection in a rat model of binge alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34(3):404–14.

Laine TP, Ahonen A, Rasanen P, Tiihonen J. Dopamine transporter availability and depressive symptoms during alcohol withdrawal. *Psychiatry Res*. 1999; 90(3):153–7

Lele Z, Krone PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv.*1996;14(1):57-72.

Levin ED, Cerruti DT. Chapter 15: Behavioral neuroscience of zebrafish. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Boca Raton, Florida: CRC press. 2009:293-311.

Lin AM, Chai CY. Dynamic analysis of ethanol effects on NMDA-evoked dopamine overflow in rat striatum. *Brain Res*. 1995; 696(1-2):15-20. PubMed PMID: 8574663.

López Patiño MA, Yu L, Yamamoto BK, Zhdanova IV. Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiol Behav*. 2008; 95(1-2):36-47.

Ma H, Zhu G. The dopamine system and alcohol dependence. *Shanghai Archives of Psychiatry*. 2014;26(2).

Maher TJ. Exploring alcohol effects on Liver Function. *Alcohol Health and Research World*. 1997;21(1).

Majchrowicz, E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia*. 1975; 43(3): 245-254.

Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M, Abi-Dargham A. Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biol Psychiatry*. 2005 Nov 15;58(10):779-86.

Martinez D, Kim JH, Krystal J, Abi-Dargham A. Imaging the neurochemistry of alcohol and substance abuse. *Neuroimaging Clin N Am*. 2007; 17: 539–555.

Mathur P, Berberoglu MA, Guo S. Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure. *Behav Brain Res*. 2011; 217(1):128-33.

Mathur P, Lau B, Guo S. Conditioned place preference behavior in zebrafish. *Nat Protoc*. 2011; 6(3):338-45.

Matthews, B.A., Kish, S.J., Xu, X., Boileau, I., Rusjan, P.M., Wilson, A.A., DiGiacomo, D., Houle, S., Meyer, J.H. Greater monoamine oxidase a binding in alcohol dependence. *Biol. Psychiatry*. 2014; 75:756–764.

Matthews BA, Tong J, Attwells S, Xu X, Le A, Kish SJ, Meyer JH. Elevated monoamine oxidase A activity and protein levels in rodent brain during acute withdrawal after chronic intermittent ethanol vapor exposure. *Drug Alcohol Depend*. 2018; 185:398-405.

Maynard ME, Leasure JL. Exercise enhances hippocampal recovery following binge ethanol exposure. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e76644

McCabe BJ. Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(1):21-6.

Mugnaini M, Iavarone L, Cavallini P, Griffante C, Oliosi B, Savoia C, Beaver J, Rabiner EA, Micheli F, Heidbreder C, Andorn A, Merlo Pich E, Bani M. Occupancy of brain dopamine D3 receptors and drug craving: a translational approach. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38(2):302-12.

Narendran R, Jedema HP, Lopresti BJ, Mason NS, Gurnsey K, Ruszkiewicz J, Chen CM, Deutch L, Frankle WG, Bradberry CW. Imaging dopamine transmission in the frontal cortex: a simultaneous microdialysis and [¹¹C]FLB 457 PET study. *Mol Psychiatry*. 2014 Mar;19(3):302-10.

Narendran R, Mason NS, Paris J, Himes ML, Douaihy AB, Frankle WG. Decreased prefrontal cortical dopamine transmission in alcoholism. *Am J Psychiatry*. 2014; 171(8):881-8.

National Highway Traffic Safety Administration. 2014 Data: Alcohol-Impaired Driving. (Traffic Safety Facts. DOT HS 812 231). Washington, DC. Disponível em: <<https://crashstats.nhtsa.dot.gov/Api/Public/ViewPublication/812231>> Acesso em: 02 fev. 2018

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Alcohol alert n. 35; PH 371.1997.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Alcohol Metabolism: An Update. NIH Publication. 2007;72.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. NIAAA Newsletter, 2004;3:3.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Alcohol's Effects on the Body. NIAAA Newsletter; 2013

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Overview alcohol consumption: Drinking Levels Defined. 2015.

Nestler J, Hyman SE. Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Nat Neurosci*. 2010;13(10): 1161-1169

Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 2004;47 Suppl 1:24-32. Review.

Nixon K, Crews FT. Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci*. 2004; 24 (43):9714–22.

Nowicki M, Tran S, Chatterjee D, Gerlai R. Inhibition of phosphorylated tyrosine hydroxylase attenuates ethanol-induced hyperactivity in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav*. 2015;138:32-9.

Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 72(3): 521–32.

Organização Panamericana de Saúde. Regional Status Report on Alcohol and Health in the Americas. Washington, DC: PAHO, 2015.

Ou XM, Udemgba C, Wang N, Dai X, Lomber G, Seo S, Urrutia R, Wang J, Duncan J, Harris S, Fairbanks CA, Zhang X. Diabetes-causing gene, *kruppel-like factor 11*, modulates the antinociceptive response of chronic ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014; 38:401–408

Paton A. ABC of alcohol: Alcohol in the body *BMJ*. 2005;330(7482):85–87.

Peanal AT, Rosas M, Porru S, Acquas E. From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. *J Exp Neurosci*. 2016;10:137-46.

Peng J, Wagle M, Mueller T, Mathur P, Lockwood BL, Bretau S, Guo S Ethanol-modulated camouflage response screen in zebrafish uncovers a novel role for cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in behavioral sensitivity to ethanol. *J Neurosci*. 2009;29(26):8408-18.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977;83(2):346-56.

Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol*. 2005;75(4):247-74.

Reinaldo Guimarães. Pesquisa Translacional: uma interpretação. *Ciência & Saúde Coletiva*, 18(6):1731-1744, 2013

Repo E, Kuikka JT, Bergstrom KA, Karhu J, Hiltunen J, Tiihonen J. Dopamine transporter and D2- receptor density in late-onset alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999; 147(3):314–8

Rhoads DE, Contreras C, Fathalla S. Brain levels of catalase remain constant through strain, developmental, and chronic alcohol challenges. *Enzyme Res.* 2012;1:1-6.

Rico EP, Oliveira DL, Rosemberg DB, Mussulini BH, Bonan CD, Dias RD, Wofchuk S, Onofre DS, Bogo MR. Expression and functional analysis of Na⁺-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. 2010; 81(4–5):517-523.

Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2003;73(16):2071-82.

Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience.* 2004;127(1):147-54.

Robinson DL, Volz TJ, Schenk JO, Wightman RM. Acute ethanol decreases dopamine transporter velocity in rat striatum: in vivo and in vitro electrochemical measurements. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29(5):746-55

Robinson TE, Berridge KC: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993; 18:247–291

Robinson DL, Volz TJ, Schenk JO, Wightman RM. Acute ethanol decreases dopamine transporter velocity in rat striatum: in vivo and in vitro electrochemical measurements. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29(5):746-55

Rominger A, Cumming P, Xiong G, Koller G, Böning G, Wulff M, Zwergal A, Förster S, Reilhac A, Munk O, Soyka M, Wängler B, Bartenstein P, la Fougère C, Pogarell O. [18F]Fallypride PET measurement of striatal and extrastriatal dopamine D 2/3 receptor availability in recently abstinent alcoholics. *Addict Biol.* 2012; 17(2):490-503.

Rossetti Z.L., Melis F., Carboni S., Diana M., Gessa G.L. Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1992; 16:529–32.

Sabeti J, Gerhardt GA, Zahniser NR. Chloral hydrate and ethanol, but not urethane, alter the clearance of exogenous dopamine recorded by chronoamperometry in striatum of unrestrained rats. *Neurosci Lett.* 2003 May 29;343(1):9-12.

Savio LE, Vuaden FC, Rosemberg DB, Bogo MR, Bonan CD, Wyse AT. Long-term proline exposure alters nucleotide catabolism and ectonucleotidase gene expression in zebrafish brain. *Metab Brain Dis.* 2012;27(4):541-9.

Schneider H, Fritzky L, Williams J, Heumann C, Yochum M, Pattar K, Noppert G, Mock V, Hawley E. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT(2C) receptor gene. *Gene.* 2012 Jul 10;502(2):108-17.

Schuckit MA, Smith TL, Hesselbrock V, Bucholz KK, Bierut L, Edenberg H, Kramer J, Longacre E, Fukukura T, Kalmijn J, Danko GP, Trim R (2008) Clinical implications of tolerance to alcohol in nondependent young drinkers. *Am J Drug Alcohol Abuse* 34:133–149

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004;139(2):203-7.

Shah SA, Yoon GH, Kim MO. Protection of the developing brain with anthocyanins against ethanol-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2015; 51(3):1278-91.

Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:197–217

Spreckelmeyer KN, Paulzen M, Raptis M, Baltus T, Schaffrath S, Van Waesberghe J, Zalewski MM, Rösch F, Vernaleken I, Schäfer WM, Gründer G. Opiate-induced dopamine release is modulated by severity of alcohol dependence: an (18)F]fallypride positron emission tomography study. *Biol Psychiatry.* 2011; 70(8):770-6

Standaert DG, Galanter JM. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. *Princípios da Farmacologia.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012; 166-185.

Stahl SM, Pradko JF, Haight BR, Modell JG, Rockett CB, Learned-Coughlin S. A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2004;6(4):159-166.

Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(7):533-9.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMSHA). Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, NSDUH Series H-41, HHS Publication No. (SMA). Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration. 2011; 11-4658.

Takano A, Varrone A, Gulyás B, Salvadori P, Gee A, Windhorst A, Vercouillie J, Bormans G, Lammertsma A, Halldin C. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016; 43(12): 2255–62

Tambour S, Quertemont E. Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21(1):9-28. Review. Erratum in: *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21(2):215.

Thanos PK, Katana JM, Ashby CR Jr, Michaelides M, Gardner EL, Heidbreder CA, Volkow ND. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates

ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(1):190-7.

Thanos PK, Wang GJ, Volkow ND. Positron emission tomography as a tool for studying alcohol abuse. *Alcohol Res Health.* 2008; 31(3):233-7. Review.

Tiihonen J, Vilkkman H, Räsänen P, Ryyänen OP, Hakko H, Bergman J, Hämäläinen T, Laakso A, Haaparanta-Solin M, Solin O, Kuoppamäki M, Syvälahti E, Hietala J. Striatal presynaptic dopamine function in type 1 alcoholics measured with positron emission tomography. *Mol Psychiatry.* 1998; 3(2):156-61

Tran S, Chatterjee D, Gerlai R. An integrative analysis of ethanol tolerance and withdrawal in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2015; 276:161-70

Tran S, Facciol A, Gerlai R. The Zebrafish, a Novel Model Organism for Screening Compounds Affecting Acute and Chronic Ethanol-Induced Effects. *Int Rev Neurobiol.* 2016a;126:467-84.

Tran S, Facciol A, Gerlai R. Alcohol-induced behavioral changes in zebrafish: The role of dopamine D2-like receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 016b;233(11):2119-28

Tran S, Facciol A, Nowicki M, Chatterjee D, Gerlai R. Acute alcohol exposure increases tyrosine hydroxylase protein expression and dopamine synthesis in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2017;317:237-241

Tupala E, Hall H, Mantere T, Rasanen P, Sarkioja T, Tiihonen J. Dopamine receptors and transporters in the brain reward circuits of type 1 and 2 alcoholics measured with human whole hemisphere autoradiography. *Neuroimage.* 2003; 19(1):145–55

Tupala E, Tiihonen J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004;28(8):1221-47.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2000;24(1):125-132.

Van Diermen D, Marston A, Bravo J, Reist M, Carrupt PA, Hostettmann K. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122(2):397-401.

Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(5):479-85.

Viner RM, Taylor B. Adult outcomes of binge drinking in adolescence: findings from a UK national birth cohort. *J Epidemiol Community Health.* 2007;61(10):902-7.

Vivian JA, Green HL, Young JE, Majerksy LS, Thomas BW, Shively CA, Tobin JR, Nader MA, Grant KA Induction and maintenance of ethanol self-administration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): long-term characterization of sex and individual differences. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25:1087–1097.

- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N, Shea C, Piscani K. Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20(9):1594-8.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci.* 2007 Nov 14;27(46):12700-6
- Wang Y, Palmer MR, Cline EJ, Gerhardt GA. Effects of ethanol on striatal dopamine overflow and clearance: an in vivo electrochemical study. *Alcohol.* 1997 Nov-Dec;14(6):593-601
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet.* 2001 Feb 3;357(9253):354-7.
- Wang Y, Palmer MR, Cline EJ, Gerhardt GA. Effects of ethanol on striatal dopamine overflow and clearance: an in vivo electrochemical study. *Alcohol.* 1997; 14(6):593-601
- Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol Alcohol.* 2009;44(2):128-35.
- Wen XJ, Kanny D, Thompson WW, Okoro CA, Town M, Balluz LS. Binge drinking intensity and health-related quality of life among US adult binge drinkers. *Prev Chronic Dis.* 2012;9:E86.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). *Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID) – 10th Revision.* 2016.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). *Relatório de status global sobre álcool e saúde – 2014 ed.* Switzerland, 2014.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). *Estratégias de auto-ajuda para reduzir ou interromper o uso de substâncias: um guia.* 2010.
- Xiao C, Ye JH. Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: role of mu-opioid receptors. *Neuroscience.* 2008 Apr 22;153(1):240-8.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod. Toxicol.* 2009;28(2):245-53.
- Yen CH, Yeh YW, Liang CS, Ho PS, Kuo SC, Huang CC, Chen CY, Shih MC, Ma KH, Peng GS, Lu RB, Huang SY. Reduced Dopamine Transporter Availability and Neurocognitive Deficits in Male Patients with Alcohol Dependence. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0131017.

- Yim HJ, Gonzales RA. Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol*. 2000 ;22 (2):107-15.
- Yim HJ, Robinson DL, White ML, Jaworski JN, Randall PK, Lancaster FE, Gonzales RA. Dissociation between the time course of ethanol and extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens after a single intraperitoneal injection. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000; 24(6) 781-8.
- Yoder KK, Kareken DA, Morris ED. Assessing Dopaminergic Neurotransmission with PET: Basic Theory and Applications in Alcohol Research. *Curr Med Imaging Reviews*. 2011; 7, 118-24
- Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:295-309
- Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006;29(4):245-54. Review.
- Zhang Y, Fox GB. PET imaging for receptor occupancy: meditations on calculation and simplification. *J Biomed Res*. 2012; 26(2):69-76.
- Zhu J, Reith MEA. Role of dopamine transporter in the action of psychostimulants, nicotine, and other drugs of abuse. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008; 7(5): 393–409.
- Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA. Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30(9):1500-505.

ANEXOS

ANEXO A – ESCALA DE AVALIAÇÃO DE QUALIDADE NEWCASTLE-OTTAWA

NEWCASTLE - OTTAWA QUALITY ASSESSMENT SCALE CASE CONTROL STUDIES

Note: A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the Selection and Exposure categories.
A maximum of two stars can be given for Comparability.

Selection

- 1) Is the case definition adequate?
 - a) yes, with independent validation ★
 - b) yes, eg record linkage or based on self reports
 - c) no description
- 2) Representativeness of the cases
 - a) consecutive or obviously representative series of cases ★
 - b) potential for selection biases or not stated
- 3) Selection of controls
 - a) community controls ★
 - b) hospital controls
 - c) no description
- 4) Definition of controls
 - a) no history of disease (endpoint) ★
 - b) no description of source

Comparability

- 1) Comparability of cases and controls on the basis of the design or analysis
 - a) study controls for _____ (Select the most important factor.) ★
 - b) study controls for any additional factor ★ (This criteria could be modified to indicate specific control for a second important factor.)

Exposure

- 1) Ascertainment of exposure
 - a) secure record (eg surgical records) ★
 - b) structured interview where blind to case/control status ★
 - c) interview not blinded to case/control status
 - d) written self report or medical record only
 - e) no description
 - 2) Same method of ascertainment for cases and controls
 - a) yes ★
 - b) no
 - 3) Non-response rate
 - a) same rate for both groups ★
 - b) non respondents described
 - c) rate different and no designation
-

ANEXO B – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 05/09/2017.

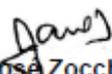
Título do projeto	Avaliação do sistema dopaminérgico em peixe-zebra submetidos ao modelo de binge alcoólico
Project title	Evaluation of dopaminergic system in zebrafish submitted to model of alcoholic binge
Número do protocolo Protocol number	010/2017-2 – Versão 02
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Maria Cecilia Manenti Alexandre, Naithan Ludian Fernandes Costa, Leticia Burato Wessler, Karine Medeiros Vieira, Samira Leila Baldin, Eduardo Ronconi Dondossola, Maria Laura Rodrigues Uggioni

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/10/2017 a 04/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Peixe Danio rerio – short-fin
Nº de animais	226
Idade/Peso	4 meses / 400 – 500mg
Gênero	Masculino (113) e Feminino (113)
Origem	Biotério UNESC

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

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

Criciúma, 05 de setembro de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA