

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

ALINE HAAB LUTTE

**Avaliação do metabolismo da adenosina
em um modelo de síndrome alcoólica fetal
em zebrafish (*Danio rerio*)**

Orientadora: Profª Drª Rosane Souza Da Silva

Porto Alegre – RS

2015

ALINE HAAB LUTTE

**Avaliação do metabolismo da adenosina
em um modelo de síndrome alcoólica fetal
em zebrafish (*Danio rerio*)**

Orientadora: Profª Drª ROSANE SOUZA DA SILVA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre – RS

2015

ALINE HAAB LUTTE

**Avaliação do metabolismo da adenosina
em um modelo de síndrome alcoólica fetal
em zebrafish (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Carla Denise Bonan – PUC

Prof. Dr. Dênis Broock Rosemberg – UFSM

Prof. Dr. José Maria Montserrat - FURG

Porto Alegre – RS

2015

Aos meus pais

Aos meus professores

E a mim mesma...

AGRADECIMENTOS

Essa é a hora que vemos o quanto o apoio das pessoas que estão ao nosso lado é indispensável para concretizarmos nossos sonhos. E o mais importante, é a hora de agradecer a quem tornou possível a realização de mais essa etapa. OBRIGADA...

Aos meus pais que fizeram o possível e impossível para que eu estudasse sempre,

Aos meus irmãos, principalmente minha irmã e cunhado que me deram abrigo durante meus dias em Porto Alegre,

À minha orientadora, Rosane, que assinou o aceite de orientação sem nem mesmo me conhecer, e foi uma segunda mãe durante todo o mestrado,

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, pelos longos almoços no RU seguidos sempre de um cafezinho e em especial ao Fabiano que me recebeu em meu primeiro dia, e pratica "bulling" comigo até hoje, a Katiúcia que me auxiliou nos piores momentos durante meus experimentos e a Carolina, que entrou como IC nos últimos momentos e fez toda a diferença,

Ao diretor da Câmara de Vereadores de Santa Rosa, Joel Faccin, sem o qual eu não teria a oportunidade de trabalhar e estudar ao mesmo tempo,

Às colegas de trabalho Lauciely, Cris, Camila e Lika, que aguentaram meus altos e baixos e os momentos em que eu não queria falar ou dar atenção a ninguém, pois precisava terminar de escrever alguma coisa,

Ao meu companheiro Daniel, que me apoiou sempre, muitas vezes acreditando em mim mais do que eu mesma e que entendeu a minha ausência constante nesses dois anos. Compensarei, prometo,

À PUCRS, que é a Instituição que tornou tudo isso possível,

E por fim a Deus, sem o qual não haveria nada a agradecer.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton).

RESUMO

A exposição ao etanol durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário pode causar alterações morfológicas e comportamentais, mesmo quando ingerido em baixas doses. Retardo no crescimento, microcefalia e retardo mental são algumas das características observadas em crianças portadoras da SAF (síndrome alcoólica fetal), cujas mães ingeriram etanol durante a gestação. Os mecanismos pelos quais o etanol afeta o desenvolvimento embrionário e causa tais alterações ainda não foram completamente desvendados. O aumento extracelular da adenosina após exposições crônicas e agudas ao etanol indica que o sistema purinérgico tem um importante papel nesses mecanismos. A adenosina é um neuromodulador que atua através da ativação de receptores metabotrópicos do tipo P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) e pode agir como um neuroprotetor endógeno. No espaço extracelular, a adenosina pode ser produzida pela hidrólise sequencial da adenosina trifosfato (ATP) realizada pela cascata das ectonucleotidases, uma família de enzimas localizada na superfície celular, sendo o processo chave – hidrólise da adenosina monofosfato (AMP) à adenosina – realizada pela ecto-5'-nucleotidase. A utilização do peixe-zebra em estudos toxicológicos e de desenvolvimento oferece uma série de vantagens. Seu tamanho e a forma de criação permitem a manutenção de uma grande quantidade de peixes em um espaço relativamente pequeno. O cruzamento resulta em um grande número de ovos e o desenvolvimento ocorre rapidamente, e progride através de etapas bem definidas. Estudos recentes têm empregado o peixe-zebra como modelo para a síndrome alcoólica fetal e demonstrado que a exposição embrionária ao etanol resulta em fenótipos comparáveis com aqueles observados em outros modelos vertebrados. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do metabolismo da adenosina nos parâmetros morfológicos e locomotores de larvas de peixe-zebra expostas ao etanol. Os resultados obtidos demonstraram que além dos danos morfológicos já conhecidos, há alteração na atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase em larvas de 7 dias, em ambos os tratamentos, agudo e crônico, de uma forma independente da expressão gênica, que por sua vez, não foi alterada. O tratamento prévio com AOPCP, um inibidor da ecto-5'-nucleotidase, não foi capaz de prevenir os danos morfológicos de forma relevante, embora estatisticamente verificou-se uma leve prevenção. O pré-tratamento com dipiridamol, um bloqueador do transporte de adenosina, piorou ainda mais os efeitos causados pelo etanol. Considerando as mudanças que ocorrem nos níveis extracelulares de adenosina após exposições ao etanol e o envolvimento do sistema purinérgico em estágios iniciais do desenvolvimento, nossos resultados sugerem que existe

uma ação combinada da enzima ecto-5'-nucleotidase e dos transportadores de nucleosídeos nesta elevação dos níveis extracelulares de adenosina, com ênfase na inibição dos transportadores de nucleosídeos. Adicionalmente, podemos inferir que há uma correlação entre a elevação dos níveis de adenosina e os defeitos morfológicos característicos da exposição ao etanol. Tais resultados sugerem que o sistema purinérgico é um alvo para os efeitos tóxicos induzidos pelo etanol nas fases iniciais do desenvolvimento.

Palavras- chave: Adenosina; ecto-5'-nucleotidase; etanol; zebrafish.

ABSTRACT

The ethanol exposure during early embryonic development can cause morphological and behavioral changes even when ingested in low doses. Growth retardation, microcephaly and mental retardation are some of the features observed in children with FAS (fetal alcohol syndrome) whose mothers ingested ethanol during pregnancy. The mechanisms by which ethanol affects embryonic development and cause such changes have not been fully elucidated. The increase in the extracellular adenosine levels after chronic and acute exposure to ethanol indicates that the purinergic system has an important role in this situation. Adenosine is a neuromodulator that acts through the activation of metabotropic receptors type P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3) and can act as an endogenous neuroprotector. In the extracellular space, adenosine can be produced by sequential hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP) held by ectonucleotidases, a cascade of a family of enzymes located on the cell surface, which the key process to hydrolyze to adenosine is performed by ecto-5'-nucleotidase. The use of zebrafish in toxicology studies and development offers a number of advantages. Its size and breeding allow the maintenance of a large quantity of fish in a relatively small space. The production of a large number of eggs and the development occurs rapidly, and progresses through well-defined steps. Recent studies have employed the zebrafish as a model for fetal alcohol syndrome and demonstrated that embryonic exposure to ethanol results in phenotypes comparable to those observed in other vertebrate models. The objective of this study was to evaluate the role of adenosine metabolism in the morphological and locomotor parameters of zebrafish larvae exposed to ethanol. The results showed that in addition to morphological damage already known, there is a change in the enzymatic activity of ecto-5'-nucleotidase in larvae of seven days, in both treatments, acute and chronic, independent of gene expression form, which in time was not changed. Pre-treatment with AOPCP, an inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, was unable to prevent the morphological damage in a relevant way, although statistically there was a slight prevention. Pre-treatment with dipyridamole, an adenosine transport blocker further worsened the effects caused by ethanol. Considering the changes that occur in extracellular levels of adenosine after exposure to ethanol and the involvement of the purinergic system in early stages of development, our results suggest that there is a combined action of the enzyme ecto-5'-nucleotidase and nucleoside transporters in this rising of extracellular adenosine levels, with emphasis on the inhibition of nucleoside transporters. Additionally, we can infer that there is a correlation between elevated levels of adenosine and

morphological defects after exposure to ethanol. These results suggest that the purinergic system is a target for the toxic effects induced by ethanol in the early stages of development.

Keywords: Adenosine; ecto-5'-nucleotidase, ethanol; zebrafish.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA: Adenosina deaminase

ADH: Álcool desidrogenase

ADP: Adenosina 5'- difosfato

ALDH: Aldeído desidrogenase

AMP: Adenosina 5'- monofosfato

AMPc: Adenosina 5'- monofosfato cíclico

AOPCP: $\alpha\beta$ -metileno-adenosina-5'-difosfato

ATP: Adenosina 5'- trifosfato

C₂H₆O: Etanol

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CEBRID: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

CREB: Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc

CYP2E1: Enzima Citocromo P450 2E1

E-NTPDase: Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

E-NPP: Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases

E-NPP: Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

ENT1: Transportador de nucleosídeo equilibrativo 1

ERA: Efeitos relacionados ao álcool

FASE: Fundação de Atendimento Sócio-Educativo

GMP: Guanosina 5'- monofosfato

GPI: Fosfatidil-inositol-glicano

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

K⁺: Potássio

Na⁺: Sódio

NF- κ B: Fator Nuclear kappa beta

NGF: Fator de crescimento neuronal

O₂⁻: Ânion superóxido

OH: Radical hidroxila

OMS: Organização Mundial da Saúde

SAF: Síndrome Alcoólica Fetal

SHH: Sonic Hedgehog Homolog

SEMO: Sistema de Enzimas Microssomais Oxidativas

SNC: Sistema Nervoso Central

UMP: Uridina 5'-monofosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características Faciais da Síndrome Alcoólica Fetal-----	19
Figura 2: Ciclopia causada pela exposição ao etanol-----	21
Figura 3: Ectonucleotidasas-----	26

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS	30
CAPÍTULO 2	32
4. ARTIGO CIENTÍFICO	33
CAPÍTULO 3	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66
7. ANEXOS	74

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etanol

1.2 Síndrome Alcoólica Fetal

1.3 Peixe Zebra

1.4 Alterações Morfológicas Induzidas pelo Etanol

1.5 Metabolismo da Adenosina e o Etanol

1.5.1 Adenosina

1.5.2 Ecto-5'-nucleotidase

1.5.3 Adenosina e Etanol

2. JUSTIFICATIVA

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

3.2 Objetivos Específico

1. Introdução

1.1 Etanol

O etanol (C_2H_6O) também conhecido como álcool ou álcool etílico é uma substância psicoativa com propriedades que causam dependência. O produto da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução a acetaldeídos, tem sido amplamente utilizado em muitas culturas ao longo dos séculos (Marek e Kraft, 2014; OMS, 2014).

Segundo o Relatório Mundial sobre álcool e saúde, publicado em 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo mundial de álcool em 2010 foi igual a 6,2 litros de álcool puro consumidos por pessoa com 15 anos ou mais de idade, que se traduz em 13,5 gramas de álcool puro por dia (OMS, 2014). Com relação a pesquisas sobre o consumo de etanol no Brasil, um estudo epidemiológico realizado pelo CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - em 2007, abrangeu 107 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, correspondendo a 47.045.907 habitantes, ou seja, 27,7% do total de habitantes do Brasil (Galduróz e Carlini, 2007). Esta pesquisa totalizou 8.589 entrevistados na faixa etária compreendida entre 12 e 65 anos e verificou uma prevalência de dependentes de etanol de 17,1% nos homens e 5,7% nas mulheres (Galduróz e Carlini, 2007). Os resultados em relação ao uso de etanol no Brasil revelaram que 77,3% dos homens e 60,6% das mulheres já fizeram uso de etanol na vida. Quanto ao uso regular de bebidas alcoólicas (mínimo de 3 a 4 vezes por semana, incluindo aqueles que bebem diariamente), 9,1% dos homens e 1,7% das mulheres fazem uso regular de etanol. Dos 18 aos 24 anos, 5,6% dos homens e 1,4% das mulheres bebem álcool regularmente (Galduróz e Carlini, 2007).

A concentração sanguínea de etanol depende da quantidade ingerida e absorvida pelo trato gastrointestinal, do volume de distribuição no organismo e da razão de eliminação. Menos de 10% do etanol é excretado no suor, respiração e urina (Marek e Kraft, 2014). A maioria dos tecidos do organismo contém enzimas capazes de metabolizar o etanol, mas a atividade mais significativa dessas enzimas ocorre no fígado e, em menor extensão, no estômago (Cassini e Linden, 2011; Chaudhuri, 2000). A maior fração do etanol é metabolizada no fígado pela ação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Em humanos, a enzima álcool desidrogenase, mais precisamente da classe 1, converte o etanol em acetaldeído, que então sofre a ação da enzima aldeído desidrogenase e é transformado em acetato. O acetato formado no fígado destina-se à corrente

sanguínea onde será captado e utilizado em outros tecidos (Tran et al, 2015; Plawecki e Crabb, 2014) e/ou convertido em acetil-Coenzima A para produzir dióxido de carbono e água (Marek e Kraft, 2014). O metabolismo do álcool também ocorre pela ação do Sistema de Enzimas Microssomais Oxidativas (SEMO) que utiliza as enzimas do grupo citocromo P450, mais especialmente a enzima CYP2E1. CYP2E1 tem um Km elevado para o etanol, portanto, tem um papel mais significativo quando os níveis de álcool no sangue são elevados. CYP2E1 facilmente gera espécies reativas de oxigênio, incluindo radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, CYP2E1 é uma importante fonte na geração de espécies ativas de oxigênio (Plawecki e Crabb, 2014).

Uma terceira forma de metabolização do etanol ocorre através da catalase. A catalase é uma enzima antioxidante que degrada peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Ela pode oxidar uma série de componentes através do uso de peróxido de hidrogênio, incluindo o etanol. A via da Catalase é responsável por cerca de 2% do metabolismo do etanol (Marek e Kraft, 2014).

O estresse oxidativo gerado pelo etanol através do aumento da formação de radicais superóxido e hidroxila via mitocôndria pelas enzimas citocromo P450, durante a oxidação do acetaldeído a acetato, ataca carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, provocando danos que poderão levar à morte celular (Goodlett, Horn e Zhou, 2005). A ingestão de etanol também diminui as defesas endógenas antioxidantes através da inibição da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (Li e Wang, 2004).

No sistema hepático de organismos adultos, o uso crônico do etanol é um dos responsáveis pela causa e progressão da esteatose hepática para estágios mais críticos de esteato-hepatite seguida por fibrose, cirrose e as fases finais da doença hepática, onde há degeneração do fígado, sendo também um potente cofator na patogênese do carcinoma hepatocelular (Setshedi, Wands e de la Monte, 2010).

No trato gastrointestinal, o etanol pode prejudicar a função dos músculos que separam o esôfago do estômago, favorecendo a ocorrência de azia (Bode, 2003; Bode e Bode, 1997). O etanol pode causar danos nos revestimento da mucosa do esôfago, também aumentando o risco de cancro do esôfago (Bode e Bode, 1997). No estômago, o etanol interfere na secreção de ácido gástrico e na atividade dos músculos, além disso, inibe a absorção de nutrientes no intestino delgado e aumenta o transporte de toxinas através das paredes intestinais, efeitos que

podem contribuir para o desenvolvimento de danos relacionados com o etanol no fígado e outros órgãos (Bode, 2003; Bode e Bode, 1997).

No sistema cardiovascular, embora o uso moderado e em baixas doses de etanol tenha um efeito protetivo, quantidades excessivas contribuem nos efeitos negativos da aterosclerose e há aumento do risco de problemas cardiovasculares. A toxicidade do acetaldeído e a degeneração vascular também podem contribuir com as doenças do fígado, causando lesão isquêmica crônica mediada pela aterosclerose da aorta e artéria hepática. Além disso, o abuso do etanol leva a hipertensão arterial, arritmias cardíacas e cardiomiopatia não isquêmica (Setshedi, Wands e de la Monte, 2010).

No sistema hematopoiético o uso do etanol de forma crônica afeta os eritrócitos e as funções de coagulação, promovendo mudanças morfológicas nas células vermelhas do sangue e macrocitose eritrocitária. Estes efeitos têm sido correlacionados com a presença de auto anticorpos na membrana dos eritrócitos modificados pelo acetaldeído (Setshedi, Wands e de la Monte, 2010). As consequências desses ataques mediados pelo sistema imunológico aos eritrócitos ainda não estão bem esclarecidas, mas sabe-se que pode ocorrer aumento na destruição das células vermelhas do sangue, e assim, promover anemia e aumento de ferro no fígado, o que também contribui para a doença hepática. Nas funções de coagulação, o acetaldeído inativa a trombina, os fatores de coagulação Xa, II, VI, X e o fibrinogênio (Setshedi, Wands e de la Monte, 2010).

Em adultos, as exposições ao etanol podem causar doenças debilitantes do sistema nervoso central, periférico e junção neuromuscular. Exposições de longo período ao etanol levam à perda desproporcional de substância branca cerebral e deficiências nas funções executivas (de la Monte e Kril, 2014). O sistema nervoso central, por conter baixos níveis de antioxidantes, alta concentração de lipídeos e consumir muito oxigênio, torna-se suscetível ao estresse oxidativo induzido pelo etanol (Li e Wang, 2004). Os danos cerebrais exercidos pelo etanol culminam em vários mecanismos. Em geral, ocorre a ativação de vias de indução de morte celular pela formação de moléculas tóxicas (Goodlett, Horn e Zhou, 2005). Os oligodendrócitos e terminais sinápticos são os principais alvos do etanol no sistema nervoso, quando afetados levam à inflamação, toxicidade neural e deficiências na sinaptogênese (de la Monte e Kril, 2014).

O etanol tem efeitos neurotóxicos e teratogênicos devastadores sobre o desenvolvimento cerebral. O etanol prejudica a função de neurônios e células da glia, interrompendo uma ampla gama de funções incluindo a sobrevivência neuronal, a migração e a diferenciação celular (de la Monte e Kril, 2014). A exposição ao etanol leva ao prejuízo do desenvolvimento neuronal por inibição de fatores neurotróficos e déficit de energia celular. O etanol prejudica a produção de energia celular por alterar o transporte e a utilização de glicose, provocando prejuízo no neurodesenvolvimento (Goodlett, Horn e Zhou, 2005). O conjunto de efeitos relacionados à exposição ao etanol em fases iniciais do desenvolvimento é associado ao espectro da Síndrome Alcoólica Fetal.

1.2 Síndrome Alcoólica Fetal

Há mais de quatro décadas já são conhecidas às características da Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) em humanos, pois os efeitos da exposição pré-natal ao etanol foram relatados pela primeira vez em 1968, na França (Lemoine et al, 1968) e nomeados como SAF em 1973 (Jones e Smith, 1973), em referência a um conjunto de características no desenvolvimento de crianças cujas mães ingeriram etanol durante a gestação. Admite-se que o índice de prevalência mundial se encontra em média entre 0,5 a 2 casos de SAF completa para cada 1.000 nascidos vivos, em várias populações (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2009).

Entre os efeitos da exposição neonatal ao etanol estão as anormalidades neurológicas, disfunções comportamentais, atrasos no desenvolvimento, deficiências intelectuais e certas características faciais como fissuras palpebrais curtas, filtro nasal achatado, face média hipoplásica, pregas epicânticas, ponte nasal baixa, baixa implantação de orelhas e lábio superior fino (CDC, 2009; Momino, Sanseverino e Schüler–Faccini, 2008) (Figura 1).



Figura 1: Características Faciais da Síndrome Alcoólica Fetal (Volpato et al, 2011).

A Síndrome Alcoólica Fetal pode ser completa, apresentando todo o quadro de características, ou parcial, quando apresentar apenas as alterações faciais e retardo de crescimento ou disfunções cerebrais. Também é reconhecida uma categoria dos efeitos relacionados ao álcool (ERA), que estão presentes em indivíduos que não apresentam todas as características necessárias para serem considerados portadores de SAF, porém possuem malformações e/ou desordens neuropsicomotoras associadas ao consumo materno moderado de álcool (O'Malley e Storoz, 2003).

O etanol atravessa livremente a barreira placentária e se distribui pelo líquido amniótico, atingindo os tecidos do feto. A difusão passiva do etanol ocorre por gradiente de concentração de tal maneira que os níveis sanguíneos, materno e fetal, são similares até que todo o etanol seja metabolizado (Rojas e Hicks, 1990). A exposição fetal é um pouco maior, devido ao metabolismo e eliminação serem mais lentos, visto que os fetos não possuem a quantidade necessária de enzimas para sua biodegradação e, desta forma, o líquido amniótico fica impregnado de etanol não modificado e de acetaldeído (Chaudhuri, 2000).

Os efeitos da exposição ao etanol podem ser vistos em qualquer período da gestação. O primeiro trimestre constitui o período de maior neuromigração e a exposição ao etanol nessa

fase pode levar a alterações do córtex cerebral, do corpo caloso e da comissura anterior (Kaup, Merighi e Tsunechiro, 2001). As heterotopias neurogliais e as disgenesias corticais resultam das exposições durante o segundo trimestre e as alterações na substância branca ocorrem no terceiro trimestre, onde também ocorre um rápido desenvolvimento cerebral e de organização essencialmente neurofisiológica (Ribeiro e Gonzalez, 1995).

A pesquisa sobre a teratogênese do etanol já demonstrou que o sistema nervoso é a parte mais vulnerável do organismo aos efeitos da exposição pré-natal ao etanol (Goodlett, Horn e Zhou, 2005; Mukherjee et al, 2005). Problemas de comportamento social estão se tornando uma seqüela frequentemente encontrada em indivíduos expostos ao etanol durante a gestação. As crianças com SAF apresentam dificuldades emocionais e comportamentais que podem levar a uma série de problemas secundários (Momino, 2005). Um estudo realizado por Momino (2005) observou o comportamento antissocial em 262 adolescentes da Fundação de Atendimento Sócio-Educativo - FASE (Porto Alegre, RS, Brasil). Neste estudo, foi registrado que 49% deles tiveram exposição pré-natal ao etanol. Indivíduos com SAF são mais propensos a desenvolver problemas de conduta, comportamento sexual agressivo e carência de interação social (Whaley, O'Connor e Gunderson, 2001).

Considerando os efeitos devastadores do etanol e as seqüelas sócio-econômicas do abuso de etanol em fases iniciais do desenvolvimento, alguns modelos animais têm sido utilizados na pesquisa dos efeitos do etanol sobre o desenvolvimento, visando caracterizar os mecanismos pelos quais o etanol exerce seus efeitos como subsídio para campanhas de conscientização para o controle da exposição ao etanol. Dentre estes modelos animais estão: ratos, camundongos (Leu et al., 2014; Lantz et al., 2014; Goggin et l., 2014), galinhas (Rao e Chaudhuri, 2007; Tufan et al., 2007) e peixes de diferentes espécies, entre os quais se destaca o peixe-zebra (*Danio rerio*) (Dasmahapatra e Khan, 2014; Kashyap, Frederickson e Stenkamp, 2007; Arenzana et al., 2006).

1.3 Etanol e peixe-zebra

A utilização do peixe-zebra em estudos de desenvolvimento está em ascensão, visto que ele oferece uma série de vantagens. Seu tamanho e a forma de criação permitem a manutenção de uma grande quantidade de peixes em um espaço relativamente pequeno. O

cruzamento resulta em um grande número de ovos e o desenvolvimento ocorre rapidamente, e progride através de etapas bem definidas (Kimmel et al, 1995; Westerfield, 2000).

Estudos recentes têm empregado o peixe-zebra como modelo para a síndrome alcoólica fetal e demonstrado que a exposição embrionária ao etanol resulta em fenótipos comparáveis com aqueles observados em outros modelos vertebrados, o que sugere que o peixe-zebra é um modelo relevante para entender os danos causados pelo etanol ao longo do desenvolvimento (Howarth, Passeri e Sadler, 2011).

Alguns dos danos causados pela exposição embrionária ao etanol em peixe-zebra são: Microftalmia (Kashyap, Frederickson e Stenkamp, 2007), ciclopia (Arenzana et al, 2006) (Figura 2), hiperplasia do nervo óptico e inibição de fotoreceptores, anormalidades cardíacas (Bilotta et al, 2004), aumento da morte celular na parte posterior do cérebro (Loucks e Carvan, 2004; Carvan et al, 2004), desenvolvimento craniofacial e neurocranial anormal, desenvolvimento anormal de tecidos axiais e diminuição do comprimento do peixe (Loucks e Carvan, 2004). Tais efeitos da exposição aguda e crônica ao etanol em larvas e embriões de peixe-zebra são relacionáveis com os efeitos vistos na síndrome alcoólica fetal em humanos e parecem estar fortemente relacionados com a concentração utilizada de etanol (Loucks e Carvan, 2004).

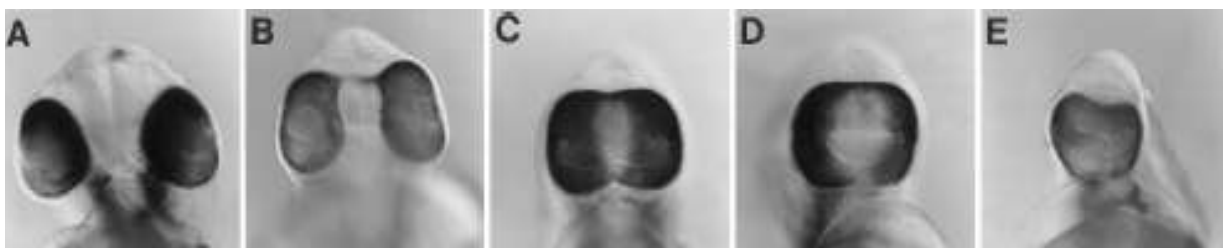


Figura 2: Ciclopia causada pelo tratamento com etanol. A exposição ao etanol 2,4% foi realizada 10 minutos depois da desova durante 3 horas. Embriões foram avaliados para ciclopia durante o segundo dia de desenvolvimento. (A) Controle. (B) Embriões tratados com etanol com olhos próximos. (C, D e E) Embriões tratados com etanol, com aumento da severidade da ciclopia. Os embriões são mostrados de forma frontal, dorsal. Figura obtida de Blader e Strahle (1998).

Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao etanol, tanto de forma aguda quanto crônica, também apresentam mudanças de comportamento (Carvan et al, 2004; Lockwood et al, 2004; Fernandes e Gerlai, 2009). Alguns estudos que utilizaram doses entre 1,5 e 10% de etanol realizados com embriões de peixe-zebra, levaram a altas taxas de mortalidade e deformidades nos sobreviventes (Arenzana et al, 2006; Bilotta et al, 2004; Ali et al, 2011). Entretanto, a exposição a doses entre 0,5 e 1% de etanol, por duas horas, em ovos de 24 horas pós fertilização (hpf), demonstrou dissociação do comportamento de *shoaling* (comportamento de grupo) na fase adulta do peixe-zebra (6 a 7 meses), em função da exposição ao etanol (Fernandes e Gerlai, 2009).

Mudanças como a redução no *shoaling*, vista na exposição embrionária ao etanol podem, em parte, corresponder a alterações no comportamento social em humanos (Fernandes e Gerlai, 2009). Entretanto, o comportamento de *shoaling* é exibido em peixe-zebra somente a partir de, aproximadamente, 2 meses de vida, sendo necessário, portanto, outros parâmetros possíveis de serem avaliados em períodos anteriores (Buske e Gerlai, 2012; Mahabir et al, 2013).

De fato, avaliações mais tênues de alterações comportamentais já podem ser vistas na fase juvenil do peixe-zebra, tais como hiperatividade na larva exposta a baixas doses de etanol e hipoatividade com altas doses (Lockwood et al, 2004; Tal et al, 2012).

1.4 Alterações morfológicas induzidas pelo etanol

Além das alterações neurofisiológicas induzidas pelo etanol e seus reflexos comportamentais, as alterações morfológicas são características marcantes da exposição a esta droga, em especial durante as fases iniciais do desenvolvimento. Diferentes mecanismos, incluindo atraso do desenvolvimento geral, aumento da morte celular, decréscimo da proliferação celular, ou diminuição da diferenciação das células estão envolvidos nos defeitos morfológicos causados pela exposição ao etanol, e estão localizados principalmente na área craniofacial, dando ênfase aos defeitos oculares (Stenkamp et al, 2002).

A alteração da expressão de alguns genes no início do desenvolvimento é também um dos mecanismos envolvidos nas alterações morfológicas características da SAF. Os genes *gli1*, *six3b* e *gsc*, são exemplos de genes que diminuem a expressão depois da exposição ao etanol.

Dentre esses, os genes *six3b* e *gsc* são expressos em tecidos que contribuem para a formação dos tecidos craniofaciais (Loucks e Ahlgren, 2012). Segundo o estudo de Loucks e Ahlgren (2012), a expressão diminuída desses genes durante a exposição de larvas de peixe-zebra ao etanol reflete na redução da distância intraocular.

As proteínas SHH (*Sonic Hedgehog Homolog*) são importantes morfógenos no desenvolvimento do sistema nervoso central e sua alteração causa diversos defeitos morfológicos (Arenzana et al, 2006; Loucks, Schwend e Ahlgren, 2007; Loucks e Ahlgren, 2009). A sinalização por SHH parece estar envolvida em algumas alterações craniofaciais, principalmente oculares, provenientes da exposição ao etanol no período de desenvolvimento, onde ocorre uma diminuição da expressão do gene *shh* (Loucks, Schwend e Ahlgren, 2007).

Alguns estudos também sugerem que o dano celular ocasionado pela exposição ao etanol é relacionado ao estresse oxidativo causado por enzimas pró-inflamatórias ativadas durante a exposição ao etanol (Crews e Nixon, 2009). O uso do etanol está associado à degeneração neuronal pela alteração de fatores de transcrição como, por exemplo, o aumento do fator de transcrição NF- κ B e diminuição do CREB. O NF- κ B é ativado pelo estresse oxidativo, citocinas e glutamato, e tem um importante papel na indução de citocinas pró-inflamatórias e enzimas que desencadeiam a cascata pró-inflamatória. O balanço na atividade destes fatores de transcrição regula a sobrevivência/inflamação celular, assim aumentando ou diminuindo a neurogênese (Yakovleva et al, 2011). Com relação ao CREB, estudos têm demonstrado que ele é responsável pela modulação de funções como desenvolvimento do sistema nervoso central, memória, aprendizado, plasticidade neuronal, bem como, no processo de dependência a drogas de abuso (Lonze e Ginty, 2002). Estudos realizados em ratos mostram que em geral, os animais têm preferência pelo etanol quando os níveis de CREB estão baixos (Pandey et al., 2005). A correlação entre o aumento do comportamento ansioso e o aumento do consumo de etanol também foi observada em camundongos haplodeficientes para CREB, quando comparados com animais selvagens (Pandey et al., 2005).

Como descrito acima, inúmeros sistemas são afetados pela exposição ao etanol e os mecanismos que operam no surgimento dos efeitos a esta exposição são ainda pouco conhecidos. A busca por moléculas que desempenhem papel importante no desenvolvimento dos efeitos danosos do etanol é de especial relevância. Sabe-se que modelos animais expostos de forma aguda ou crônica ao etanol exibem níveis extracelulares elevados de adenosina

(Clark e Dar, 1989). Embora o papel fisiológico do sistema purinérgico, em especial da adenosina, seja amplamente conhecido e muito explorado em diversas patologias, os possíveis mecanismos pelos quais os níveis extracelulares de adenosina são elevados após exposição ao etanol e a existência de correlação com os danos morfológicos e comportamentais causados pelo etanol ainda não estão bem descritos na literatura.

1.5 Metabolismo da adenosina e o Etanol

1.5.1 Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo presente no meio intra e extracelular. No meio intracelular, a adenosina exerce um papel homeostático participando do balanço energético celular. No meio extracelular, a adenosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores específicos localizados na membrana celular, denominados receptores purinérgicos P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) (Fredholm et al, 2005). Tais receptores são amplamente encontrados na escala zoológica e, em peixe-zebra, os receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} já foram descritos, sendo o A_{2A} o produto de dois genes (Capiotti et al, 2011; Boehmler et al, 2009). Estudos em humanos e roedores, indicam que estes receptores são diferentes quanto à afinidade pelo ligante, distribuição tecidual, via de sinalização e perfil farmacológico (Dunwiddie e Masino, 2001; Fredholm et al, 2001). Os receptores A_1 e A_3 são de caráter inibidor, e inibem a enzima adenil ciclase que degrada ATP em AMPc e os receptores A_{2A} e A_{2B} são facilitadores e estimulam a adenil ciclase (Fredholm et al, 2005). Os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade pelo ligante, enquanto que os receptores A_{2B} e A_3 apresentam menor afinidade (Sebastião e Ribeiro, 2000). Dentre os receptores de maior afinidade pela adenosina, os receptores A_1 apresentam um Kd de 70 nM, enquanto que os receptores A_{2A} um Kd de 150 nM de adenosina, o que promove uma ativação tônica destes receptores (Dunwiddie e Masino, 2001).

Os receptores A_1 atuam na inibição da adenil ciclase através da ativação da proteína G_i e estão localizados em várias regiões do cérebro, como hipocampo, tronco cerebral, medula espinhal e gânglios basais (Guillén-Gómez et al, 2004; Rathbone et al, 1999) e os seguintes efeitos também estão envolvidos na ativação dos receptores A_1 : guanilil ciclase, canais de K^+ , canais de cálcio dependentes de voltagem, a fosfolipase C e a fosfolipase A_2 (Guillén-Gómez et al, 2004; Collis e Houani, 1993; Scheimann e Hicks, 1991). Diferentemente dos

receptores A_1 , os receptores A_2 estimulam a adenil ciclase acoplando-se à proteína G_s e provocando o aumento dos níveis de AMP_c (Olah e Stiles, 1990; Ruby et al, 2010).

Para manter os níveis intra e extracelular da adenosina em equilíbrio, a adenosina que é formada intracelularmente pode difundir-se através da membrana celular por meio de transportadores de nucleosídeos equilibrativos (ENT1 e ENT2) para o espaço extracelular (Nagai, Nagasawa e Fujimoto, 2005). Transportadores de nucleosídeos concentrativos (CNT) também são encontrados no sistema nervoso central e transportam a adenosina de forma acoplada ao gradiente de Na^+ (Fredholm et al, 2005).

No meio extracelular, a adenosina pode ser produzida a partir da hidrólise sequencial do ATP, exercida pela cascata das ectonucleotidases (Zimmermann, 2001). A cascata das ectonucleotidases é composta pelas famílias de enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), fosfatase alcalina e a ecto-5'- nucleotidase (Zimmermann, 2001; Zimmermann, 1996; Cunha, 2001). A hidrólise seqüencial dos nucleotídeos 5'- trifosfatados até adenosina, tem a ecto-5'- nucleotidase como enzima chave, uma vez que ela é a enzima marcapasso nesse processo (Fredholm et al, 2001).

A adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas por catalisar a conversão da adenosina e da deoxiadenosina a inosina e deoxiinosina, respectivamente. A ADA pode ser encontrada como uma enzima citosólica e também pode ser expressa na superfície celular como uma ectoenzima. Dois membros desta família já foram descritos, sendo eles denominados como ADA1 e ADA2 (Hirschhorn e Ratech, 1980; Zavialov & Engström, 2005), além de um grupo similar desta família de proteínas denominado ADAL (adenosine deaminase-like) (Maier et al., 2005). Todos estes membros foram classificados como subfamílias pertencentes ao grupo das adenil-desaminases. Por apresentar sítios de aminoácidos importantes relacionados à desaminação de adenosina e motivos conservados entre as subfamílias da ADA, é possível que a ADAL também realize a desaminação hidrolítica de adenosina à inosina (Maier et al., 2005). A conversão de adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina respectivamente, também contribui para controle dos níveis de adenosina.

1.5.2 Ecto-5'-nucleotidase

A família das 5' nucleotidases é composta por sete diferentes 5' nucleotidases, com distinta localização celular. São elas, a 5' nucleotidase IA, IB, II, e III, e a 5'(3') deoxinucleotidase, as quais são citosólicas, a 5'(3') desoxinucleotidase mitocondrial e a Ecto-5'-nucleotidase (Bianchi e Spsychala, 2003).

A ecto-5'-nucleotidase é uma proteína de membrana ancorada à superfície celular por um fosfatidil-inositol-glicano (GPI) (Zimmermann, 1994) (Figura 3).

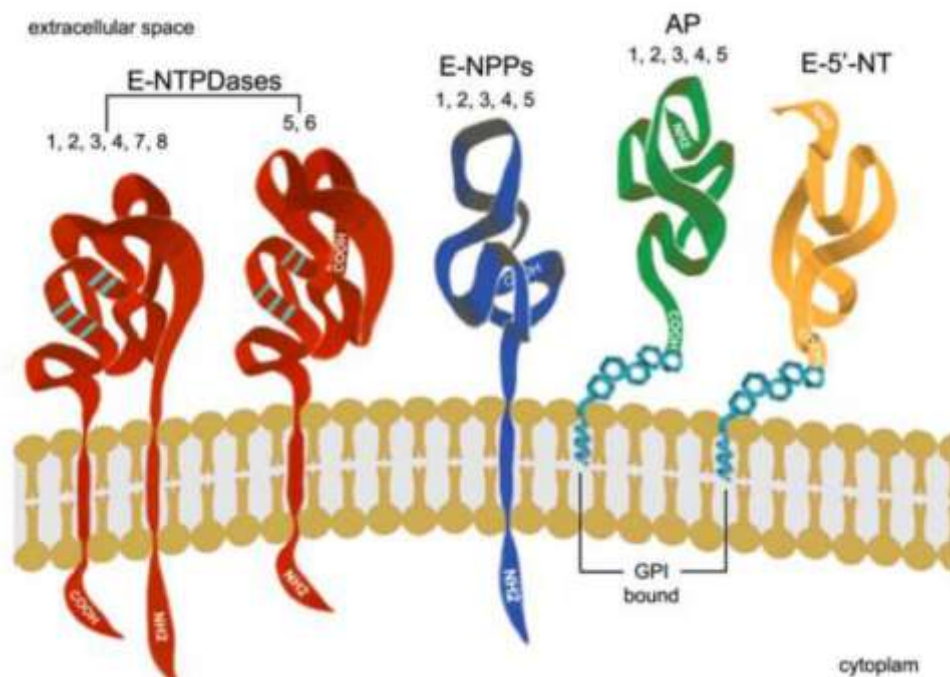


Figura 3: NTPDases e a 5'-nucleotidase são as enzimas que atuam na conversão de ATP a adenosina. Fosfatases alcalinas hidrolisam nucleotídeos monofosfatados e as NPPs atuam no catabolismo extracelular dos dinucleotídeos. Figura obtida de Cognato e Bonan, 2010.

A ecto-5'-nucleotidase consiste em 548 aminoácidos com uma massa molecular de 61 kDa, com aproximadamente 25 resíduos hidrofóbicos na cauda C terminal (Strater, 2006).

Formas solúveis da enzima podem ser originadas mediante a ação de uma fosfolipase específica (Strater, 2006). Estudos da estrutura da ecto-5'-nucleotidase por meio de raio-X em *Escherichia coli* mostram que a enzima consiste em dois domínios, o domínio N-terminal com dois íons metálicos bivalentes catalíticos, e o domínio C-terminal fornecendo o sítio específico para os nucleotídeos (Strater, 2006).

A atividade enzimática das ecto-5'-nucleotidases é dependente de cátions divalentes, como cálcio e magnésio. A enzima encontra-se presente na maioria dos tecidos e seus principais substratos são nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, sendo o AMP o nucleotídeo hidrolisado com maior eficiência (Zimmermann, 1996). A atividade das enzimas desta família pode ser alterada por moduladores alostéricos, como por exemplo, H^+ , fosfato inorgânico, Mg^{2+} , ADP ou ATP (Heyliger, Panagia e Dhalla, 1981).

A ecto-5'-nucleotidase age completando o passo final na hidrólise de ATP à adenosina e está envolvida em inúmeros processos fisiológicos. Através da ativação dos receptores de adenosina as concentrações do AMPc intracelular são aumentadas, o que, por exemplo, no endotélio vascular está ligado as funções de permeabilidade (Thompson et al., 2004). Quando ocorrem alterações na permeabilidade vascular, há um aumento agudo de macromoléculas causado pelo vazamento vascular, e isso coincide com injúria ao tecido e pode resultar em perda de fluído, edema e disfunções no órgão (Thompson et al., 2004; Jian et al., 2011). Além de agir na permeabilidade endotelial, a ecto-5'-nucleotidase atenua a adesão de neutrófilos e estimula a secreção de cloreto, que é responsável pela hidratação das mucosas (Thompson et al., 2004). A ecto-5'-nucleotidase também pode funcionar independentemente da sua atividade enzimática. Como muitas moléculas ancoradas ao fosfatidil-inositol-glicano, ela ativa as células T quando ligada por anticorpos e medeia a ligação de linfócitos. A ecto-5'-nucleotidase pode agir também como molécula de adesão promovendo a ligação de laminina e fibronectina à matriz extracelular e promovendo a interação entre linfócitos e células endoteliais (Jian et al., 2011). A ecto-5'-nucleotidase é importante também na maturação das células vermelhas, pois é altamente expressa nos eritrócitos e participa da degradação de RNA durante a sua maturação. A anemia hemolítica hereditária causada por uma mutação na ecto 5' nucleotidase citosólica destaca a importância do seu papel na maturação das células vermelhas do sangue (Bianchi e Spsychala, 2003). A ecto-5'-nucleotidase está envolvida também no crescimento de tumores através da angiogênese, uma vez que ela participa na

indução da formação de células endoteliais e novos vasos nos tumores, facilitando seu crescimento e metástase (Wang et al., 2013).

No SNC, a atuação da ecto-5'-nucleotidase sobre a produção de adenosina impacta diretamente a neurotransmissão, visto que através da ativação dos receptores específicos, a adenosina atua como neuromodulador endógeno e apresenta forte ação depressora sobre a atividade neuronal, principalmente através da ativação de receptores A_1 (Cunha, 2005; Fredholm et al, 2005). Já pela ativação dos receptores A_{2A} a adenosina medeia ações excitatórias através de um aumento na liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (Li e Henry, 1998).

A ausência da ecto-5'-nucleotidase durante o desenvolvimento do sistema nervoso impede a diferenciação neuronal e leva a morte celular. Segundo Zimmermann (1996), o contato de neurônios em migração ou crescimento com outras células expressando a ecto-5'-nucleotidase leva a um aumento significativo na duração dos processos neuríticos induzidos por NGF (fator de crescimento neuronal) e sugere que a ecto-5'-nucleotidase pode ter um efeito trófico sobre a extensão neurítica. Já a aplicação de anticorpos que inibem a atividade da ecto-5'-nucleotidase ou a aplicação de AOPCP ($\alpha\beta$ -metileno-adenosina-5'-difosfato), um inibidor competitivo da atividade da ecto-5'-nucleotidase, resulta em uma diminuição da formação de neuritos induzidos pelo NGF (Zimmermann, 1996).

A ecto-5'-nucleotidase é essencial no desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Heilbronn, 1995). No SNC, está predominantemente associada às células gliais, tendo sido identificada na membrana plasmática de astrócitos, oligodendrócitos, microglia e gliomas (Zimmermann, 2006). No que se refere ao modelo animal aqui estudado, o peixe-zebra, vários estudos já demonstram a presença da atividade de hidrólise de AMP, bem como a expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase em teleósteos, inclusive em membranas cerebrais de peixe-zebra (Senger et al, 2004; Rico et al, 2008).

1.5.3 Adenosina e etanol

A adenosina parece estar envolvida nas respostas neuroquímicas e comportamentais causadas pela exposição aguda e crônica ao etanol. Embora a adenosina não seja a única

responsável pelas alterações causadas pelo etanol, ela tem um papel neuromodulador que afeta as funções de muitos neurotransmissores que também estão envolvidos nas respostas à exposição ao etanol (Dohrman, Diamond e Gordon, 1997).

Exposições agudas e crônicas ao etanol através de diversas metodologias indicam alterações nos níveis extracelulares de adenosina. A exposição aguda de linhagens celulares e frações biológicas ao etanol indica que o etanol reduz a recaptação de adenosina, em especial, por reduzir a atividade de transportadores bidirecionais de nucleosídeos, levando ao aumento das concentrações extracelulares de adenosina (Clark e Dar, 1989; Sharma et al, 2010; Choi et al, 2004; Krauss et al, 1993). A exposição aguda ao etanol também resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMP_c dependente de adenosina que é mediado pela ativação dos receptores A_{2A}, embora, os receptores A_{2A} tornem-se desensibilizados com a exposição prolongada ao etanol (Tracy e Mark, 2012; Jarvis e Becker, 1998). O transportador de nucleosídeos ENT1 parece desempenhar papel importante no que se refere aos efeitos motores do etanol, visto que, animais sem a expressão destes possuem respostas hipnóticas e de ataxia reduzidas após a exposição ao etanol (Choi et al, 2004).

Estudos *in vivo* sugerem mudanças na expressão dos receptores A₁, mas não dos A_{2A}, em Sistema Nervoso Central, após a exposição crônica ao etanol (Daly, 1994). Um aumento na densidade dos receptores A₁ é descrito quando há múltiplas exposições/retiradas ao etanol, sugerindo que o aumento de receptores A₁ é potencializado por múltiplos períodos de hiperexcitabilidade produzidos pela retirada do etanol (Tracy e Mark, 2012). Daly et al. (1994) relataram significativo aumento na expressão dos receptores A₁ no córtex cerebral depois de 7 dias de consumo de etanol em camundongos, mas não houve mudança na expressão de receptores A_{2A} no estriado.

Alterações na expressão dos receptores A₁ de adenosina podem ser dependentes do método de administração do etanol, do tempo de exposição, dos períodos de abstinência e talvez da espécie animal usada, mas todos os modelos parecem produzir algumas mudanças na participação dos receptores de adenosina podendo impactar no tônus adenosinérgico basal e assim afetar a excitabilidade neural (Jarvis e Becker, 1998).

Os receptores de adenosina A₁ medeiam vários efeitos do etanol, e antagonistas dos receptores A₁ atenuam a descoordenação motora induzida pelo etanol, indicando que a sinalização mediada por receptores A₁ está envolvida nos efeitos de ataxia do etanol

(Dohrman, Diamond e Gordon, 1997). Já os agonistas de receptores A_1 diminuem efeitos como ansiedade, tremor e convulsões durante a retirada aguda do etanol (Ruby et al, 2010). Respostas ansiolíticas a exposição aguda ao etanol são também alteradas por agonistas de receptores de adenosina (Prediger, Batista e Takahashi, 2004).

Em ratos, a exposição aguda ao etanol diminui o estado de vigília e aumenta o movimento dos olhos durante o sono. Esses efeitos são revertidos pela administração de um antagonista de receptores de A_1 (DPCPX) (Thakkar et al, 2010). Também já foi visto que antagonistas dos receptores A_{2A} diminuem o nível de consumo de etanol em ratos que preferiam etanol anteriormente (Adams et al, 2008).

2. Justificativa

A síndrome alcoólica fetal é uma manifestação severa da exposição fetal ao etanol. Ela se apresenta com defeitos na face e órgãos, retardo mental devido a desordens e dano no desenvolvimento do cérebro. Apesar de frequentes campanhas chamando a atenção para os efeitos do uso do etanol durante a gestação, permanece a preocupação com a ingestão social desta bebida em pequenas doses, bem como nos períodos iniciais, onde a gestação pode ainda não ter sido confirmada.

Levando em conta que a síndrome alcoólica fetal atinge fetos de mulheres grávidas que consomem álcool em altas doses e também considerando aquelas que consomem pequenas doses diárias as quais podem gerar efeitos mais sutis, torna-se interessante avaliar em modelos animais a exposição ao etanol e seus efeitos sobre sistemas importantes para o desenvolvimento cerebral, tal como o sistema purinérgico, em especial o metabolismo da adenosina, uma vez que os mecanismos envolvidos nesse processo e nos danos morfológicos e comportamentais causados pelo etanol ainda não estão bem descritos na literatura. O uso do peixe-zebra nesta abordagem é interessante visto que fases iniciais do desenvolvimento podem ser observadas através do desenvolvimento extra-uterino em ovos translúcidos, além

disto, existe um vasto repertório de análises de parâmetros locomotores, comportamentais, morfológicos e bioquímicos aplicáveis neste estudo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliação do papel do metabolismo da adenosina nos parâmetros morfológicos e locomotores de larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) expostas ao etanol

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase em larvas de peixe-zebra expostas ao etanol de forma aguda e crônica.
- Avaliar a expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase em larvas de peixe-zebra expostas ao etanol de forma aguda e crônica.
- Avaliar o efeito da adenosina-5'-difosfato (AOPCP), um inibidor da ecto-5'-nucleotidase sobre a morfologia de larvas de peixe-zebra expostas ao etanol de forma aguda.
- Avaliar o efeito do dipiridamole, um inibidor de transportador de nucleosídeo, sobre a morfologia de larvas de peixe-zebra expostas ao etanol de forma aguda.

CAPÍTULO 2

4. ARTIGO CIENTÍFICO

**Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in
zebrafish larvae**

**Aline Haab Lutte, Katiucia Marques Capiotti, Nicole Luize Garcia da Silva, Carolina
Silveira de Oliveira da Silva, Luiza Wilges Kist, Maurício Reis Bogo, Rosane Souza Da
Silva**

Artigo submetido ao periódico *Reproductive Toxicology* em 19 de Dezembro de 2014.

Title Page

Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae

Authors full name:

Aline Haab Lutte¹, Katiucia Marques Capiotti¹, Nicole Luize Garcia da Silva¹, Carolina Silveira de Oliveira da Silva¹, Luiza Wilges Kist², Maurício Reis Bogo^{2,3}, Rosane Souza Da Silva^{1,3,*}.

Institutional Affiliations:

1 Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Contact details of the corresponding author

Postal Address: Faculdade de Biociências, PUCRS,

Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/ Fax: + 55 51 3320 3500/ Ext. 4158/+ 55 51 3320 3612

e-mail: rosane.silva@pucrs.br

ABSTRACT

The effects of ethanol exposure on extracellular adenosine sources in zebrafish were evaluated. In the acute treatment, the embryos were exposed to 2% ethanol on day 1 post-fertilization (dpf). In the chronic treatment, the exposure was continued for 2 h/day up to 6dpf. Ecto-5'-nucleotidase activity was assessed by colorimetric method and gene expression determined by RT-qPCR in 7dpf zebrafish. Body length, ocular distance and surface area of the eyes were registered in animals acutely exposed to ethanol and pretreated with AOPCP (5 to 500 nM), an ecto-5'-nucleotidase inhibitor, or dipyridamole (10 to 100 μ M), a blocker of nucleoside transport. Both ethanol exposures promoted increased ecto-5'-nucleotidase activity, impaired locomotion and morphology. Ecto-5'-nucleotidase expression was not affected. AOPCP promoted mild prevention of morphological defects caused by acute treatment, while dipyridamole worsened these defects. Early ethanol exposure altered adenosinergic tonus, especially through nucleoside transporters, contributing to morphological defects produced by ethanol in zebrafish.

Keywords: Adenosine; ecto-5'-nucleotidase, ethanol; zebrafish.

1. INTRODUCTION

Prenatal exposure to ethanol has been shown to produce the overt physical and behavioral symptoms known as fetal alcohol syndrome in humans (FAS) [1]. Growth retardation, microcephaly and mental retardation appear as hallmarks of this syndrome. The mechanism underlining ethanol effects during early exposure is poorly understood, while some consensus was achieved, such as the enhanced activity of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis linked to long-term behavioral effects, the apoptosis of specific groups of cells linked to facial abnormalities and the age dependence of ethanol effects [2][3][4]. In fact, ethanol is able to alter the expression of genes located in the nervous system, such as α 1-tubulin, *ngn1*, *Mbp* and *gfap*, which are involved in the regulation of neuronal growth [5], cell fate [6], myelination [7] and the formation of the cytoskeletal structure [8].

Changes in extracellular levels of adenosine were detected after acute and chronic ethanol exposure through various methodologies indicating the involvement of the purinergic system in the biological effects of ethanol. Acute exposure of cell lines and biological fractions to ethanol indicates that ethanol reduces the reuptake of adenosine, in particular by reducing the activity of bidirectional nucleoside transporters, leading to increased extracellular concentrations of adenosine [9][10][11][12]. Acute exposure to ethanol has been

shown to result in adenosine-dependent increased intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) mediated by the activation of A2A adenosine receptors [13][14]. A2A adenosine receptors appear to be desensitized and less expressed after chronic ethanol exposure, while the A1 adenosine receptor remains unaltered [15]. These changes in the adenosinergic modulation could contribute to the ethanol effects, although little information is available about the consequences of altered adenosine modulation during early development under ethanol exposure.

The activation of adenosine signaling displays several effects during early development, especially on cardiac and neural systems [16][17]. In rodents, the increase of adenosine levels during the gestational period, for example under hypoxic conditions, promotes bradycardia and asystole, and affects the overall cardiac development [18]. In the postnatal period among rodents, increased levels of adenosine promote inhibition of nerve formation and loss of white matter volumes [19].

The control of adenosine levels in the extracellular space is performed by equilibrative nucleoside transporters (ENT1 and ENT2), concentrative nucleoside transporters (CNTs) and adenosine transport coupled to form Na⁺ gradient [20][21]. To keep a balance between intra- and extracellular levels of adenosine, adenosine formed intracellularly can diffuse through these transporters. In the extracellular space, adenosine can be produced from the sequential hydrolysis of ATP exerted by the cascade of ectonucleotidases [22]. The cascade of ectonucleotidases comprises the families of the enzymes ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP), alkaline phosphatase and ecto-5'-nucleotidase [22][23][24]. Ecto-5'-nucleotidase is a membrane protein anchored to the cell surface by a phosphatidylinositolglycan (GPI) [25]. The enzymatic activity of ecto-5'-nucleotidase is tightly regulated, especially by ATP and ADP, contributing to the controlled production of adenosine by the ectonucleotidase pathway [26][27]. Ecto-5'-nucleotidase has a broad tissue distribution and is essential in the development and survival of neural cells [28][29]. Despite the fact that ethanol increases the adenosine levels in the extracellular space, no information is available about the possible role of ecto-5'-nucleotidase in the control of adenosine levels in this disturbed environment during early development, since ecto-5'-nucleotidase is the pacemaker in the enzymatic pathway in the production of adenosine in the extracellular médium [23][24].

Recent studies have employed the zebrafish as a model for FAS and demonstrated that embryonic exposure to ethanol results in phenotypes comparable to those observed in other

vertebrate models and in humans [2][30][31][32][33]. The damage caused by embryonic ethanol exposure in zebrafish already reported includes visual changes, cardiac abnormalities, enlarged body cavities [32] and increased cell death in the CNS [33][34].

The purpose of this study was to contribute to the knowledge about the role of extracellular sources of adenosine, especially the role of ecto-5-nucleotidase and nucleoside transporters, for the toxicity of ethanol in zebrafish larvae.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Ethanol (99.5%) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Instant Ocean (marine salt composed of chloride, sodium, magnesium, potassium, calcium, bicarbonate, bromide, strontium, carbonate, manganese, iodite, molybdate, vanadium, selenium and boron) was purchased from Marine Enterprises International (Maryland, USA). Tris, EDTA, EGTA and AMP were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2 Animal maintenance and ethanol exposure

Wild-type adult zebrafish (*Danio rerio*) from the sixth generation of our breeding stock held at the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul were maintained in an automated recirculating tank system, and were used for obtaining fertilized eggs. After the posture, eggs were collected and kept in maintenance water in an incubator at 28.5 °C on a 14:10 light/dark cycle. Fertilized eggs were collected and treated with 1, 1.5, 2 and 3% ethanol diluted in the maintenance water (water from reverse osmosis reconstituted with marine salt, 0.4 parts per trillion) or only maintenance water as a control in the acute and chronic treatment. The 2% ethanol was the concentration chosen to the following experiments since developed the desired balance between significant morphological deformities and survival. In the acute treatment, the embryos were exposed to 2% ethanol from 5 to 29 hours post-fertilization (hpf). In the chronic treatment, the embryos were exposed from 5 to 29 hpf and after that for 2 hours per day up to day 6. Larvae were examined at 7 dpf for ecto-5'-nucleotidase enzyme activity, ecto-5'-nucleotidase gene expression, locomotion and morphological parameters (mean ocular distance, mean surface area of the eyes and mean body length). Survival and hatching rates were monitored during each day until 7 dpf. Larvae were euthanized with tricaine (500 mg/l). This strategy has been proven effective and is accepted as a method for

euthanasia[35][36]. All procedures were in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) and approved by the Ethical Council from Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (Registration number 13/00347).

2.3 Morphological evaluation

Morphological evaluation was performed under stereomicroscopy (3X) to search by body defects until larvae reached 7 dpf. The measurement of body length (μm), ocular distance (μm) and surface area of the eyes (μm^2) was performed by photographic registration in 7 dpf larvae, followed by analysis using the software NIS-Elements D 3.2 for Windows, supplied by Nikon Instruments Inc. (Melville, USA). The body length was assumed as the distance from the center of an eye to the tip of the tail bud[37]. The ocular distance was assumed as the distance between the inner edge between the two eyes (similar to the inner intercantal distance in humans), and the size of the eyes was assumed as the surface area of the eyes.

2.4 Locomotor activity

In the locomotor activity assessment, the animals were individually placed in six-well microplates, filled with 10 mL of maintenance water, for 10 minutes before the start of the video recording, as an adaptation period[38]. Locomotor activity was recorded for 5 minutes and evaluated by two parameters, the distance traveled (m) and the average speed (m/s), through the computerized system ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL).

2.5 Ecto-5'-nucleotidase – enzyme activity evaluation

Samples containing 40 whole bodies of larvae were homogenized in Tris-citrate (50 mM Tris, 2 mM EDTA and 2 mM EGTA, pH 7.4). The total larva homogenate was centrifuged at 1580 rpm for 10 minutes at 4 °C. Afterwards, the precipitate was discharged and the supernatant centrifuged at 18,000 rpm for 25 minutes at 4 °C. The latter centrifugation resulting precipitate was adjusted to 3–5 μg of protein and used for testing the ecto-5'-nucleotidase activity[39]. The biological preparation was added to a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 8) and 5 mM MgCl_2 in a final volume of 200 μl . The reaction was started by the addition of 10 mM AMP and terminated after 20 minutes by the addition of 10% TCA. The quantification of inorganic phosphate (Pi) was evaluated according

to Chan et al. (1986)[40] and expressed as nmol of Pi released per minute per milligram of protein. Protein was quantified according to the Bradford method (1976)[41] using bovine serum albumin as standard.

2.6 Pre-exposure to AOPC and dipyridamole

To evaluate the effects of a pretreatment with an inhibitor of ecto-5'-nucleotidase on the consequences observed after ethanol exposure we used $\alpha\beta$ -methylene-adenosine-5'-diphosphate (AOPCP) at concentrations of 5, 50, 200 or 500 nM[42]. The AOPCP was diluted in saline. To evaluate the effects of a pretreatment with an inhibitor of nucleoside transport we used dipyridamole at concentrations of 10, 50 or 100 μ M[43]. Dipyridamole was diluted in dimethyl sulfoxide 2% (DMSO)[44]. AOPCP, dipyridamole and respective vehicle controls were microinjected in a volume of 10 nL into the yolk of 1 to 2 hpf embryos. Phenol red dye (1/20) was used to assert the precision of the injections. For the microinjections we used a Narishige capillary needle, size 1 x 90 mm, attached to a Nikon Microinjection system.

2.7 Ecto-5'-nucleotidase – gene expression evaluation

For molecular analysis we performed at least four different sets of experiments for each treatment with a pool of 30 embryos each[45]. After the treatment, four sets of animals were collected at 7 dpf, frozen in liquid nitrogen and maintained in the freezer at -80 °C until at least 24 h prior to molecular analysis. Total RNA from zebrafish was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometer (A260/280 nm) and the cDNA was synthesized with an ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 μ g of total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were carried out in a volume of 25 μ L using 12.5 μ L of diluted cDNA, containing SYBR® Green I (Invitrogen) 0.2 times diluted, 100 μ M dNTP, 1 time diluted PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward primer of EF1 α , Rpl13 α [46] and ecto-5'-nucleotidase[47] (Table 1). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 minutes at 95 °C, 40 cycles of 15 seconds at 95 °C for denaturation, 35 seconds at 60 °C for annealing and 15 seconds at 72 °C for elongation. At the end of the cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99 °C and showed in all cases one single peak. EF1 α and Rpl13 α were used as

reference genes for normalization. Relative expression levels were determined with 7500 and 7500 Fast Real-Time Systems Software v.2.0.6 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR version 2012.3 software (<http://LinRegPCR.nl>). Relative mRNA expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[48].

2.8 Statistical analysis

Median lifetime was estimated according to the Kaplan-Meier method. Morphological aspects, locomotion, enzyme activity and gene expression evaluation were analyzed by Student's t-test when comparing control and ethanol-treated animals. One-way ANOVA was used when comparing control, ethanol and AOPCP or dipyridamole-treated animals. The Tukey test was used for post hoc analysis. The significance level was established at $p < 0.05$. The results were expressed as means \pm SEM for biochemical, molecular, locomotor and morphological evaluation, while for survival and hatching determinations the data were expressed as percentages.

3. RESULTS

3.1 Survival and hatching rates

Acutely treated animals with 2% ethanol had a survival rate of 65.4% in comparison to 85.2% for the control group, while chronically treated animals exhibited a survival rate of 59% in comparison to 80.6% of the control group (Figure 1). The number of hatchings was counted until all larvae hatched. Over 90% of the control group hatched until 72 hpf, while acutely and chronically treated animals started to hatch at 72 hpf (acute: 54.8% and chronic: 63.7%) up to 96 hpf (acute: 45.2% and chronic: 36%) (Figure 2).

3.2 Morphology and locomotion

Morphological changes were observed until larvae reached 7 dpf on the acute and chronic 2% ethanol treatments. Figure 3A represents the main morphological changes reached after chronic treatment in 7 dpf larvae, while these changes also occurred in acutely treated animals, i.e. increased ocular distance, small eyes, pericardial edema, axial malformation, cyclopia and yolk sac edema. Taking into account acute and chronic treatments, cyclopia was found in only 5% of animals, while pericardial edema and axial malformations had a high incidence, respectively 81% and 36% of animals. At 4 dpf acutely and chronically treated animals already presented pericardial edema, as well as cyclopia and small eyes (Figure 3BC).

One of the consequences of acute and chronic ethanol exposure was a shortened body length (Figures 4C and 5C, respectively). Acutely treated animals had their bodies shortened by 14.9% when compared to the control group [$p < 0.0001$]. Chronically treated animals had their bodies shortened by 17% when compared to the control group [$p < 0.05$]. The ocular distance increased 20.9% and 31.9% in the acute and chronic treatments, respectively, in comparison to the respective control group (Figures 4A and 5A, respectively) [$p < 0.0001$]. The results of ocular distance are in accordance with the reduced surface area of the eyes (small eyes). Acutely treated animals exhibited a 20.3% reduction of the surface area of the eyes in relation to the control group and 22.1% reduction in the chronic treatment in relation to the control group [$p < 0.0001$] (Figures 4B and 5B, respectively).

The locomotion was altered, but some larvae were unable to move due to morphological changes, particularly pericardial edema and axial malformations. The mean of the total distance traveled in the acute treatment was 0.1144 ± 0.0193 m and in the chronic treatment it was 0.2522 ± 0.0309 m, 76% and 57% reduced in relation to the respective control (acute controls: 0.4801 ± 0.0345 m and chronic controls: 0.5834 ± 0.0326 m; [$p < 0.0001$]). The average speed in the acute treatment was 0.0003 ± 0.0001 m/s and in the chronic treatment it was 0.0008 ± 0.0001 m/s, 80% and 60% reduced in relation to the respective control (acute controls: 0.0015 ± 0.0001 m/s and chronic controls: 0.0020 ± 0.0001 m/s; [$p < 0.0001$]).

3.3 Ecto-5'-nucleotidase activity and gene expression

We evaluated the influence of an *in vivo* acute and chronic ethanol treatment on ecto-5'-nucleotidase activity from membranes of zebrafish larvae. In acute and chronic treatment there was an increase in enzyme activity of 28% and 58%, respectively, in relation to the control group (Figure 6AB) [$p < 0.01$]. No changes were observed in ecto-5'-nucleotidase gene expression after the acute or chronic treatment with 2% ethanol (Figure 7).

3.4 Inhibition of ecto-5'-nucleotidase

As the acute and chronic treatment with 2% ethanol promoted persistent increase of AMP hydrolysis up to 7 days post-fertilization, we tested the effect of a pretreatment with AOPC, an inhibitor of ecto-5'-nucleotidase. The highest dose used of AOPC, 500 nM, caused the death of all larvae. The doses of 5, 50 and 200 nM of AOPC did not alter, *per se*, survival and hatching rates (data not shown). Surface area of the eyes and body length were also unaltered by AOPC (5–200 nM) (Figure 8BC). A small increase of ocular distance was

revealed by statistical analysis at concentrations of 5 and 50 nM of AOPCP (2 and 2.7 %, respectively) (Figure 8A), while by visual morphological check this difference is unperceptive. The pretreatment of 1 to 2 hpf zebrafish embryos with 50 and 200 nM of AOPCP, given by intra-egg injection, did not prevent the morphological effects of 2% ethanol exposure from 5 to 29 hpf on the ocular parameters (Figure 9AB). However, the body length, which was decreased by acute ethanol exposure, was slightly prevented by AOPCP pre-exposure at 50 nM (2.8%) and 200 nM (8.2%) when compared to the ethanol-treated group, but did not recover the control situation (Figure 9C) [$F(3;496)= 82.26$; $p<0.0001$].

3.5 Inhibition of nucleoside transport

We tested the effect of a pretreatment with dipyridamole, an inhibitor of nucleoside transport, on the morphological effects caused by acute exposure to ethanol. The highest dose used of dipyridamole, 100 μ M, caused the death of all larvae, while the remaining doses, 10 and 50 μ M, promoted 84.7 and 79.1% of survival of exposed animals. The doses of 10 and 50 μ M of dipyridamole did not alter, per se hatching rates (data not shown) and morphological aspects (Figure 10). The pretreatment of 1 to 2 hpf zebrafish embryos with 10 and 50 μ M of dipyridamole worsened the morphological effects of 2% ethanol exposure from 5 to 29 hpf. The ocular distance was increased in those animals exposed to ethanol after pretreatment with 10 (58.3 and 14.8 %) and 50 μ M (112.6 and 60.4 %), respectively, in relation to the dipyridamole-control [$p< 0.001$] and saline-ethanol groups [50 μ M: $p< 0.001$] (Figure 10A). The surface area of the eyes was decreased in those animals treated with ethanol after dipyridamole pre-exposure at 10 (38.2 and 13.6 %) and 50 μ M (48.5 and 32.7 %), respectively, in relation to the dipyridamole-control [$p<0.001$] and saline-ethanol groups [50 μ M: $p< 0.001$] (Figure 10B). The body length was also decreased in those animals treated with ethanol after dipyridamole pre-exposure at 10 (14.6 and 0.9 %) and 50 μ M (27.6 and 13.5 %), respectively, in relation to the dipyridamole-control [$p< 0.001$] and saline-ethanol groups [50 μ M: $p< 0.01$] (Figure 10C). The vehicle used, dimethyl sulfoxide 2% (DMSO), did not alter, per se, the survival, hatching rates or morphology of animals (data not shown).

4. DISCUSSION

We observed that embryos exposed to acute and chronic 2% ethanol exhibited a mortality rate similar to that found by other authors[32][49][50] who used doses above 1.5%; the high mortality rates are probably due to impaired energy production. The ethanol caused a delay in hatching in acute and chronic treatment. In a similar study, Sylvain et al. (2010)[49] demonstrated that embryos of the control group hatched until the first 96 hpf and only 50% of

embryos treated with 2% ethanol hatched until 96 hpf, while in our study, 90% of the control group hatched until 72 hpf and ethanol-treated animals kept the hatchings up to 96 hpf. It is known that the teleostean eggshell is formed during growth and maturation of the fish oocyte, and that embryos control the secretion of an enzyme called the “hatching enzyme” into the perivitelline space of the egg, allowing degradation of the egg wall and causing the hatch of the embryo[51]. Several substances can impact on the secretion of hatching enzymes and ethanol could promote a hatching delay through this mechanism.

Most studies use between 0.5 and 3 % ethanol[31][32][52]. Here, as in previous studies, we observed that a 2% ethanol solution, in the acute and chronic intermittent protocols, is able to cause morphological changes that can be classified as a moderate severity of the phenotype induced by ethanol, since eyes, heart and yolk defects were observed[2][32][49]. In fact, the exposure from 5 to 29 hpf was sufficient to induce a larger number of developmental malformations, as stated in the study of Bilotta et al. (2004)[32], and those alterations (body length, ocular distance and surface area of the eyes defects) were not worsened after the intermittent exposure to ethanol (2 h/day). Morphological defects from ethanol exposure are closely related to impaired mitochondrial dysfunction, leading to a decrease of the electron transport chain and ATP synthase activities [53]. Zebrafish acutely and chronically exposed to ethanol displayed altered visual morphology parameters in accordance with those data reported from children who have been exposed to ethanol prenatally, displaying a number of visual problems, such as microphthalmia [54]. The time of exposure to ethanol carried out here comprises the period when the eye of the zebrafish begins to form, which is between 12 and 24 hpf[55]. The mechanism proposed for eye effects induced by ethanol was recently correlated to altered expression of heat-shock proteins[56]. The body length decrease in ethanol-treated animals was due in some cases to axial malformations and body curvature, but even in animals that did not exhibit these characteristics, the body length was decreased in comparison to the control. Pericardial edema and yolk sac edema were the strongest malformations observed and they occurred in both acute and chronic ethanol exposure. Pericardial edema is an abnormal accumulation of fluid in the pericardial cavity. Because of the limited amount of space in the pericardial cavity, fluid accumulation leads to the pericardium becoming abnormally swollen. Yolk sac edema is a yolk sac swollen with accumulated pellucid fluid[57]. Both malformations contributed to the impaired locomotion of 7 dpf larvae. These considerations reinforce the fact that this very beginning of development is extremely sensitive to ethanol exposure, and that, considering zebrafish

development, the stage from 4 to 5 hpf, which is roughly equivalent to the implantation stage of mammalian embryos just prior to gastrulation [58], is the critical period leading to morphological defects similar to those detected in mammals.

It has been proposed that ethanol can stimulate adenosine receptors through the inhibition of type 1 equilibrative nucleoside transporter (ENT 1), which leads to the accumulation of extracellular adenosine[11], while the contribution of ecto-5'-nucleotidase is unknown. Ecto-5'-nucleotidase is under rigid control throughout the development, since adenosine acts as a potent trophic factor, regulating development, growth, cell proliferation and differentiation and apoptosis[59][60][61][62]. The zebrafish shares a high degree of amino acid sequence identity with the human adenosine receptor and appears to display common pharmacological properties[37][45]. Some studies have already demonstrated the presence of AMP hydrolysis activity, and the gene expression of ecto-5'-nucleotidase from brain membranes of zebrafish[39][63]. The participation of ecto-5'-nucleotidase in the general effects yielded by ethanol exposure is lacking in the literature. Here, the morphological impacts of ethanol were accompanied by the increase of AMP hydrolysis from membranes of the whole body of zebrafish larvae in the acute and chronic 2% ethanol treatment. The acute treatment was able to produce a persistent increase of AMP hydrolysis, while chronic treatment presented the strongest effects on enzyme activity. In the literature, adult zebrafish exposed acutely to ethanol (0.25-1%) had no effect on AMP hydrolysis from brain structures, while in vitro exposure to ethanol and derivatives affected AMP hydrolysis[63]. Here, we did not expect strong effects of derivatives of ethanol, since the zebrafish, at the period of acute exposure to ethanol used here, metabolize ethanol slowly in consequence of low expression of Alcohol dehydrogenase from liver, while until 6 dpf this enzyme expression increased three-fold[64]. The absence of alteration on gene expression of ecto-5'-nucleotidase could indicate the contribution of allosteric control over this enzyme, which can be performed by ADP, ATP and H⁺[26]. The repercussion of the increase of AMP hydrolysis, which is the increase of adenosine levels, could play some role in the morphological effects since adenosine, through A₁ adenosine receptors, is able to affect cell proliferation, especially endothelial, cardiac and neuronal cells, as already demonstrated in mammals[18][65].

To verify whether morphological alterations were related to the increase of AMP hydrolysis due to the increase of ecto-5'-nucleotidase activity, we used $\alpha\beta$ -methylene-adenosine-5'-diphosphate (AOPCP), an inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, which had a mild effect on the morphological alterations caused by acute 2% ethanol exposure. Some interpretations of this

result can be raised. One is the possibility of not actually promoting as much inhibition of the enzyme as necessary to prevent the morphological effects. However, we tested a broad spectrum of nonlethal AOPCP concentration (50–200 nM) immediately before the exposure to ethanol, on the assumption that the inhibitor was working during the period of acute ethanol exposure. We can also consider the possibility that the increase in adenosine levels occurs through other sources, such as inhibition of nucleoside transporters, as already discussed[11]. The inhibition of nucleoside transport through dipyridamole promoted worsening of the morphological aspects of zebrafish larvae, probably through the impairment of adenosine reuptake. The higher concentration was lethal while the intermediary concentration promoted the intensification of ethanol-induced defects. This result contributed to the literature about the responsible pathway to the extracellular increase of adenosine under ethanol exposure and added new information about the direct correlation between adenosine levels and morphological defects induced by ethanol, through nucleoside transporters.

Summarizing, exposure to ethanol, using zebrafish as a model, displays several similar morphological effects to the Fetal Alcoholic Syndrome of humans when performed from 5 hpf, but does not display worsening with the intermittent continuity of the exposure to ethanol until 6 dpf. Ecto-5'-nucleotidase activity appears to make a minor contribution to the morphological defects induced by ethanol, while nucleoside transporters are strongly related to them. While the effects of ethanol on a fetus could be simply prevented by the elimination of this drug from the diet of mothers, this is a complex social assumption, therefore studies on the basis of ethanol action are essential for improving the management of affected individuals, as well as giving subsidies to the development of preventive strategies.

REFERENCES

- [1] Whaley SE, O'Connor MJ, Gunderson B. Comparison of the adaptive functioning of children prenatally exposed to alcohol to a non exposed clinical sample. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(7):1018-24.
- [2] Ali, S, Champagne, DL, Spaink, HP, Richardson, MK. Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res C Embryo* 2011;93(2):115-33.
- [3] Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health* 2000;24(2):93-104.

- [4] Lee S, Choi I, Kang S, Rivier C. Role of various neurotransmitters in mediating the long-term endocrine consequences of prenatal alcohol exposure. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1144:176-88.
- [5] Gulati-Leekha A, Goldman D. A reporter-assisted mutagenesis screen using α 1-tubulin-GFP transgenic zebrafish uncovers missteps during neuronal development and axonogenesis. *Dev Biol* 2006;296(1):29–47.
- [6] Korzh V, Sleptsova I, Liao J, He J, Gong Z. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev Dyn* 1998;213(1):92-104.
- [7] Brösamle C, Halpern ME. Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 2002;39(1):47-57.
- [8] Nielsen AL, Jorgensen AL. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP. *Gene* 2003;22(310):123-32.
- [9] Clark M, Dar MS. Effect of acute ethanol on release of endogenous adenosine from rat cerebellar synaptosomes. *J Neurochem* 1989;52(6):1859-65.
- [10] Sharma R, Engemann SC, Sahota P, Thakkar MM. Effects of ethanol on extracellular levels of adenosine in the basal forebrain: an in vivo microdialysis study in freely behaving rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:813–18.
- [11] Choi DS, et al. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci* 2004;7:855–61.
- [12] Krauss SW, Ghirnikar RB, Diamond I, Gordon AS. Inhibition of Adenosine Uptake by Ethanol Is Specific for One Class of Nucleoside Transporters. *Mol Pharmacol* 1993;44:1021-26.
- [13] Pennington SN. Molecular Changes Associated with Ethanol-Induced Growth Suppression in the Chick Embryo. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14:832–37.
- [14] Tracy RB, Mark AP. Neuroadaptations in Adenosine Receptor Signaling Following Long-Term Ethanol Exposure and Withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36(1):4–13.
- [15] Jarvis MF, Becker HC. Single and repeated episodes of ethanol withdrawal increase adenosine A1, but not A2A, receptor density in mouse brain. *Brain Res* 1998;786(1-2):80-8.
- [16] Momoi N, Tinney JP, Keller BB, Tobita K. Maternal hypoxia and caffeine exposure depress fetal cardiovascular function during primary organogenesis. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38(12):1343-51.
- [17] Rivkees SA, Wendler CC. Regulation of cardiovascular development by adenosine and adenosine-mediated embryo protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(4):851-5.

- [18] Rivkees S, Zhao Z, Porter G, et al. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Genet Metab* 2001;74:160–171.
- [19] Turner CP, Yan H, Schwartz M, Othman T, Rivkees SA. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Neuro Report* 2002;9:1199-204.
- [20] Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 2005;63(1):191-270.
- [21] Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S. Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 2005;334:1343–50.
- [22] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Development* 2001;52:44–56.
- [23] Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996;49:589–618.
- [24] Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001;38(2):107-25.
- [25] Zimmermann H. Signaling via ATP in the nervous system. *TINS* 1994;17:420-26.
- [26] Heyliger CE, Panagia V, Dhalla NS. Effect of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors on cardiac sarcolemmal 5'-nucleotidase. *J Pharmacol Exp Therap* 1981;217(2):489-93.
- [27] Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996;49:589–618.
- [28] Heilbronn A, Maienschein V, Carstensen K, Gann W, Zimmermann H. Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuro Report* 1995; 7:257-61.
- [29] Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 2012;8(3):437-502.
- [30] Wielhouwer EM, Ali S, Al-Afandi A, et al. Zebrafish embryo development in a microfluidic flow-through system. *Journal Lab Chip* 2011; 11(10): 1815-24.
- [31] Arenzana FJ, Carvan MJ, Aijón J, Sánchez-González R, Arévalo R, Porteros A. Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28(3):342-8.

- [32] Bilotta J, Barnett JA, Hancock L, Saszik S. Ethanol exposure alters zebrafish development: A novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:737-43.
- [33] Carvan MJ, Loucks E, Weber DN, Williams FE. Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:757-68.
- [34] Fan CY, Cowden J, Simmons SO, Padilla S, Ramabhadran R. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32:91-8.
- [35] COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Estatuto. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br> > Acesso 2014.
- [36] Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *JAALAS* 2009;48(6):785-9.
- [37] Capiotti KM, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Daniorerio*). *Neurotoxicol Teratol* 2011;33:680-5.
- [38] Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 2005;131(3):759-68.
- [39] 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.
- [40] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-80.
- [41] Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [42] Pacheco R, et al. Role of the ecto-nucleotidases in the cooperative effect of adenosine and neuropeptide-S on locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:726-30.
- [43] Wall MJ, Atterbury A, Dale N. Control of basal extracellular adenosine concentration in rat cerebellum. *J Physiol*. 2007;582(Pt 1):137-51.

- [44] Lin W, Buolamwini JK. Synthesis Flow Cytometric Evaluation and Identification of Highly Potent Dipyridamole Analogs as Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1) Inhibitors. *J Med Chem* 2007;(16):3906-20.
- [45] Boehmler W, et al. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns* 2009;9(3):144-51.
- [46] Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization. *Acta Biochim Biophys* 2007;39:384-90.
- [47] Capiotti KM, et al. Arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Int J Devl Neuroscience* 2013;31:75–81.
- [48] Oggier DM, Lenard A, Küry M, Hoeger B, Affolter M, Fent K. Effects of the protein kinase inhibitor PKC412 on gene expression and link to physiological effects in zebrafish *Danio rerio* eleuthero-embryos. *Toxicol Sci* 2010;119(1):104-15.
- [49] Sylvain NJ, Brewster DL, Ali DW. Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32:472–80.
- [50] Zamora LY, Lu Z. Alcohol-induced morphological deficits in the development of octavolateral organs of the zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 2013;10(1):52-61.
- [51] Helvik, JV, Walther, BT. Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. *J £M Zool* 1992;263:204-9.
- [52] Fernandes Y, Gerlai R. Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33(4):601-9.
- [53] Xu Y, Liu P, Li Y. Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(2):83-91.
- [54] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991-2005. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58(19):529-32.
- [55] Schmitt, EA, Dowling, JE. Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 1994;344:532–42.
- [56] Kashyap B, Pegorsch L, Frey RA, Sun C, Shelden EA, Stenkamp DL. Eye-specific gene expression following embryonic ethanol exposure in zebrafish: roles for heat shock factor 1. *Reprod Toxicol* 2014;43:111-24.

- [57] Ali S, Aalders J, Richardson MK. Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development. *Zebrafish* 2014;11(2):129-41.
- [58] Loucks E, Ahlgren S. Assessing Teratogenic Changes in a Zebrafish Model of Fetal Alcohol Exposure. *J Vis Exp* 2012;61:e3704.
- [59] Bianchi V, Spsychala J. Mammalian 5'-Nucleotidases. *J Biol Chem* 2003;278: 46195-8.
- [60] Abbracchio MP1, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998 Oct;78(2):113-45.
- [61] Burnstock G1, Ulrich H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development 2011 Apr;68(8):1369-94.
- [62] Neary JP Burnstock G. Purinoceptors in the regulation of cell growth and differentiation. *Drug Development Research* 1996;39:407-12.
- [63] Rico EP, et al. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotide from zebrafish brain membranes. *J Neurochem Int* 2008;52(1-2):290-96.
- [64] Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ. Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol* 1988;255(3Pt2):554-62.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DECIT/SCTIE-MS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – PRONEX).

DISCLOSURE STATEMENT

Authors declare no competing financial interests.

FIGURE 1

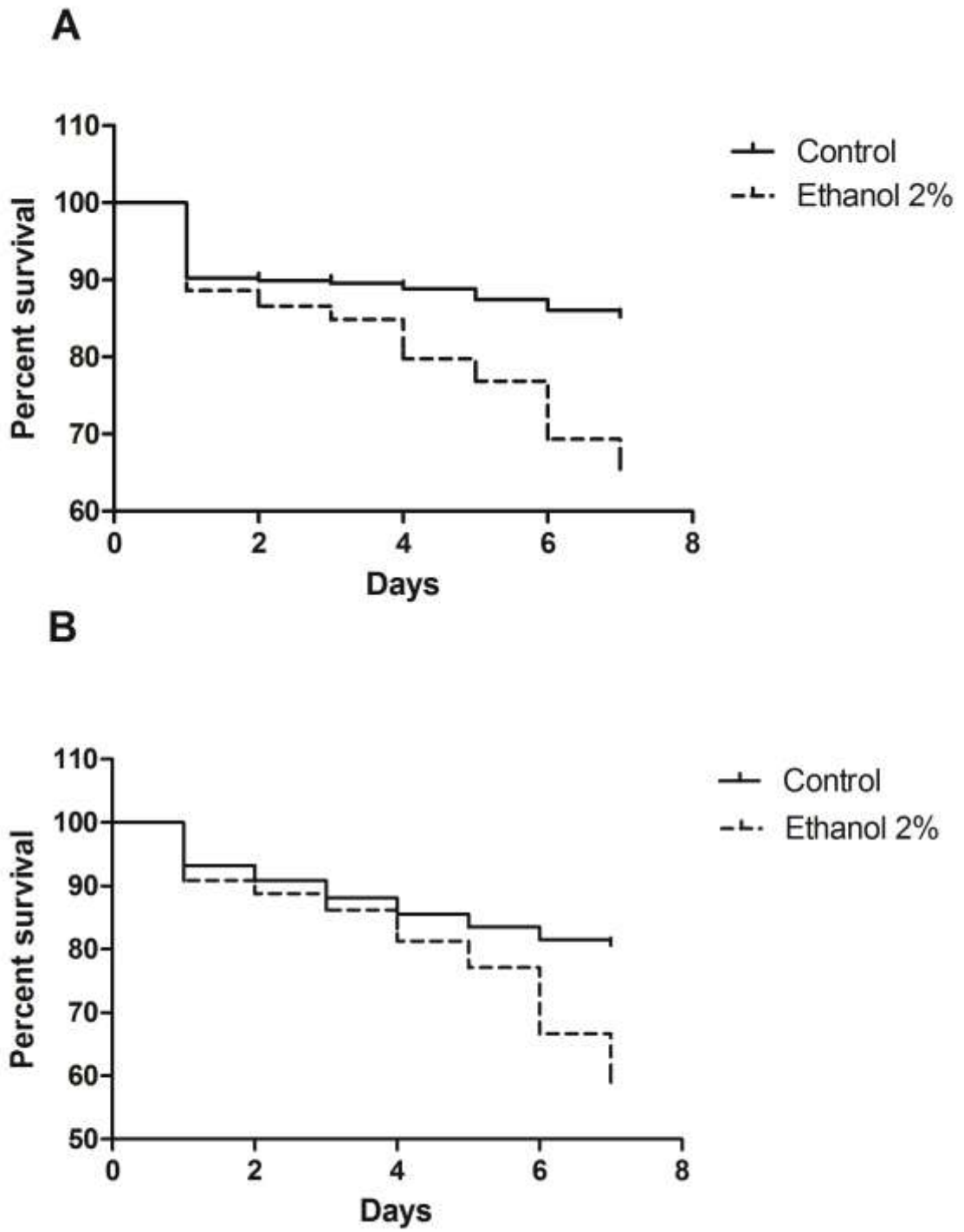


FIGURE 2

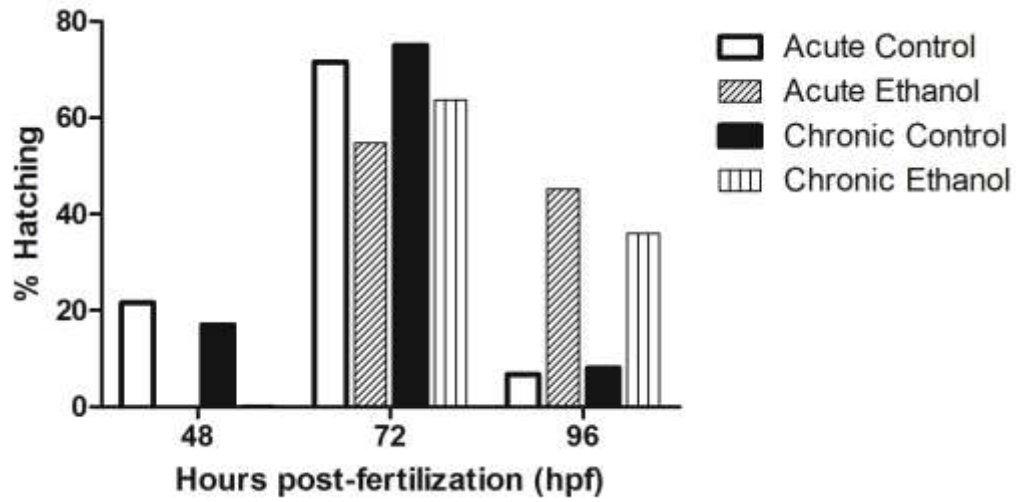


FIGURE 3

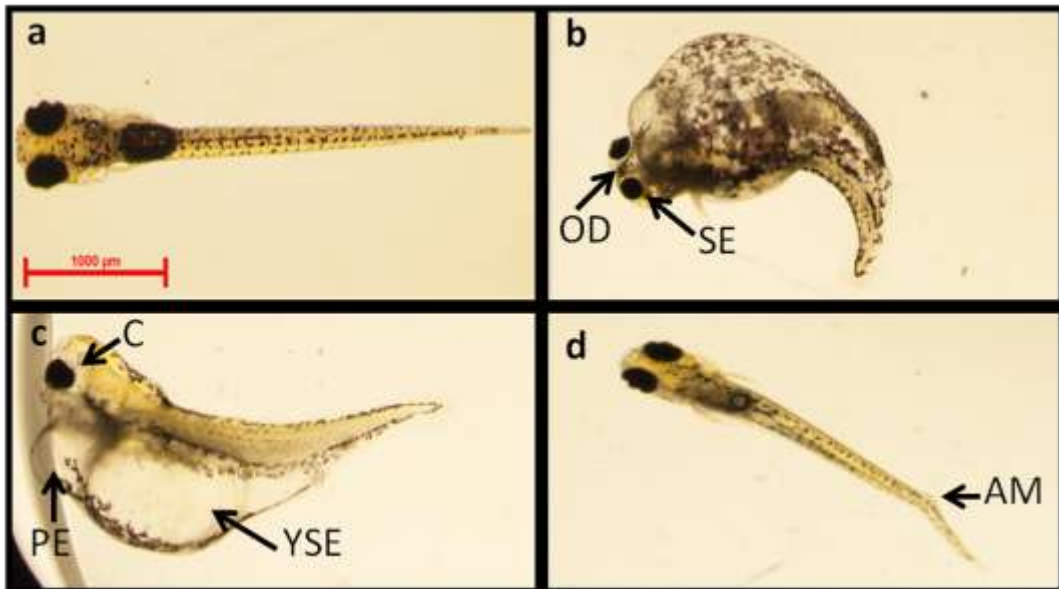


FIGURE 4

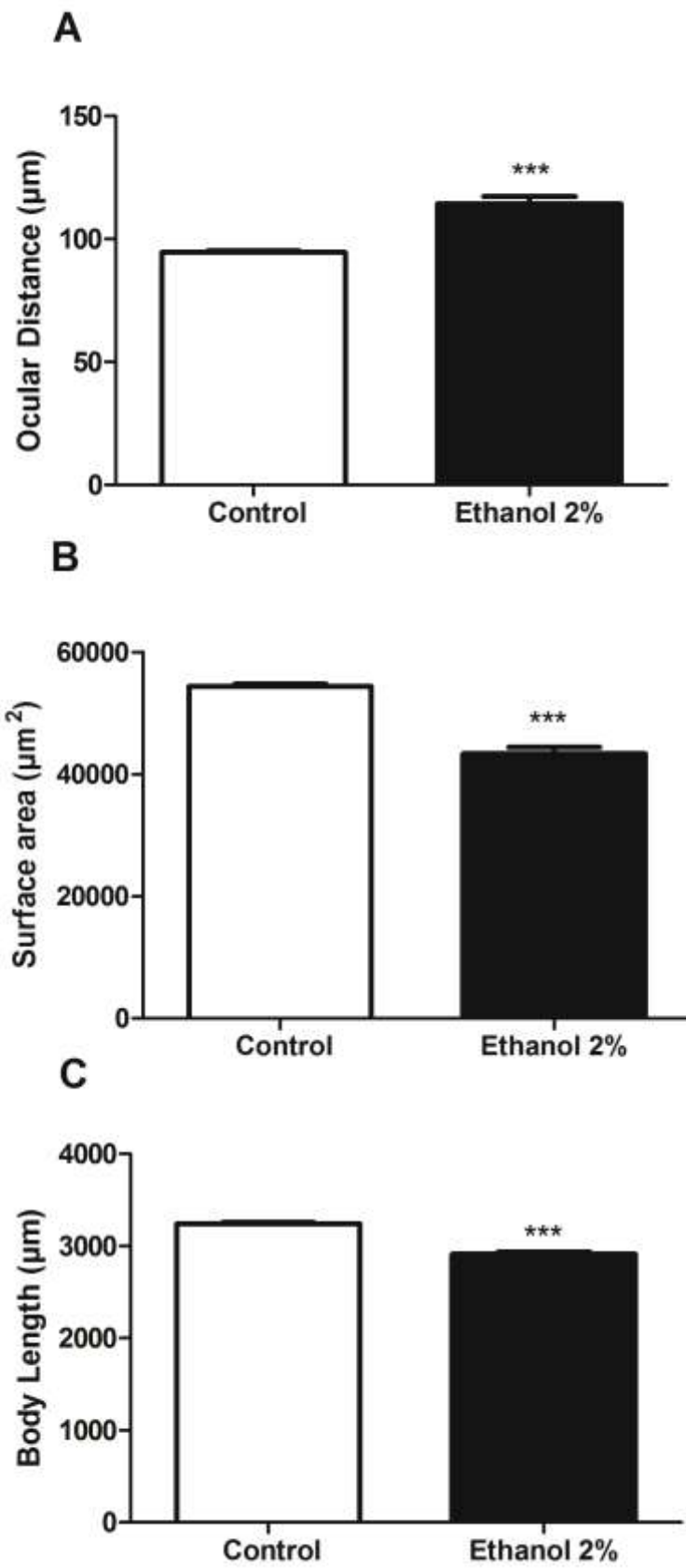


FIGURE 5

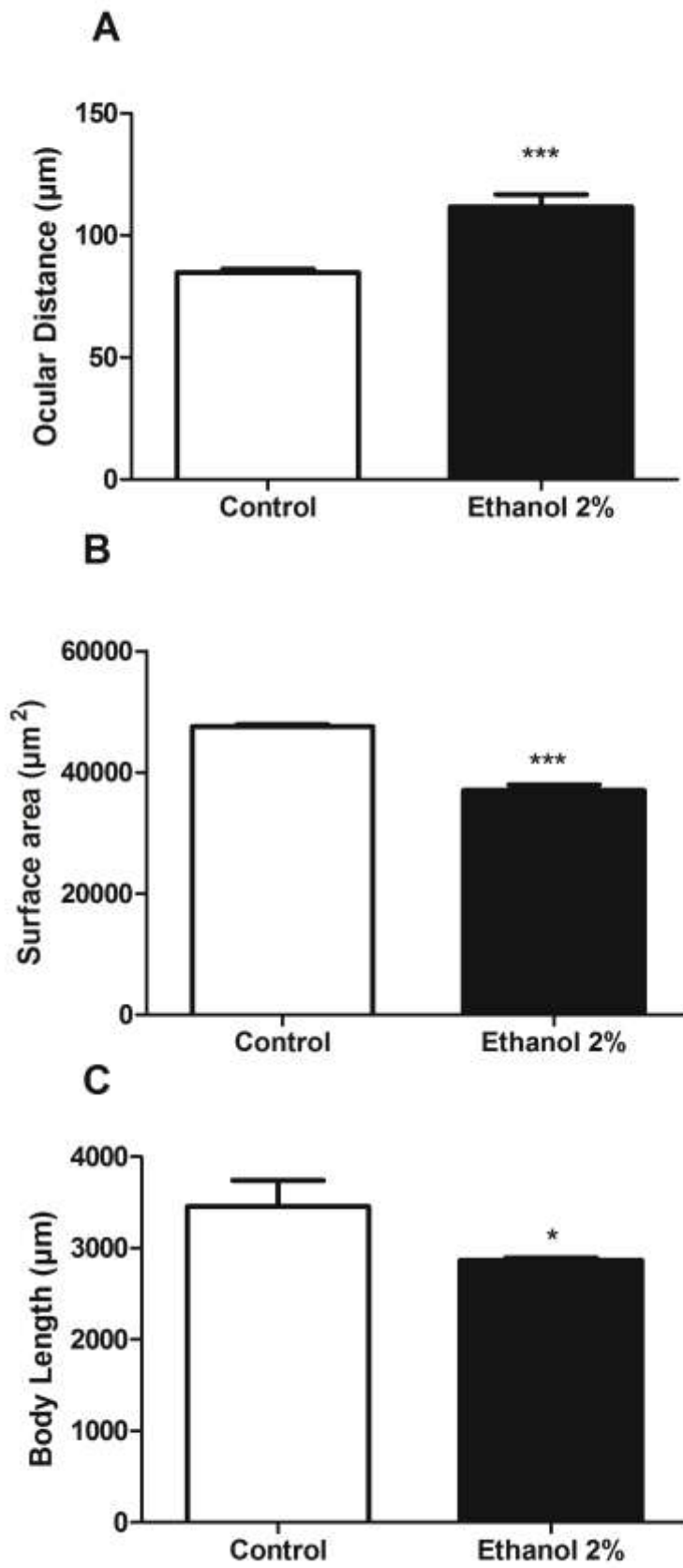


FIGURE 6

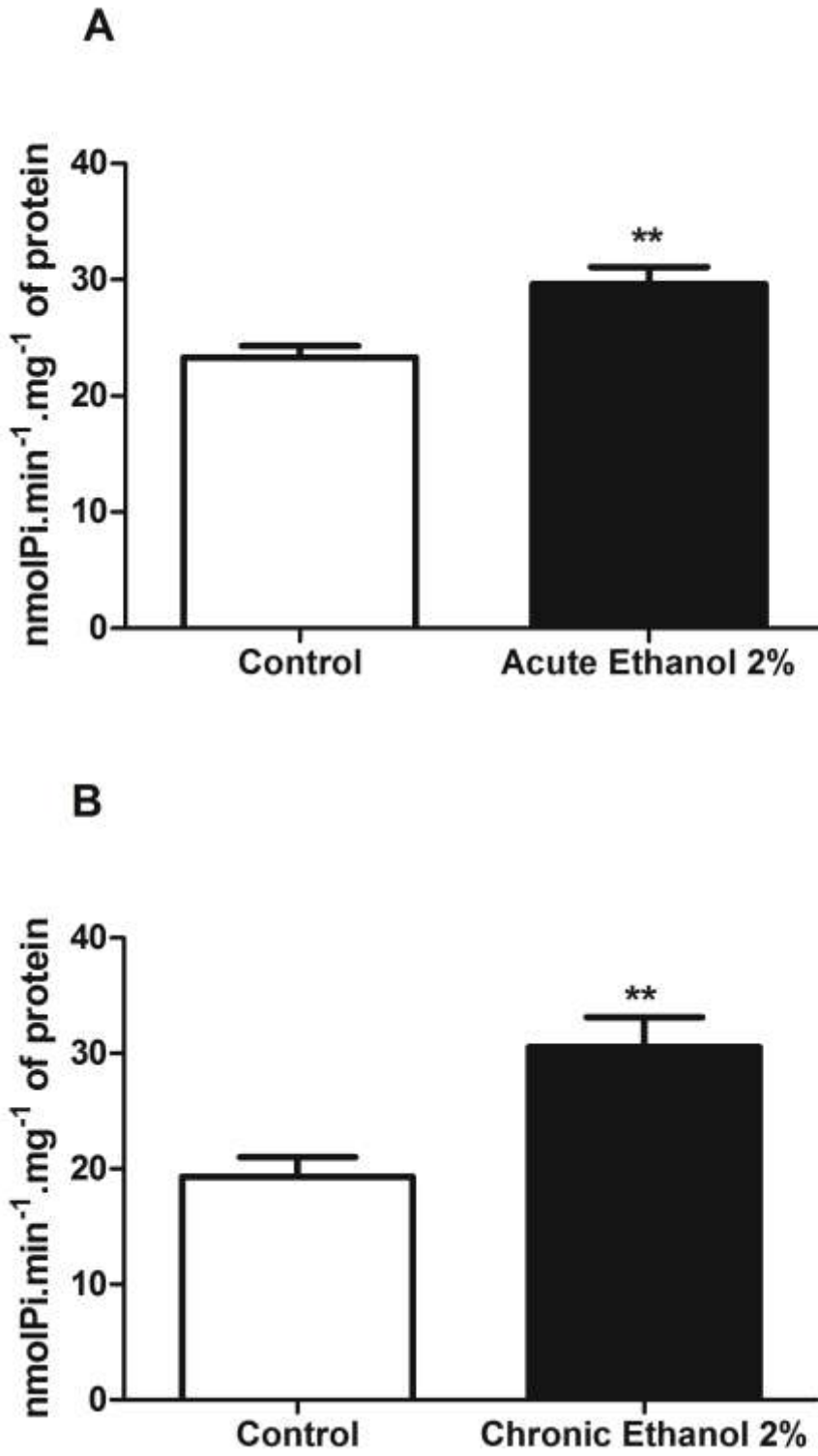


FIGURE 7

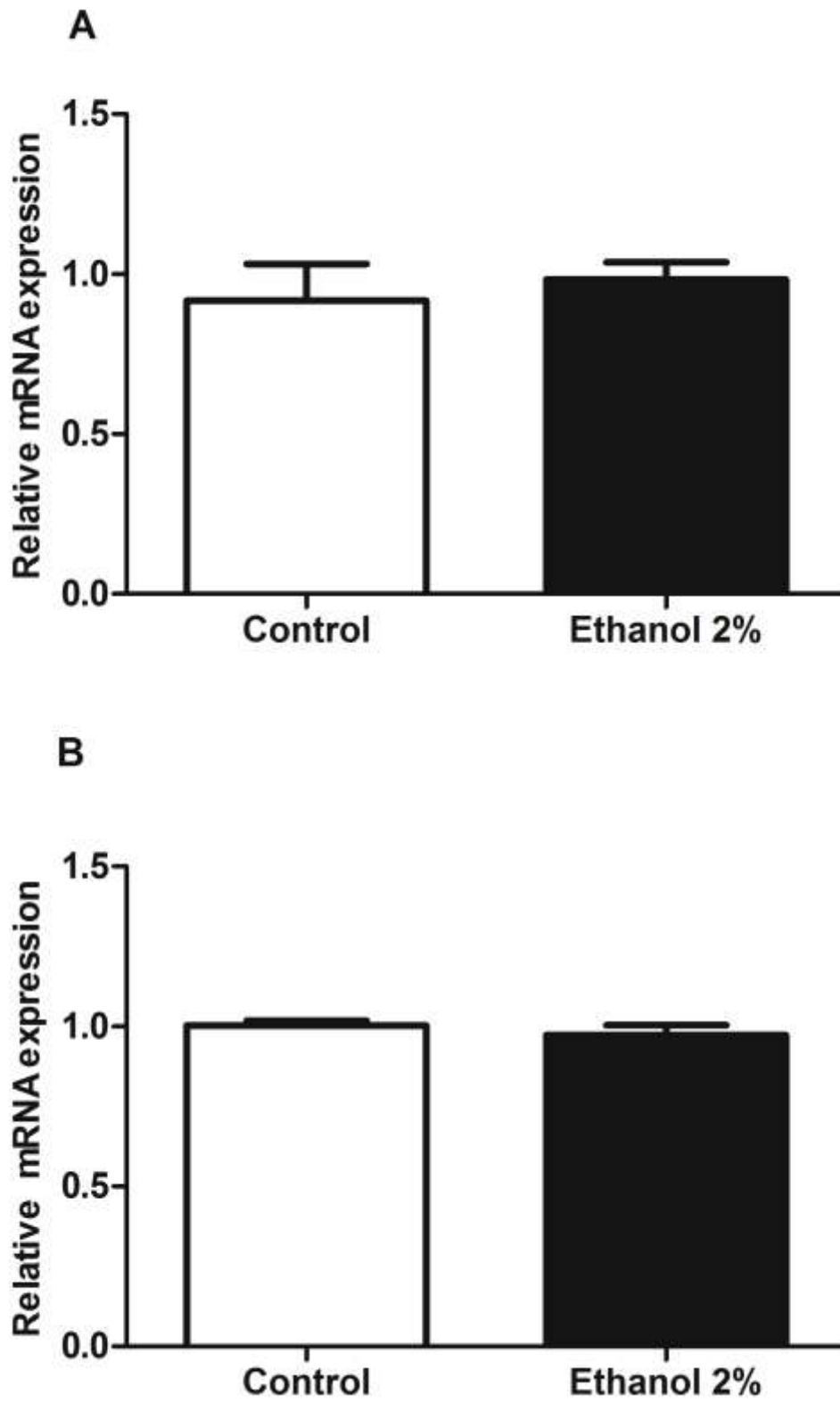


FIGURE 8

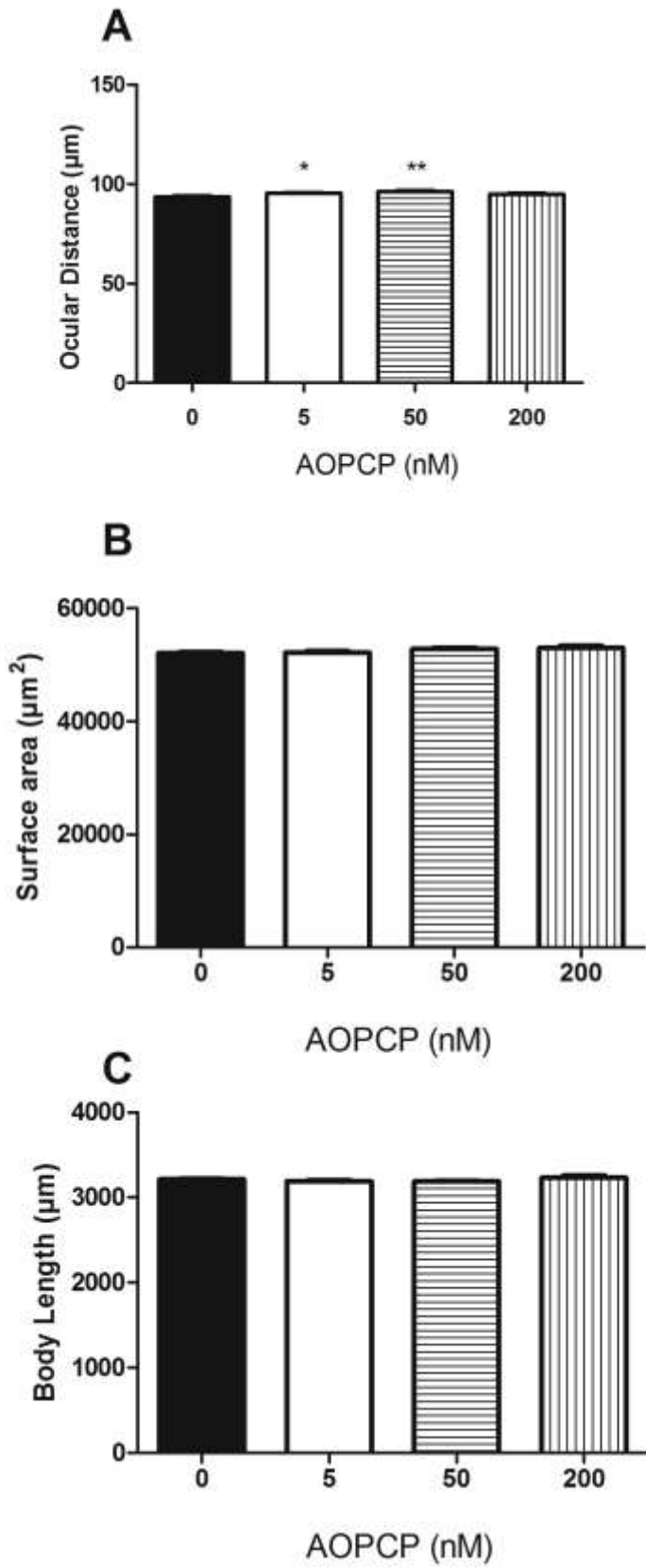


FIGURE 9

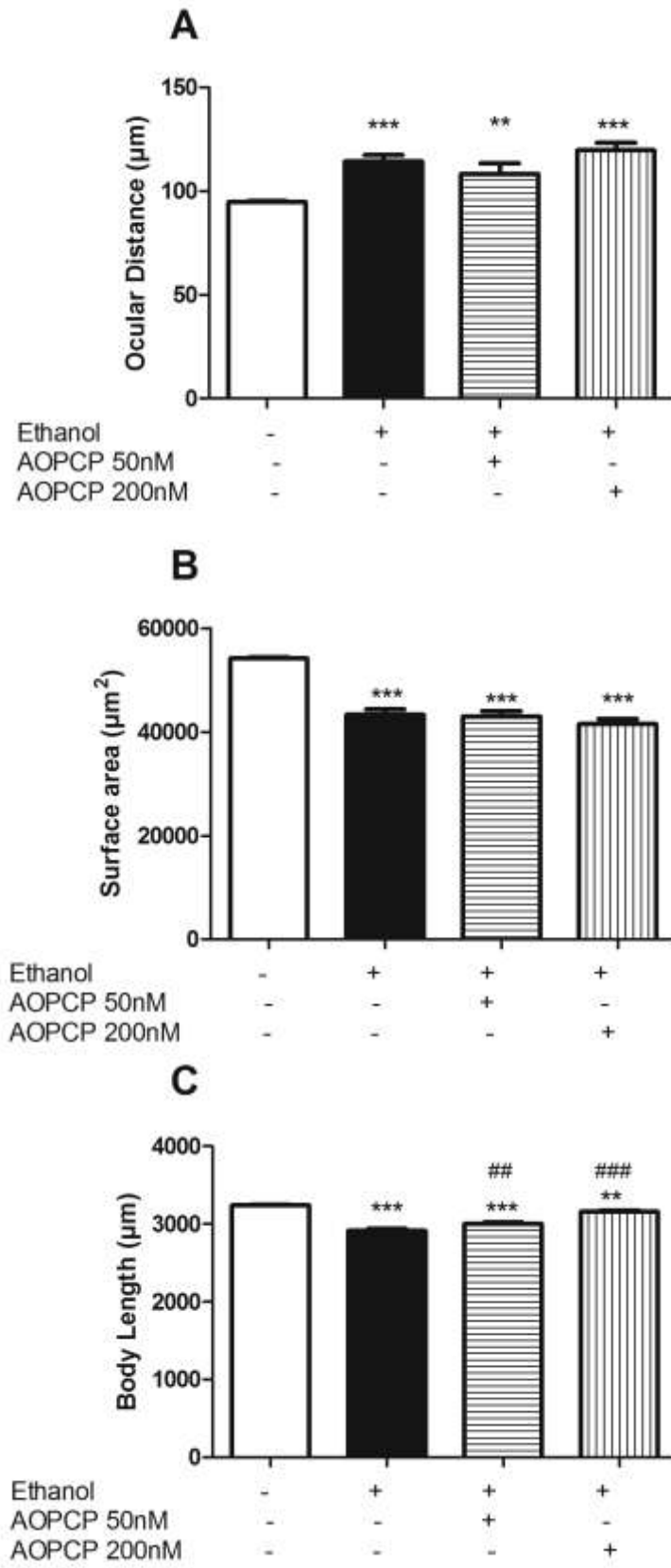
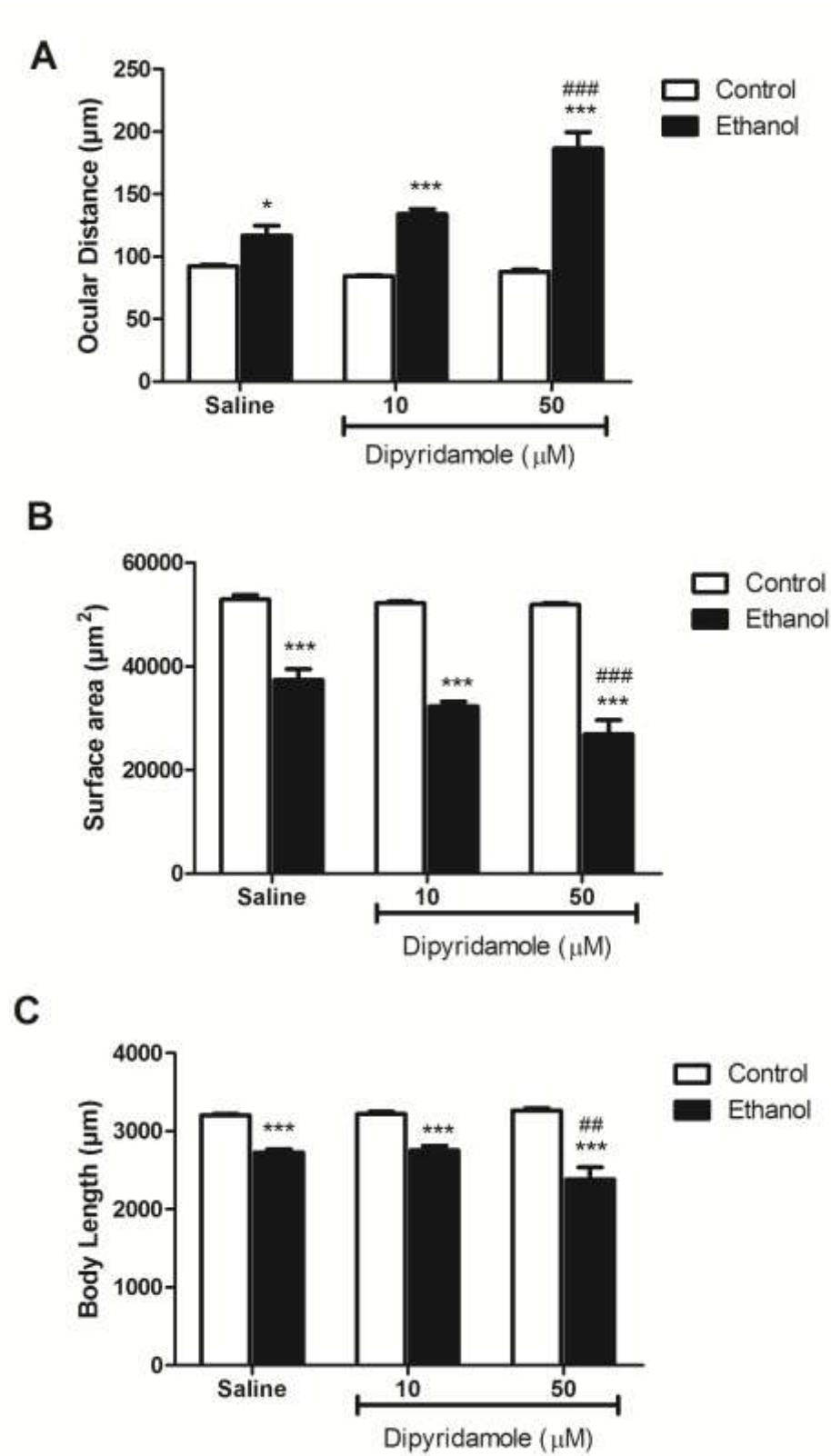


FIGURE 10



LEGENDS

Figure 1: Kaplan-Meier survival representation of zebrafish larva exposed to 0% (control) or 2% ethanol concentrations. (A) Acute treatment performed from 5 to 29 hpf (n=150; p<0.0001). (B) Chronic treatment performed from day 1 (from 5 to 29 hpf), followed by intermittent ethanol exposure (2 hours/day) up to day 7 (n=150; p<0.0001).

Figure 2: Percentage of hatchings in acute and chronic ethanol treatment compared to the respective control (Total control: 1.318 embryos; Acute ethanol: 618 embryos; Chronic ethanol: 611).

Figure 3: Representative morphological features of 7 dpf zebrafish larvae exposed to chronic ethanol treatment. A: Control; B–D: Chronic ethanol treatment; PE: Pericardial edema; AM: Axial malformation; SE: Small eyes; C: Cyclopia; OD: Ocular distance; YSE: Yolk sac edema. Optical zoom 3X.

Figure 4: Effects of acute exposure to ethanol 2% on morphological parameters of zebrafish. (A) Mean ocular distance (μm) (p<0.0001); (B) Mean surface area of eyes (μm^2) (p<0.0001); and (C) Mean body length (μm) (p<0.0001). Subjects were examined at 7 days post-fertilization. Bars represent mean \pm SEM of control subjects (n=100) and subjects exposed to 2% ethanol of chronic form (n=100). Data were analyzed by Student's t-test for unpaired samples. The asterisks represent a significant difference from the control group.

Figure 5: Effects of chronic exposure to ethanol 2% on morphological parameters of zebrafish. (A) Mean ocular distance (μm) (p<0.0001); (B) Mean surface area of eyes (μm^2) (p<0.0001); and (C) Mean body length (μm) (p<0.05). Subjects were examined at 7 days post-fertilization. Bars represent mean \pm SEM of control subjects (n=100) and subjects exposed to 2% ethanol of chronic form (n=100). Data were analyzed by Student's t-test for unpaired samples. The asterisks represent a significant difference from the control group.

Figure 6: Effect of acute treatment (A) and chronic treatment (B) with ethanol 2% in ecto-5'-nucleotidase enzyme activity. Data were expressed as nmolPi.min-1.mg-1 of protein. Bars represent mean \pm SEM of at least five experiments performed in triplicate. Data were analyzed by Student's t-test for unpaired samples. The asterisks represent a significant difference from the control group at p<0.01.

Figure 7: Effect of acute treatment (A) and chronic treatment (B) with ethanol 2% on ecto-5'-nucleotidase gene expression. At least 30 larvae of zebrafish were used for each group. Rpl13 α and EF1 α were used as constitutive control. Data are expressed as mean \pm SEM of

experiments performed in quadruplicate. Data were analyzed by Student's t-test for unpaired samples.

Figure 8: Effect of intra-egg injection with AOPCP (5, 50 and 500 nM) at 1 to 2 hpf on morphological parameters of zebrafish. (A) Mean ocular distance (μm); (B) Mean surface area of eyes (μm^2); and (C) Mean body length (μm). Subjects were examined at 7 days post-fertilization. Bars represent mean \pm SEM of control subjects (n=100) and subjects exposed to AOPCP (n=100 each). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test considering $p < 0.05$ as statistically different. The asterisks represent a significant difference from the control group, as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 9: Effects of intra-egg injection with AOPCP (50 and 200 nM) at 1 to 2 hpf on the morphological changes promoted by Ethanol 2% given at 5 hpf–29 hpf. (A) Mean ocular distance (μm); (B) Mean surface area of eyes (μm^2); and (C) Mean body length (μm). Subjects were examined at 7 days post-fertilization. Bars represent mean \pm SEM (n=100 each). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test considering $p < 0.05$ as statistically different. The * represents a significant difference from the control group, as ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. The # represents a significant difference from ethanol-treated animals, as ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.0001$.

Figure 10: Effects of intra-egg injection with dipyrindamole (10 and 50 μM) at 1 to 2 hpf embryos on the morphological changes promoted by ethanol 2% given at 5 hpf–29 hpf. (A) Mean ocular distance (μm); (B) Mean surface area of eyes (μm^2); and (C) Mean body length (μm). Subjects were examined at 7 days post-fertilization. Bars represent mean \pm SEM (n=25 each). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test considering $p < 0.05$ as statistically different. The * represents a significant difference from the correspondent control group, as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$. The # represents a significant difference from ethanol-saline animals, as ### $p < 0.0001$. The vehicle used, dimethyl sulfoxide 2% (DMSO), did not alter, per se, the survival, hatching rates or morphology of animals (data not shown).

Table 1.Primer sequences for RT-qPCR experiments included in the study

Gene	Primer sequences (5'-3')	Accession number (mRNA)	Amplicon size (bp)
<i>Rpl13α^a</i>	F-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_212784	147
<i>EF1α^a</i>	F- CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R- ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	ENSDART 00000023156	86
<i>ecto-5'-nucleotidase^b</i>	F-TGGACGGAGGAGACGGATTACCC R-GGAGCTGCTGAACTGGAAGCGTC	BC055243.1	149

According to ^aTang et al. (2007)^[46], ^bCapiotti et al. (2013)^[47].

CAPÍTULO 3

5. DISCUSSÃO

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS

5. DISCUSSÃO

Sabe-se, e vários estudos já demonstraram que a exposição ao etanol durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário pode causar alterações morfológicas e comportamentais, mesmo quando ingerido em baixas doses (Loucks e Carvan, 2004; Kashyap, Frederickson e Stenkamp, 2007; Arenzana et al, 2006; Bilotta et al, 2004; Carvan et al, 2004). Há indicações de que o sistema purinérgico pode estar envolvido nessas alterações, uma vez que há aumento extracelular de adenosina após exposições crônicas e agudas ao etanol (Clark e Dar, 1989; Sharma et al, 2010; Choi et al, 2004; Krauss et al, 1993). No espaço extracelular, a adenosina pode ser produzida pela degradação do ATP extracelular que é realizada por uma família de enzimas localizadas na superfície celular, conhecidas como ectonucleotidases, a qual inclui a ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 2001; Zimmermann, 1996; Cunha, 2001). A ecto-5'-nucleotidase hidrolisa AMP originando a adenosina. Assim a ecto-5'-nucleotidase pode controlar os níveis de adenosina, modulando o sistema purinérgico (Zimmermann, 2001).

A adenosina é um neuromodulador que atua através da ativação de receptores metabotrópicos do tipo P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) e pode agir como um neuroprotetor endógeno (Fredhol et al, 2005). Estudos demonstram a mudança na expressão dos receptores A_1 no sistema nervoso central após exposição ao etanol. Em roedores há aumento na expressão dos receptores A_1 (Daly, 1994; Tracy e Mark, 2012). Esse aumento pode impactar no tônus adesinérgico basal e assim afetar a excitabilidade neural (Jarvis e Becker, 1998). O envolvimento do aumento da expressão dos receptores A_1 nos efeitos causados pelo etanol em roedores é evidente, uma vez que a administração de antagonistas de A_1 reverte ou atenuam estes efeitos (Dohrman, Diamond e Gordon, 1997; Thakkar et al, 2010).

Como resultado da avaliação dos efeitos causados pela exposição aguda e crônica ao etanol 2% em embriões de peixe-zebra demonstrou-se que os efeitos quanto à taxa de sobrevivência e eclosão, assim como às alterações morfológicas foram semelhantes a outros estudos. As alterações morfológicas foram extremamente contundentes e afetaram de forma significativa a capacidade das larvas se locomoverem.

Em um segundo momento, o objetivo foi avaliar quais fontes extracelulares de adenosina poderiam ser responsáveis pelo já registrado aumento de adenosina no meio extracelular após à exposição ao etanol. Os resultados aqui apresentados indicaram que a atividade enzimática foi aumentada em ambos os tratamentos, agudo e crônico, de uma forma

independente da expressão gênica, que por sua vez não sofreu alteração. Para avaliar se o aumento da ecto-5'-nucleotidase e conseqüentemente da hidrólise do AMP está relacionado às alterações morfológicas, nos utilizamos o AOPCP, um inibidor da ecto-5'-nucleotidase. Visualmente não houve diferença perceptiva, mas estatisticamente nossas análises mostraram uma reversão de 2 e 8% (50 e 200 nM de AOPCP) no comprimento corporal das larvas pré-expostas ao inibidor da ecto-5'-nucleotidase quando comparado com os animais tratados com etanol de forma aguda. Assim, o pré-tratamento com AOPCP não preveniu os efeitos causados pelo etanol, pois essa pequena reversão não foi suficiente para retomar a situação controle. Devemos, entretanto considerar a possibilidade do AOPCP não ter promovido a inibição necessária para prevenir os danos morfológicos, porém foram testadas 3 doses não letais, imediatamente antes da exposição ao etanol, presumindo-se que o inibidor estivesse trabalhando no momento da exposição. Outra possibilidade é que o aumento dos níveis de adenosina esteja relacionado com outras fontes, como a inibição dos transportadores de nucleosídeos.

Estudos em roedores demonstraram que o etanol é capaz de inibir transportadores equilibrativos de nucleosídeos, os quais são os principais transportadores de adenosina, especialmente no Sistema Nervoso Central (Dunwiddie and Masino, 2001). A fim de avaliar a inibição dos transportadores de nucleosídeos nos efeitos morfológicos causados pelo etanol, foi usado o dipiridamol. O dipiridamol por si só não alterou as características morfológicas avaliadas (área da superfície dos olhos, distância ocular e comprimento corporal). Entretanto, a inibição do transporte de nucleosídeo foi capaz de promover maior suscetibilidade aos efeitos morfológicos induzidos pela exposição aguda ao etanol, causando uma piora em todos os parâmetros morfológicos avaliados, provavelmente pelo prejuízo na recaptção da adenosina.

Embora não existam informações suficientes para afirmar que as alterações morfológicas induzidas pela exposição aguda ao etanol em fases iniciais do desenvolvimento sejam dependentes da ativação de receptores de adenosina, sabe-se que a ativação de receptores de adenosina, em especial os receptores A₁, na fase embrionária e neonatal é capaz de reduzir drasticamente o desenvolvimento corporal global, com ênfase no desenvolvimento dos sistemas cardíaco e nervoso central (Rivkees et al., 2001).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que não há doses seguras de etanol determinadas para o consumo por gestantes e que essa determinação não pode ser feita experimentalmente, pois não há como expor gestantes a doses variadas de álcool para testar seus efeitos, as informações disponíveis surgem de estudos com animais. Nesse contexto, o peixe-zebra tem-se mostrado um modelo valioso para estudos toxicológicos e de desenvolvimento, visto que permite o acesso a fases do desenvolvimento as quais em modelos de mamíferos são dificultadas pelo desenvolvimento intrauterino.

Considerando o envolvimento do sistema purinérgico nos efeitos causados pela exposição ao etanol e as mudanças que ocorrem nos níveis extracelulares de adenosina após exposições agudas e crônicas, nossos resultados contribuíram para a pesquisa dos efeitos da modulação adenosinérgica sob o efeito do etanol demonstrando que as alterações morfológicas produzidas pelo etanol em peixe-zebra podem estar associadas com o aumento dos níveis de adenosina. A elevação dos níveis extracelulares pode receber contribuições da elevação na atividade da ecto-5'-nucleotidase e da inibição da recaptção da adenosina por intermédio dos transportadores de nucleosídeos, sendo que este último mecanismo parece estar fortemente relacionado com os efeitos morfológicos característicos da exposição ao etanol.

Embora a exposição gestacional ao etanol tenha sua origem em deficiências socioeducacionais e que campanhas de prevenção sejam possivelmente o processo chave para reduzir as sequelas do abuso desta droga por gestantes, o estudo dos mecanismos bioquímicos básicos pelos quais as marcantes alterações morfológicas e comportamentais ocorrem é passo importante para o manejo no acompanhamento dos indivíduos afetados, bem como subsídio para campanhas preventivas.

REFERÊNCIAS

Adams CL, Cowen MS, Short JL, Lawrence AJ. Combined antagonism of glutamate mGlu5 and adenosine A2A receptors interact to regulate alcohol-seeking in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11:229–241.

Ali S, Champagne DL, Alia A, Richardson MK Large-Scale Analysis of Acute Ethanol Exposure in Zebrafish Development: A Critical Time Window and Resilience. *PLoS ONE*. 2011; 6(5): 1.

Arenzana FJ, Carvan MJ, Aijón J, Sánchez-González R, Arévalo R, Porteros A. Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol*. 2006; 28(3):342-8.

Blader P, Strahle U. Ethanol Impairs Migration of the Prechordal Plate in the Zebrafish Embryo. *Developmental Biology*. 1998; 201:185–201.

Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns*. 9(3):144-51, 2009.

Buske C, Gerlai R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. *Dev Psychobiol*. 2012; 54(1): 28-35.

Bilotta J, Barnett JA, Hancock L, Saszik S. Ethanol exposure alters zebrafish development: A novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and Teratology*. 2004; 26: 737-743.

Bianchi V, Spychala J. Mammalian 5' -Nucleotidases. *Biochemistry*. 2003: 46195-46198.

Bode C. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Cl Ga*. 2003; 17 (4): 575–592.

Bode C, Bode JC. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health Res W*. 1997; 21(1): 76-83.

Capiotti KM, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*. 2011; 33: 680–685.

Carvan MJ, Loucks E, Weber DN, Williams FE. Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol. Teratol*. 2004; 26:757–768.

Cassini C, Linden R. Prenatal exposure to ethanol: toxicity, biomarkers and detection methods. *Rev Psiq Clín.* 2011; 38(3): 116-21.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991-2005. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58(19): 529-32.

Chaudhuri JD. Alcohol and developing fetus: a review. *Med Sci Monit.* 2000; 6(5): 1031-41.

Choi DS, et al. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci.* 2004; 7:855–861.

Clark M, Dar MS. Effect of acute ethanol on release of endogenous adenosine from rat cerebellar synaptosomes. *J Neurochem.* 1989; 52(6):1859-65.

Cognato GP, Bonan CD. Ectonucleotidases and Epilepsy. *The Open Neuroscience Journal.* 2010; 4:44-52.

Collis MG, Houani SMO. Adenosine receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences.* 1993; 14: 360-366.

Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol.* 2009; 44: 115–127.

Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purnergic Signalling.* 2005;1:111–134.

Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 2001; 38(2): 107-25.

Daly JW, Shi D, Wong V, Nikodijevic O. Chronic effects of ethanol on central adenosine function in mice. *Brain Res.* 1994; 650:153–156.

Dasmahapatra AK, Khan IA. Gene-specific disruption of endocannabinoid receptor 1 (cnr1a) by ethanol probably leads to the development of fetal alcohol spectrum disorder (FASD) phenotypes in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2014; S1532-0456(14): 00127-6.

De la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuro- pathol.* 2014;127(1):71–90.

Dohrman DP, Diamond I, Gordon AS. The Role of the Neuromodulator Adenosine in Alcohol's Actions. *Alcohol Health & Research World.* 1997; 21 (2): 136-143.

Dunwiddie TV, Masino SA. The Role And Regulation Of Adenosine In The Central Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 31-55.

Fernandes Y, Gerlai R. Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2009; 33(4): 601-9.

Fredholm BB; Chen JF; Cunha RA; Svenningsson P; Vaugois JM. Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology.* 2005: 63(1): 191-270.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53(4):527-52.

Galduróz JCF, Carlini EA. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil – 2001. *Braz Jour of Medl and Bio Res.* 2007; 40: 367-375.

Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med.* 2005; 230: 394-406.

Goggin SL, Caldwell KK, Cunningham LA, Allan AM. Prenatal alcohol exposure alters p35, CDK5 and GSK3 β in the medial frontal cortex and hippocampus of adolescent mice. *Toxicol Rep.* 2014; 1: 544-53.

Guillén-Gómez E, et al. Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J Neurochem.* 2004; 90:883–893.

Howarth DL, Passeri M, Sadler KC. Drinks Like a Fish: Using Zebrafish to Understand Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clin and Exp Res.* 2011; 35: 826–829.

Heyliger CE, Panagia V, Dhalla NS. Effect of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors on cardiac sarcolemmal 5'-nucleotidase. *J Pharmacol Exp Therap.* 1981; 217 (2): 489-493.

Heilbronn A, Maienschein V, Carstensen K, Gann W, Zimmermann H. Crucial role of esco-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuro Report.* 1995; 7: 257-261.

Hirschhorn R, Ratech H. Isozymes of adenosine deaminase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.* 1980; 4: 131-157.

Jarvis MF, Becker HC. Single and repeated episodes of ethanol withdrawal increase adenosine A1, but not A2A, receptor density in mouse brain. *Brain Res.* 1998; 786(1-2):80-8.
Li H, Henry JL. Adenosine A2 receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1998; 24 (347):173-82.

Jian R, Sun Y, Wang Y, Yu J, Zhong L, and Zhou P. CD73 protects kidney from ischemia-reperfusion injury through reduction of free radicals. *APMIS*. 2012; 120:130–138.

Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*. 1973; 2: 999-1001.

Kashyap B, Frederickson LC, Stenkamp DL. Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Vis Neurosci*. 2007; 24(3):409-21.

Kaup ZOL, Merighi MAB, Tsunehiro MA. Avaliação do Consumo de Bebida Alcoólica Durante a Gravidez. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2001; 23(9): 575-580..

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995; 203(3):253-310.

Krauss SW, Ghirnikar RB, Diamond I, Gordon AS. Inhibition of Adenosine Uptake by Ethanol Is Specific for One Class of Nucleoside Transporters. *Molecular Pharmacology*. 1993; 44:1021-1026.

Lantz CL, Pulimood NS, Rodrigues-Junior WS, Chen CK, Manhaes AC, Kalatsky VA, Medina AE. Visual defects in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. *Front Pediatr*. 2014; 9(2):107.

Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Les enfants des parents alcooliques: anomalies observées. A propos de 127 cas. *Ouest Med*. 1968; 21: 476-82.

Leu YW, Chu PY, Chen CM, Yeh KT, Liu YM, Lee YH, Kuo ST, Hsiao SH. Early life ethanol exposure causes long-lasting disturbances in rat mesenchymal stem cells via epigenetic modifications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 291X(14): 01709-4.

Li Y, Wang H. In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. *Pharmacol Res*. 2004; 49(5):467-73.

Lockwood B, Bjerke S, Kobayashi K, Guo S. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004; 77(3):647-54.

Lonze BE; Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002; 35: 605-23.

Loucks E, Ahlgren S. Assessing Teratogenic Changes in a Zebrafish Model of Fetal Alcohol Exposure. *J. Vis. Exp*. 2012; 61:e3704.

Loucks E, Carvan MJ. Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 2004; 26:745–755.

Loucks EJ, Schwend T, Ahlgren SC. Molecular changes associated with teratogen-induced cyclopia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79(9):642-651.

Loucks EJ, Ahlgren SC. Deciphering the role of Shh signaling in axial defects produced by ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(6):556-67.

Mahabir S, Chatterjee D, Buske C, and Gerlai R. Maturation of shoaling in two zebrafish strains: A behavioral and neurochemical analysis. *Behav. Brain Res.* 2013; 247C:1-8.

Maier SA, Galellis JR, McDermid HE. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J Mol Evol.* 2005; 61(6): 776-794.

Marek E, Kraft WK. Ethanol Pharmacokinetics in Neonates and Infants. *Current Therapeutic Research.* 2014; 76: 90–97.

Momino W. Exposição Materna ao Álcool e Incidência de Sinais Característicos da Síndrome do Álcool Fetal em Adolescentes Infratores e em Escolares de Porto Alegre. 2005. 100f. *Tese (Doutorado em Genética e Biologia)*. Departamento de Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre.

Momino W, Sanseverino MTV, Schüler–Faccini L. A exposição pré-natal ao álcool como fator de risco para comportamentos disfuncionais: o papel do pediatra. *J Pediatr (Rio J)*. 2008; 84(4 Suppl): 76-79.

Mukherjee RA, Hollins S, Abou-Saleh MT, Turk J. Low level alcohol consumption and the fetus. *BMJ.* 2005; (7488): 375-6.

Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S. Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005; 334:1343–1350.

Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annual Review in Pharmacology. Toxic.* 1990; 35: 581-606.

O'Malley K, Storoz L. Fetal alcohol spectrum disorder and ADHD: diagnostic implications and therapeutic consequences. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2003; 3 (4): 477-489.

OMS- WHO - World Health Organization. Global status report on alcohol and health. 2014. Disponível em [http: <www.who.int>](http://www.who.int).

Pandey SC., et al. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2762-7.

Plawecki MH, Crabb DW. Metabolism. *Alcohol and the Nervous System: Handbook of Clinical Neurology.* 2014; 125: (3rd series).

Prediger RDS, Batista LC, Takahashi RN. Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *Exp J Pharmacol.* 2004; 499:147–154.

Rao V, Chaudhuri JD. Effect of gestational ethanol exposure on long-term memory formation in newborn chicks. *Alcohol.* 2007; 41(6): 433-9.

Rathbone MP, et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology.* 1999; 59: 663-690.

Ribeiro EM, Gonzalez CH. Síndrome Alcoólica Fetal: Revisão. *Pediatria (São Paulo).* 1995; 17 (1): 48-56.

Rico EP, et al. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Journal Neurochem. Int.* 2008; 52 (1-2): 290-296.

Rivkees S, Zhao Z, Porter G, et al. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Genet Metab.* 2001;74:160–171.

Rojas CV, Hicks JJ. Síndrome de alcoholismo fetal. *J Ginecol Obstetr. Mex.* 1990; 58: 226-232.

Ruby CL, Adams CA, Knight EJ, Nam HW, Choi DS. An Essential Role for Adenosine Signaling in Alcohol Abuse. *Current Drug Abuse Reviews.* 2010; 3: 163-174.

Scheimann WP, Hicks JL. ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phosphoinositide metabolism in pregnant guinea pig myometrium. *American Journal of Physiology.* 1991; 261: 665-672.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(9):341-6.

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.

Setshedi M, Wands JR, de la Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(3):178–185.

Sharma R, Engemann SC, Sahota P, Thakkar MM. Effects of ethanol on extracellular levels of adenosine in the basal forebrain: an in vivo microdialysis study in freely behaving rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010; 34:813–818.

Stenkamp DL, Frey RA, Mallory DE, Shupe EE. Embryonic retinal gene expression in sonic-you mutant zebrafish. *Developmental Dynamics.* 2002; 225:344–350.

Strater N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signalling.* 2006; 2: 343–350.

Tal TL, et al. MicroRNAs control neurobehavioral development and function in zebrafish. *Faseb J.* 2012; 26: 1452–1461.

Thakkar MM, Engemann SC, Sharma R, Sahota P. Role of wake-promoting basal forebrain and adenosinergic mechanisms in sleep-promoting effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010; 34:997–1005.

Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med.* 2004; 200: 1395–1405.

Tracy RB, Mark AP. Neuroadaptations in Adenosine Receptor Signaling Following Long-Term Ethanol Exposure and Withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012; 36(1): 4–13.

Tran S, Nowicki M, Chatterjee D, Gerlai R. Acute and chronic ethanol exposure differentially alters alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity in the zebrafish liver. *Prog Neuro-Psychoph* 2015; 56: 221–226.

Tufan AC, Abban G, Akdogan I, Erdogan D, Ozogul C. The effect of in ovo ethanol exposure on retina and optic nerve in a chick embryo model system. *Reprod Toxicol.* 2007 ; 23(1): 75-82.

Volpato S, et al. Síndrome alcoólica fetal: Relato de caso na clínica odontológica. *Unoesc & Ciência.* 2011; 1(2): 165-82.

Zavialov AV, Engstrom A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J.* 2005; 391(1): 51-57.

Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1996;49:589–618.

Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Pur Signalling neuron-glia int.* 2006; 276: 113-130.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Development.* 2001; 52, 44–56.

Zimmermann H. Signaling via ATP in the nervous system. *TINS*. 1994; 17: 420-26.

Whaley SE, O'Connor MJ, Gunderson B. Comparison of the adaptive functioning of children prenatally exposed to alcohol to a non exposed clinical sample. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25(7): 1018-24.

Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene. 2000.

Yakovleva T, Bazov I, Watanabe H, Hauser KF, Bakalkin G. Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF- κ B system. *Brain Behav. Immun*. 2011; 1: 29–38.

Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, Ou Z, Yang J, Zhou P, Shao Z. Ecto-50 nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin Exp Metastasis*. 2013; 30: 671–80.

CAPÍTULO 4

7. ANEXOS

7.1 Carta de Submissão

7.2 Normas da Revista

7.1 Carta de Submissão

De: ees_rtx.0.2e085b.700fa73d@eesmail.elsevier.com [ees_rtx.0.2e085b.700fa73d@eesmail.elsevier.com] em nome de Reproductive Toxicology [rtx@louisville.edu]
Enviado: sexta-feira, 19 de dezembro de 2014 11:39
Para: Rosane Souza da Silva; rosanesouzadasilva@gmail.com
Assunto: Submission Confirmation for Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae

Re: Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae
by %ALL AUTHORS%
%ARTICLE TYPE%

Dear Dr. Da Silva,

Your submission entitled "Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae" has been received by Reproductive Toxicology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/rtx/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your manuscript to Reproductive Toxicology.

Warmest Regards,

Reproductive Toxicology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

7.2 Normas da Revista

AUTHOR INFORMATION

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

IMPACT FACTOR

2013: 2.771 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

AUTHOR INFORMATION PACK 20 Dec 2014 www.elsevier.com/locate/reprotox 2

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Drawing from a large number of disciplines, *Reproductive Toxicology* publishes timely, original research on the influence of chemical and physical agents on reproduction. Written by and for obstetricians, pediatricians, embryologists, teratologists, geneticists, toxicologists, andrologists, and others interested in detecting potential reproductive hazards, the journal is a forum for communication among researchers and practitioners. Articles focus on the application of in vitro, animal and clinical research to the practice of clinical medicine.

All aspects of reproduction are within the scope of *Reproductive Toxicology*, including the formation and maturation of male and female gametes, sexual function, the events surrounding the fusion of gametes and the development of the fertilized ovum, nourishment and transport of the conceptus within the genital tract, implantation, embryogenesis, intrauterine growth, placentation and placental function, parturition, lactation and neonatal survival. Adverse reproductive effects in males will be considered as significant as adverse effects occurring in females. To provide a balanced presentation of approaches, equal emphasis will be given to clinical and animal or in vitro work. Typical end points that will be studied by contributors include infertility, sexual dysfunction, spontaneous abortion, malformations, abnormal histogenesis, stillbirth, intrauterine growth retardation, prematurity, behavioral abnormalities, and perinatal mortality.

Types of paper

In addition to original research articles, *Reproductive Toxicology* also publishes interpretative review articles, editorials, letters, book reviews, and conference announcements. The first section of each issue of the journal is devoted to an in-depth, timely review of research on the effect of particular chemical or physical agents on reproduction. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before submitting such a review.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your

manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

AUTHOR INFORMATION PACK 20 Dec 2014 www.elsevier.com/locate/reprotox 8

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the

Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should contain no more than 150 words.**

AUTHOR INFORMATION PACK 20 Dec 2014 www.elsevier.com/locate/reprotox 9

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system.

Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

AUTHOR INFORMATION PACK 20 Dec 2014 www.elsevier.com/locate/reprotox 10

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

AUTHOR INFORMATION PACK 20 Dec 2014 www.elsevier.com/locate/reprotox 11

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.