



CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO COMPORTAMENTAL DA ABSTINÊNCIA ALCOÓLICA EM *DANIO RERIO*

Suianny Nayara da Silva Chaves,
Lucas Nunes Pereira,
Izamiky Sousa da Silva,
Monica Gomes Lima,
Caio Maximino de Oliveira

Agência Financiadora: PIBIC/CNPQ

Área: Neurociências

1. INTRODUÇÃO

O paulistinha tem emergido como um modelo útil para o estudo de funções genéticas, neurofarmacológicas e comportamentais (KEY; DEVINE, 2003). A sua utilização possibilita uma série de vantagens, tais como o baixo custo de aquisição e manutenção, facilidade de manuseio e acomodação, curto tempo de vida e facilidade de reprodução em laboratório. O paulistinha também é um bom modelo de estudo sobre ansiedade e estresse, além de possuir grande homologia genética, neural e endócrino com roedores e seres humanos (MAXIMINO et al., 2010).

As síndromes de abstinência representam uma importante fonte de sofrimento psíquico para usuários de drogas, representando um critério diagnóstico central para a classificação de dependência (KRYSTAL; TABAKOFF, 2002). Dentre as drogas mais largamente utilizadas no Brasil e no mundo, o etanol é o mais prevalente (CARLINI et al., 2007, 2010; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). O uso crônico dessa droga produz adaptações e toxicidade que subjazem a tolerância e a dependência (GATCH; LAL, 2001; KRYSTAL; TABAKOFF, 2002). A síndrome de abstinência do etanol inclui sintomas de ansiedade, insônia, e hiperexcitabilidade autonômica (KRYSTAL; TABAKOFF, 2002). Em níveis mais severos de dependência, com episódios repetidos de abstinência, a síndrome pode incluir hiperexcitabilidade autonômica bastante significativa, agitação, mudanças perceptuais, confusão mental, e convulsões. Esses sintomas podem emergir em um contexto de delirium tremens, uma complicação possivelmente fatal que normalmente se desenvolve na primeira semana de sobriedade (LONGO; SCHUCKIT, 2014). A motivação para evitar ou cessar os sintomas da abstinência pode ser importante para a recidiva do uso abusivo (KOOB, 2013; KOOB; LE MOAL, 2008).

O uso crônico do etanol produz adaptações e toxicidade que pressupõe a tolerância e a dependência. A produção de modelos animais de abstinência pode ajudar a elucidar os mecanismos comportamentais e neuroquímicos dessa condição, como propor possíveis tratamentos. O presente plano propõe a utilização do comportamento tipo-ansiedade e de convulsões epilépticas do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) para analisar o efeito a abstinência alcoólica após a administração crônica dessa droga.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Revisão Sistemática e Metanálise

O protocolo para a meta-análise foi pré-registrado no banco de dados de análise sistemática e meta-análise (SyRF) CAMARADES-NC3Rs (<https://drive.google.com/file/d/0B7Z0eAxKc8ApUjcyQjhwVnFjRFE/view?usp=sharing>). Não foram feitas modificações no protocolo pré-registrado. O artigo com a retirada de etanol dos descritores e o "peixe-zebra" foram pesquisados no PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), usando um filtro de pesquisa otimizado para encontrar estudos sobre experimentação animal no PubMed (Hooijmans et al., 2010). Os dados bibliográficos (incluindo DOI, data de publicação, título e resumo) dos estudos identificados na revisão sistemática foram exportados para uma planilha. Cada artigo da lista foi revisado em quatro níveis de detalhe (título, resumo, texto completo e uma revisão detalhada do projeto experimental) para determinar sua elegibilidade para a meta-análise. Seguindo Mohammad et al. (2016), os estudos devem incluir (1) dados comportamentais primários obtidos em testes de comportamento semelhante a ansiedade no peixe-zebra (teste

de luz / escuridão, teste do tanque novo, respostas antipredador, respostas de descamação); (2) relato de controles apropriados; e (3) relatórios de pelo menos tamanhos de amostra e estatísticas resumidas (tendência central e medidas de dispersão) para grupos de controle e retirada. Em experimentos que avaliaram os efeitos de drogas ou outras intervenções sobre o comportamento sob retirada, somente os grupos de controle e retirada foram considerados. Os possíveis confrontos em relação ao papel do desenvolvimento foram reduzidos pela exclusão de estudos que não foram realizados em peixes adultos.

Os seguintes dados foram extraídos de cada estudo incluído: identificação (DOI, autores, ano de publicação); Estirpe / fenótipo; concentração de etanol durante a exposição; duração do tratamento com EtOH; duração da retirada; teste comportamental que foi usado; meios e desvios padrão, bem como estatísticas de teste e graus de liberdade; e tamanhos de amostra (N) para cada grupo. Os dados que foram representados graficamente foram extraídos de figuras usando PlotDigitizer (<http://plotdigitizer.sourceforge.net/>). Quando várias variáveis dependentes foram relatadas, apenas o ponto final primário foi usado (tempo no branco, tempo no fundo, distância do estímulo). Todas as estimativas foram transformadas em diferenças de médias padronizadas (SMD), corrigidas pelo viés positivo (Hedges e Olkin, 1985), com estimativas imparciais de variâncias de amostragem e intervalos de confiança no nível de 95%, valores de heterogeneidade I^2 e τ^2 e p -valores usando um modelo de efeitos mistos, com concentração, duração da exposição e tempo de retirada usados como moderadores. O diagnóstico de caso influente foi feito por inspeção de lotes para resíduos externamente padronizados, valores de DFFITS, distâncias de Cook, taxas de covariância, estimativas de τ^2 e estatísticas de teste para heterogeneidade residual quando cada estudo é removido por sua vez, valores de chapéu e pesos para cada estudo incluído na análise. O viés de publicação foi avaliado por inspeção de um gráfico de funil com contorno, com contornos nos intervalos de confiança de 90%, 95% e 99%. Além disso, a assimetria do enredo de funil foi analisada usando um teste de meta-regressão, com tamanho total de amostras como preditor (Egger et al., 1997). O poder observado para cada estudo foi calculado com base em tamanhos de efeitos, tamanhos de amostra e desvios padrão, e ajustados contra SMDs por modelos de aditivos generalizados. Finalmente, a qualidade do estudo foi avaliada usando a ferramenta de Risco de Bias (RoB) do SYRCLE (Hooijmans et al., 2014), e ajustada contra SMDs por modelos de aditivos generalizados. A meta-análise foi feita com o pacote metafor de R (Viechtbauer, 2015).

Exposição e retirada de etanol

Teste claro / escuro

10 animais no grupo controle, 14 no grupo de retirada.

Os dados foram analisados através de testes de permutação Fisher-Pitman aproximados de duas amostras com permutação com 1.000 repetições. Os dados são apresentados usando parcelas de ponto individuais combinadas com resumos de intervalos de confiança no nível de 95%. As diferenças de médias padronizadas com estimativas de variância imparcial foram calculadas usando o metafor do pacote R. Todas as análises e gráficos foram feitos usando R versão 3.3.0.

Convulsões induzidas por pilocarpina

Imediatamente após o teste luz / escuro, os animais foram injetados com uma dose de 150 mg / kg de pilocarpina. Esta dose mostrou ser insuficiente para produzir ataques clônicos e tônicos-clônicos em animais adultos (Pinto, 2015). 15 minutos após a injeção, os animais foram transferidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aplicação de um teste de permutação com 1.000 repetições, foi encontrado um efeito sugestivo da concentração de EtOH, mas não dos outros mediadores. A alta heterogeneidade sugere que outros moderadores possam influenciar os efeitos da retirada de EtOH.

Os animais foram expostos continuamente a concentrações crescentes de EtOH (de 0,125% até 0,5% nos últimos 4 dias) durante 16 dias e, em seguida, colocando os animais em água sem EtOH durante 1 h. Tran et al. (2015) mostrou que, 60 minutos após a retirada, o EtOH não pode mais ser detectado no cérebro do peixe zebra. Testamos o comportamento do peixe zebra no teste luz / escuridão (Maximino et al., 2010), com a adição de variáveis "etológicas" (natação errática, congelamento, tigmotaxia e avaliação de risco). Os dados brutos para este experimento podem ser encontrados em nosso repositório GitHub (<https://github.com/lanec-unifesspa/etoh-withdrawal>).

Diferentemente de outras experiências que relataram nenhum efeito da retirada de EtOH no teste luz / escuridão (Mathur e Guo, 2011; Pittman e Ichikawa, 2013), a retirada aumentou o tempo em branco ($Z = 2,207$, $p = 0,0261$; SMDUB = 0,995, Figura 3A, índices de preferência na inserção), sem afetar a duração da entrada ($Z = 0,92305$, $p = 0,4301$; SMDUB = -0,392). Isso está de acordo com a condição "diária-moderada" em Holcombe et al. (2013), que mostrou uma diminuição na escototaxia após o uso do mesmo perfil de exposição que apresentamos. Como pode ser depreciado da meta-análise, os tamanhos de efeito calculados

para a escototaxia no experimento Holcombe et al. (2013) são semelhantes em direção e magnitude (SMDUB = -1,08, IC 95% [-1,86 , -0.31] na experiência "diária-moderada"). O estudo Mathur e Guo (2011) usou uma maior concentração de EtOH (1%), mas um período de exposição mais curto (8 dias). Enquanto Pittman e Ichikawa (2013) usaram um período de exposição semelhante (14 dias), a concentração foi muito maior (3%); Em ambos os estudos, a retirada de EtOH não afetou a escototaxia.

Ao seguir apenas os efeitos sobre a scototaxia, confirma os achados relatados em Holcombe et al. (2013), esses achados contradizem os resultados globais da meta-análise, o que sugeriu que a retirada de EtOH aumenta ALB no peixe-zebra. Se outras variáveis forem consideradas, no entanto, a imagem muda: a retirada não aumentou a natação errática ($Z = 1,9389$, $p = 0,0564$, SMDUB = 0,890), mas aumentou a avaliação de risco ($Z = 1,9895$, $p = 0,0405$, SMDUB = 0,918). O congelamento ($Z = 0,8082$, $P = 0,7003$, SMDUB =) e tigmotaxia ($Z = 0,41291$, $p = 0,7024$, SMDUB =) não foram afetados. Quanto aos efeitos do motor, as transições para o branco não foram afetadas pela retirada ($Z = 0,91765$, $p = 0,3763$, SMDUB = 0,39), mas o número de quadrados cruzados foi maior nos animais expostos à retirada ($Z = 2,5965$, $p = 0.0034$, SMDUB = 1.31).

Apenas três animais do grupo controle apresentaram convulsões de Score III após 150 mg / kg de pilocarpina, replicando achados de. Todos os animais do grupo de retirada apresentaram apreensões de Score III após pilocarpina. Depois de aplicar um modelo de log-rank para as diferenças de latências para Score III, uma diferença sugestiva foi observada no grupo de retirada (χ^2 [df = 1] = 8.4, $p = 0.00386$).

REFERÊNCIAS

CARLINI, E. L. DE A. et al. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: [s.n.].

CARLINI, E. L. DE A. et al. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras. Brasília: [s.n.].

GATCH, M. B.; LAL, H. Animal models of the anxiogenic effects of ethanol withdrawal. *Drug Development Research*, v. 54, p. 95–115, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde - 2013: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: [s.n.].

KEY, B.; DEVINE, C. A. Zebrafish as an experimental model: Strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods in Cell Science*, v. 25, p. 1–6, jan. 2003.

KOOB, G. F. Negative reinforcement in drug addiction: The darkness within. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 23, p. 559–563, 2013.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society Part B*, v. 363, p. 3113–3123, 2008.

KRYSTAL, J. J. H.; TABAKOFF, B. Ethanol abuse, dependence, and withdrawal: Neurobiology and clinical implications. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002. p. 1425–1443.

LONGO, D. L.; SCHUCKIT, M. A. Recognition and management of withdrawal delirium (delirium tremens). *New England Journal of Medicine*, v. 371, p. 2109–2113, 27 nov. 2014.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, v. 214, p. 157–171, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on alcohol and health 2014. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf>.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, v. 5, n. 2, p. 209–216, 2010b.