

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

Avaliação do efeito *in vitro* do etanol e seu metabólito acetaldeído sobre a captação de glutamato e a atividade da enzima lactato desidrogenase em cérebro de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Kamila Cagliari Zenki

Porto Alegre, junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

Avaliação do efeito *in vitro* do etanol e seu metabólito acetaldeído sobre a captação de glutamato e a atividade da enzima lactato desidrogenase em cérebro de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Kamila Cagliari Zenki

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Lösch de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre, junho de 2012.

"Se você quer ter boas ideias, você precisa ter muitas ideias. A maioria delas estará errada, o que você precisa aprender é quais delas deve descartar."

"If you want to have good ideas you must have many ideas. Most of them will be wrong, and what you have to learn is which ones to throw away."

(LINUS PAULING)

Agradecimentos

Aos meus pais, Irvolei e Lourdes e minha irmã Karina, não bastaria um simples agradecimento. São os pilares deste trabalho e as raízes dos frutos que estou colhendo agora. Muito obrigada por estarem comigo sempre, mesmo quando estavam distantes e por tornarem este sonho possível, por iluminarem minha vida e meus pensamentos.

Ao meu companheiro, Eduardo Kalinine, fonte de inspiração diária. Obrigada pela compreensão, pelo amor e pelo respeito. Esteve comigo nos momentos mais decisivos, sempre paciente e verdadeiro. Eu te amo.

Ao meu orientador, Diogo Lösch de Oliveira, por me fazer confiante em meu trabalho e por acreditar em mim. Por ter me ensinado e trilhado o caminho que tornou este trabalho possível de ser realizado. Muito obrigada pela tua orientação ímpar e pelo carinho.

Ao meu co-orientador, Luis Valmor Cruz Portela, agradeço pela amizade, pelas gargalhadas e pelos conhecimentos que vão além da bancada. Obrigada por confiar.

Aos colegas do laboratório 24 pela convivência e coleguismo. Agradeço a todos pelos ensinamentos repassados, de maneira especial à Mery e ao Ben Hur que acompanharam meus passos iniciais e se dedicaram por mim, ao Denis e ao Rico que são responsáveis pelo meu encantamento pela área de desenvolvimento deste trabalho. Cássio, Sandro e aos novatos bolsistas, obrigada pelo excelente ambiente de trabalho. Todos vocês são parte da minha

vida e meus amigos. Agradeço pelo auxílio para o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas do laboratório 26 e 28 pela parceria maravilhosa. Agradeço a todos pelo convívio e pela valiosa sabedoria compartilhada. Agradeço em especial a Clarissa e ao Zimmer por terem sido ótimos colegas na bancada e amigos fora dela.

Aos colegas de turma que acompanharam minha trajetória e são partes fundamentais desta conquista. Estar com vocês durante estes anos foi sempre bom e deixará saudades. Obrigada pela ajuda e pela convivência. Agradeço em especial a Soraia, uma grande amiga e agora parceira de trabalho. Obrigada por iluminar minha vida com o teu sorriso e por compartilhar das minhas idéias.

Aos meus amigos, que tornaram minha vida alegre e me acolheram nos momentos necessários. Obrigada pela cumplicidade, em especial a Daiane, companheira de vários anos.

Ao Departamento de Bioquímica por fornecer instalações e recursos adequados para a realização deste trabalho. Agradeço ao Diogão, ao professor Renato e aos demais professores pelo empenho para a qualidade da produção científica e por lutarem pela construção e melhoria diária do departamento.

A Faculdade de Farmácia, obrigada pelos recursos fundamentais oferecidos para minha formação. Aos profissionais e professores, sou imensamente grata por orientarem meus passos para esta linda profissão e por me fazerem sentir orgulho em ser farmacêutica.

A banca avaliadora por aceitar o convite, pelo auxílio crítico, pela leitura e exame deste trabalho de conclusão de curso.

Ao CNPQ, muito obrigada pela bolsa concedida e por subsidiar o desenvolvimento da pesquisa brasileira com seriedade.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de excelência, serei eternamente grata.

Este trabalho foi escrito em formato de artigo científico, seguindo as normas para submissão de artigo da revista *Toxicology in vitro*, as quais estão contidas no Anexo 1.

Avaliação do efeito *in vitro* do etanol e seu metabólito acetaldeído sobre a captação de glutamato e a atividade da enzima lactato desidrogenase em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*)

Kamila Cagliari Zenki, Ben Hur Marins Mussulini, Denis Broock Rosemberg,
Luis Valmor Cruz Portela, Diogo Lösch de Oliveira

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-000, Porto Alegre, RS – Brasil.

Autor correspondente: Diogo Lösch de Oliveira, Fone: (51) 33085555, E-mail:
diogolosch@gmail.com

RESUMO

No alcoolismo, os efeitos do etanol e seus metabólitos sobre o sistema nervoso central (SNC) são resultantes do aumento da fluidez na membrana neuronal e da alteração da neurotransmissão através da modificação de enzimas e receptores de diversos sistemas neuroquímicos (GABA, serotonina, dopamina, etc). Entretanto, os efeitos do etanol e dos metabólitos formados são complexos e ainda não apresentam mecanismos completamente elucidados. O glutamato é o principal aminoácido excitatório do SNC e sua captação sináptica, realizada pelos EAATs, é de fundamental importância para a manutenção do tônus fisiológico da neurotransmissão glutamatérgica a fim de evitar a excitotoxicidade. O *zebrafish* tem sido cada vez mais utilizado como modelo animal em diversas áreas do conhecimento, tais como as neurociências, principalmente pelos mecanismos bioquímicos conservados e a similaridade de seu genoma já completamente sequenciado. Dessa maneira, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos *in vitro* do etanol e do acetaldeído sobre a captação de glutamato e seus possíveis efeitos tóxicos sobre o SNC de *zebrafish*. Para isto, foram investigadas as três estruturas cerebrais separadamente, o telencéfalo, tecto óptico e cerebelo, que foram pré-incubados por 15 minutos em meio HBSS (37°C) e posteriormente incubados com etanol ou acetaldeído em diferentes concentrações. Após as lavagens, as estruturas foram incubadas na presença de [³H]-Glu para verificar a captação de glutamato e avaliar a atividade da enzima LDH extracelular. Os resultados demonstraram que o etanol diminuiu significativamente a captação de glutamato nas três estruturas nas concentrações de 0,5% e 1%. Entretanto, a atividade da LDH não se correlaciona com esta diminuição, tendo em vista que observamos um aumento significativo da enzima em todas as concentrações testadas somente em cerebelo. O acetaldeído diminuiu drasticamente a captação em todas as concentrações testadas. Além disso, todas as estruturas apresentaram aumento significativo na liberação da LDH, porém a única estrutura sensível a todas as concentrações foi o telencéfalo. Portanto, pode-se concluir que tanto o etanol, quanto o acetaldeído alteram parâmetros do sistema glutamatérgico em SNC de *zebrafish* quando testados *in vitro* através da diminuição da captação de glutamato, o que não está necessariamente correlacionado com alteração na atividade da LDH.

Palavras-chave: etanol, acetaldeído, glutamato, LDH, *zebrafish*

SUMÁRIO

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA.....	15
2.1 Animais:	15
2.2 Materiais:.....	15
2.3 Preparação das amostras:	15
2.4 Tratamentos:	16
2.5 Captação de Glutamato:	16
2.6 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH):.....	17
2.7 Dosagem de proteínas:.....	18
2.8 Análise estatística:	18
3. RESULTADOS:	19
3.1 Captação de Glutamato:	19
3.2 Atividade da LDH:	20
4. DISCUSSÃO:	23
5. CONCLUSÃO.....	27

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo é uma desordem de recaídas crônica, caracterizado por repetitivo consumo de álcool e uma perda de controle sobre este consumo. Os diversos mecanismos moleculares envolvidos no alcoolismo e no abuso de álcool são complexos e geralmente inter-relacionados. As mudanças neuroadaptativas induzidas pelo álcool podem ser relacionadas a diversos fatores, como por exemplo, transcrição de genes, níveis de proteínas expressas e a desregulação de sistemas de neurotransmissores (GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina) (Moonat et al., 2010). A propensão ao uso abusivo de álcool pode variar entre os indivíduos de uma população, e isto se deve, dentre diversos fatores, às diferenças no metabolismo do mesmo. O etanol (EtOH) é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase, e observa-se a produção de acetaldeído (ALD). Este metabólito, por sua vez, é então metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase mitocondrial. (Goodman et al., 2011). Tanto o EtOH quanto seu metabólito ALD alteram a neurotransmissão no SNC, através de modificações na liberação de neurotransmissores, na funcionalidade de receptores e enzimas, além de modificar a fluidez de membrana (Nevo and Hamon, 1995; Reimers et al., 2004a; Samson and Harris, 1992).

O sistema glutamatérgico é o principal mecanismo de neurotransmissão excitatório do SNC de mamíferos, estando envolvido em processos fisiológicos tais como memória e aprendizado, proliferação e sobrevivência celular. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato se liga a seus receptores do tipo

ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) e/ou metabotrópicos (acoplados a proteína G) (Danbolt, 2001). Quantidades excessivas de glutamato extracelular e a hiperativação dos receptores contribuem para a morte neuronal, cujo fenômeno é denominado excitotoxicidade (Sattler and Rothstein, 2006). A hiperestimulação dos receptores de glutamato, principalmente do tipo NMDA, leva a um aumento dos níveis de cálcio intracelular, o qual está relacionado à necrose e apoptose celular. Para manter a concentração sináptica de glutamato abaixo daquelas consideradas tóxicas, a remoção deste neurotransmissor da fenda sináptica é realizada por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), os quais podem ser astrocitários (EAAT1/EAAT2) ou neuronais (EAAT3) (Anderson and Swanson, 2000; Sattler and Rothstein, 2006).

Mesmo em doses moderadas e em tratamentos agudos, o EtOH é capaz de modular a sinalização glutamatérgica (Dahchour et al., 1994). Alguns trabalhos demonstram que a ingestão aguda de EtOH diminui a liberação de glutamato, o que leva a alterações na memória de curta duração. Contudo, dependendo da dose de EtOH, a liberação de glutamato pode sofrer aumentos ou não ser alterada, apesar de modificar variados sistemas neurotransmissores (Dahchour et al., 1994; Gonzales et al., 1996; Moghaddam and Bolinao, 1994). Devido à complexidade dos efeitos farmacológicos e toxicológicos do EtOH e do ALD, tem crescido a busca por ferramentas e modelos de estudo para os mecanismos neurotoxicológicos promovidos pela administração de álcool.

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo que mede de 3 a 4 cm e pertence à família Cyprinidae. No final da década de 60, esta espécie foi

utilizada para estudos de desenvolvimento embrionário através de técnicas de mutagênese sítio-dirigida (Grunwald and Eisen, 2002). Assim, os estudos sobre embriogênese começaram a avançar rapidamente devido à presença de ovos translúcidos, prole elevada e rápido desenvolvimento (Dahm and Geisler, 2006). O pequeno espaço requerido para a manutenção dos animais, o baixo custo, a praticidade para tiragens em larga escala e o fato de seus genes serem evolutivamente conservados, apresentando alto grau de similaridade com os genes de mamíferos, são os motivos pelos quais este vertebrado tornou-se atraente em distintas áreas da pesquisa científica (Lieschke and Currie, 2007). Diversos trabalhos demonstram que o *zebrafish* é um excelente modelo para o estudo dos efeitos da exposição aguda e crônica ao EtOH, revelando alterações complexas em parâmetros comportamentais (Dlugos and Rabin, 2003; Gerlai et al., 2000; Gerlai et al., 2006) e neuroquímicos (Rico et al., 2011; Rosemberg et al., 2010). Além disso, já está bem elucidado que o EtOH é um agente teratogênico, o qual também é capaz de induzir malformações em embriões desta espécie (Blader and Strahle, 1998). Sugere-se que tais anomalias não são causadas diretamente pela presença do EtOH, mas sim, pelo aumento de ALD (Dasmahapatra et al., 2001), tendo em vista que a enzima álcool desidrogenase neste vertebrado apresenta alta homologia com a de vertebrados superiores (Lassen et al., 2005; Reimers et al., 2004b). Ao longo dos anos, alguns trabalhos demonstraram a resposta farmacológica do *zebrafish* a diversos estímulos glutamatérgicos, evidenciando a possibilidade da utilização deste modelo para estudos bioquímicos e comportamentais relacionados ao fenômeno de excitotoxicidade (Kanungo et al., 2011; Tiedeken et al., 2005).

Tendo em vista o que foi apresentado, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos *in vitro* do EtOH e do ALD sobre a captação de glutamato e seus possíveis efeitos tóxicos sobre o SNC de *zebrafish*.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais:

Zebrafish adultos (3 a 6 meses de idade), de ambos os sexos, foram obtidos comercialmente (Delphis, RS, Brasil) e passaram por um processo de aclimação às instalações por duas semanas anteriores ao início dos experimentos. Os animais foram mantidos em aquários de 50 L, aerados, com temperatura controlada ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$) em um ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acesas às 7:00 am) controlado por um sistema automatizado (Rosemberg et al., 2010). Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial flocada e manipulados de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número de protocolo – 2007950).

2.2 Materiais:

L-[^3H] glutamato foi adquirido da PerkinElmer® e o kit da enzima lactato desidrogenase da empresa Labtest®. O EtOH foi adquirido da Merck® (Darmstadt, Alemanha) e o ALD foi comprado da Fluka®.

2.3 Preparação das amostras:

Antes da remoção dos cérebros, os animais foram crioanestesiados e eutanasiados por decapitação conforme previamente descrito (Rico et al., 2010). As estruturas cerebrais (telencéfalo, tecto óptico e cerebelo) foram

dissecadas em placas de Petri com solução balanceada de Hank's (HBSS-HEPES) contendo (em mM): 137 NaCl; 0,63 Na₂HPO₄; 3,0 NaHCO₃; 5,36 KCl; 0,44 KH₂PO₄; 1,26 CaCl₂; 0,90 MgSO₄; 20 HEPES e 5,55 glicose, pH 7,2. Cada estrutura foi separada com o auxílio de um bisturi e transferida para placas de cultura de 24 poços contendo 0,5 mL de HBSS. Todas as placas foram mantidas a 37°C durante a execução do protocolo experimental.

2.4 Tratamentos:

Após um período de pré-incubação de 15 minutos, as estruturas foram tratadas com 0,3 mL de HBSS-HEPES contendo EtOH ou ALD nas concentrações de 0,25%, 0,5% ou 1% (v/v), durante 15 minutos, enquanto o grupo controle foi mantido somente em meio HBSS. Posteriormente, as estruturas foram lavadas duas vezes e os experimentos de captação de glutamato realizados. É importante ressaltar que estas concentrações de EtOH e ALD já foram utilizadas em estudos prévios tanto *in vitro* quanto *in vivo* utilizando o *zebrafish* como modelo experimental (Gerlai et al., 2000; Rico et al., 2007; Rico et al., 2008).

2.5 Captação de Glutamato:

A fim de verificar a captação de glutamato total, os experimentos foram realizados conforme previamente descrito por Rico e colaboradores (Rico et al., 2010). Após o tratamento com EtOH ou ALD, procedeu-se a incubação das estruturas com 20µL de L-[³H] glutamato em 0,28 mL de HBSS a 37°C, para obtenção de uma concentração final de 0,33 µCi/mL de L-[³H] glutamato. As

incubações foram interrompidas após 5 minutos (para telencéfalo) e 7 minutos (para tecto óptico e cerebelo) com HBSS gelado (0°C). A determinação do conteúdo intracelular de L-[³H] glutamato foi realizada através de contagem de cintilação e as proteínas foram dosadas. A captação independente de sódio foi determinada utilizando o mesmo protocolo experimental descrito anteriormente, substituindo-se o HBSS por meio contendo N-metil-D-glucamina em detrimento ao sódio presente. Os resultados obtidos pela captação na ausência de sódio foram subtraídos da captação total, de modo que se obteve o resultado final em captação dependente de sódio expressa em nmol/min.mg proteína (Rico et al., 2010).

2.6 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH):

A mensuração da atividade da enzima LDH liberada pelas células para o fluído extracelular é utilizada como um indicativo de dano celular e alterações na permeabilidade de membrana (Koh and Choi, 1987). Alguns autores descrevem que este efluxo é proporcional ao número de células que estão sofrendo algum tipo de dano pela alteração na permeabilidade de membrana (Koh and Choi, 1987; Koh and Cotman, 1992; Li and Zhang, 1997).

A execução da técnica no presente estudo foi baseada em trabalhos prévios de Fontella e colaboradores (Fontella et al., 2005), seguindo, portanto, as orientações do protocolo fornecido pelo kit. Após a reação catalizada pela LDH (conversão exógena de lactato a piruvato), o composto 1,10-fenantrolina é convertido em um complexo corado, através da formação enzimática de NADH por uma sequência de reações, que foi mensurado por método espectrofotométrico (490 nm). Após a captação de L-[³H] glutamato, o meio

HBSS no qual as estruturas estavam imersas foi coletado e armazenado em *eppendorfs* a 0°C. A atividade da LDH foi determinada nas alíquotas de meio obtidas, portanto após o experimento de captação. Para verificar a atividade da LDH total de cada estrutura analisada, que corresponde a 100% de atividade enzimática, as estruturas foram homogeneizadas com auxílio de uma seringa de insulina a fim de possibilitar a realização dos cálculos de percentual da LDH liberada em relação a quantidade de LDH total.

2.7 Dosagem de proteínas:

Para determinação do conteúdo proteico total, as estruturas foram adicionadas a 0,5 N de NaOH e foram incubadas *overnight*. A mensuração transcorreu com alíquotas de 10 µL de amostra, de acordo com o protocolo descrito por Peterson (Peterson, 1977).

2.8 Análise estatística:

Os dados estão expressos com média±erro padrão e foram analisados por ANOVA de uma via seguida por pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$ foi considerado como diferença significativa.

3. RESULTADOS:

3.1 Captação de Glutamato:

O tratamento com EtOH em telencéfalo reduziu significativamente o conteúdo do [³H] intracelular nas concentrações de 0,5 e 1%. (**Figura 1A**). No tecto óptico, houve uma diminuição significativa do [³H] intracelular nas três concentrações de EtOH utilizadas (**Figura 1B**). Em cerebelo, o conteúdo de [³H] intracelular diminuiu significativamente nas concentrações de 0,5% e 1% de EtOH (**Figura 1C**).

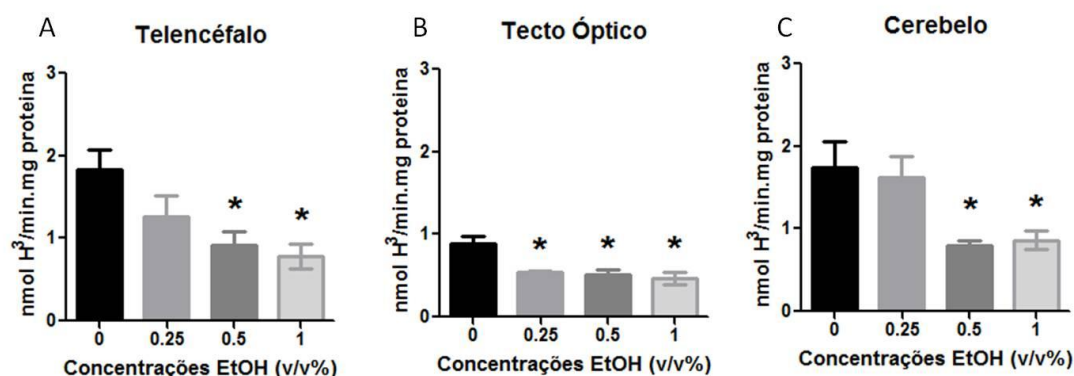


Figura 1. Captação de glutamato em estruturas cerebrais de *zebrafish*: telencéfalo (A), tecto óptico (B) e cerebelo (C). Os resultados estão expressos em nmol [³H]/min.mg proteína, com média e erro padrão da média, n=6 por grupo; * $p < 0,05$ – ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com ALD reduziu significativamente o conteúdo de [³H] intracelular em telencéfalo, tecto óptico e cerebelo, nas concentrações três concentrações testadas (**Figura 2 A, B e C**).

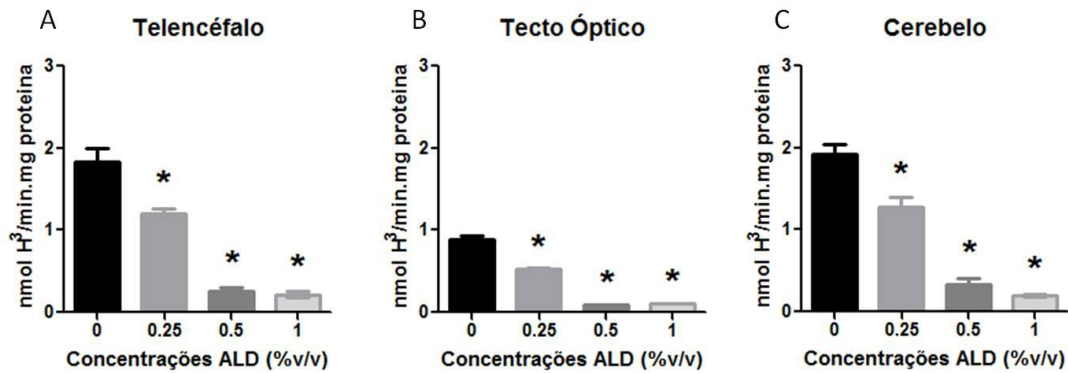


Figura 2. Captação de glutamato em estruturas cerebrais de *zebrafish*: telencéfalo (A), tecto óptico (B) e cerebelo (C). Os resultados estão expressos em nmol [^3H]/min.mg proteína, com média e erro padrão da média, n=6 por grupo; * $p < 0,05$ – ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

3.2 Atividade da LDH:

O tratamento com EtOH não apresentou diferenças significativas em nenhuma das concentrações testadas no telencéfalo (**Figura 3A**). No tecto óptico, a concentração de 1% de EtOH aumentou significativamente a atividade extracelular da LDH, sendo que esta diferença é observada em relação ao controle e em relação às demais concentrações testadas (**Figura 3B**). As três concentrações de EtOH promoveram um aumento significativo na atividade da enzima LDH em cerebelo (**Figura 3C**).

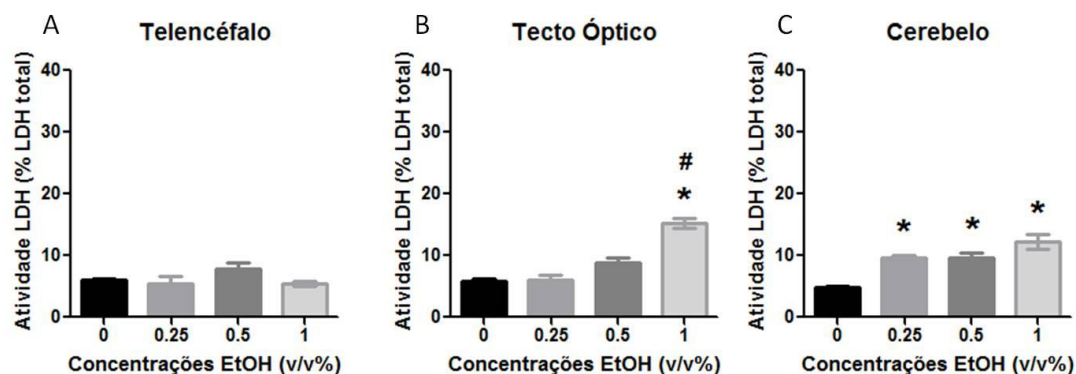


Figura 3. Atividade da enzima LDH extracelular em estruturas cerebrais de *zebrafish*: telencéfalo (A), tecto óptico (B) e cerebelo (C). Os resultados estão expressos em percentual (%) em relação a atividade de LDH total das estruturas, com média e erro padrão da média, n=6 por grupo; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com ALD – ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com ALD no telencéfalo nas concentrações de 0,5% e 1% aumentou significativamente a atividade da LDH extracelular quando comparados aos grupos controle e 0,25% (**Figura 4A**). No tecto óptico o tratamento com 1% de ALD aumentou significativamente a atividade da LDH, sendo que esta diferença é observada em relação ao controle e em relação às demais concentrações testadas (**Figura 4B**). O tratamento com ALD em cerebelo aumentou significativamente a atividade da enzima LDH nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1%, sendo que a concentração de 1% ainda difere das demais concentrações de ALD testadas (**Figura 4C**).

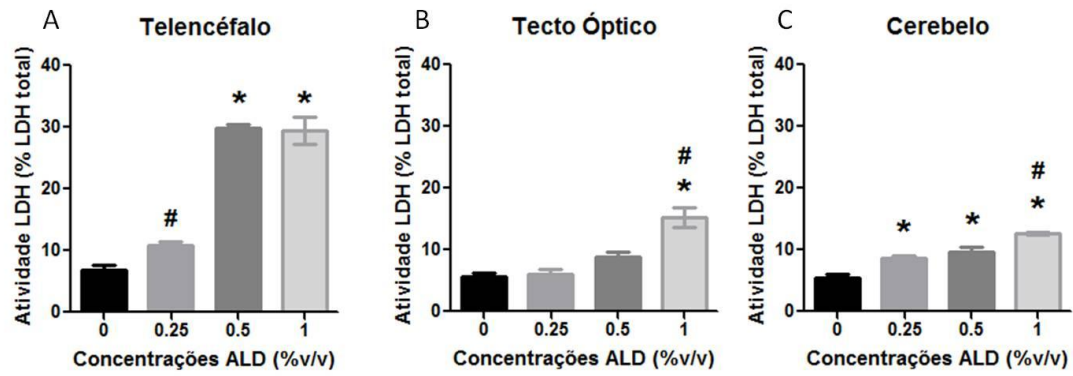


Figura 4. Atividade da enzima LDH extracelular em estruturas cerebrais de *zebrafish*: telencéfalo (A), tecto óptico (B) e cerebelo (C). Os resultados estão expressos em percentual (%) em relação ao conteúdo de LDH total das estruturas, com média e erro padrão da média, n=6 por grupo; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com ALD – ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4. DISCUSSÃO:

Estudos têm demonstrado que durante a abstinência e a adaptação do SNC ao consumo de bebidas alcoólicas, há um decréscimo da inibição central mediada pelo neurotransmissor GABA e aumento da excitação mediada por glutamato, dopamina e norepinefrina, além de outras modulações no equilíbrio GABA-glutamato (Diana et al., 2003; Esel, 2006; Nutt, 1999). Os resultados do presente trabalho demonstram que tanto o EtOH quanto o ALD são capazes de modular o transporte de glutamato dependente de sódio mediado pelos EAATs, evidenciando um potencial mecanismo de efeito do álcool e de seu metabólito sobre o sistema glutamatérgico. Sabe-se que a administração aguda de álcool inibe receptores NMDA, AMPA e kainato, enquanto a exposição prolongada reduz os níveis de glutamato no cérebro de humanos (Thoma et al., 2011). Além disso, a liberação de glutamato é capaz de modular a funcionalidade dos seus transportadores (Sattler and Rothstein, 2006). Pode-se, portanto, inferir que as concentrações de 0,5% e 1% de EtOH ou as três concentrações de ALD testadas *in vitro* seriam capazes de mimetizar a exposição prolongada ao etanol, reduzindo os níveis de glutamato liberado na fenda sináptica e por conseguinte, a sua captação. Interessantemente, o telencéfalo e o cerebelo parecem ser menos suscetíveis aos efeitos do EtOH quando comparados ao tecto óptico, como demonstra a Figura 1 .

Através de análise filogenética, já foi caracterizado que os genes EAATs expressos em *zebrafish* apresentam um elevado grau de homologia aos de

mamíferos, e que estes transportadores são funcionais, portanto capazes de realizar a captação de glutamato dependente de sódio. Além disso, tanto a expressão quanto a funcionalidade, variam de acordo com a região do cérebro que é estudada (sendo que este se divide em telencéfalo, tecto óptico e cerebelo) (Rico et al., 2010). Nossos resultados corroboram com estudo de Rico e colaboradores, tendo em vista os diferentes perfis apresentados por cada estrutura com relação aos tratamentos e aos níveis diferentes de glutamato captado por cada uma delas. McKewon e colaboradores demonstraram que a funcionalidade normal de transportadores de glutamato (principalmente EAAT2) em *zebrafish* é fundamental para a prevenção de eventos excitotóxicos de maneira similar ao que ocorre em roedores (McKeown et al., 2012), sendo que o EAAT2 é responsável por cerca de 90% da captação de glutamato e sua plena funcionalidade é fundamental para a manutenção do tônus fisiológico (Lehre et al., 1995). Deste modo, os resultados do tratamento com ALD podem revelar uma maior modulação sobre EAAT2 do que o tratamento com EtOH, tendo em vista a diminuição drástica da captação em todas as estruturas. Além disso, não é possível correlacionar a diminuição da captação de glutamato com o parâmetro de toxicidade avaliado neste estudo, pois os resultados de diminuição da captação não implicam necessariamente em aumento da atividade da LDH.

A literatura propõe que o metabolismo de EtOH para ALD é capaz de induzir estresse oxidativo através de excessiva produção de radicais livres e aldeídos de elevada reatividade (Henderson et al., 1999; Reynolds and Brien, 1995). Além disso, o álcool altera a fluidez de membranas biológicas, o aporte

de glicose e oxigênio para as células (Nevo and Hamon, 1995; Samson and Harris, 1992). Já foi demonstrado que a exposição aguda ao etanol tem a capacidade de aumentar a peroxidação lipídica medida através de TBARS em *zebrafish* (Rosemberg et al., 2010). Nossos resultados demonstraram um aumento da atividade da LDH no tratamento com EtOH e ALD. Somente o cerebelo foi sensível a todas as concentrações de EtOH testadas, enquanto o telencéfalo pareceu demonstrar maior estabilidade das membranas celulares diante do efeito do EtOH. O efeito do ALD sobre este parâmetro parece de maior importância, e talvez se correlacione com aumento de peroxidação lipídica e da produção de radicais livres, o que já foi demonstrado como um efeito da metabolização do álcool (Mayas et al., 2012; Reimers et al., 2004a; Wu and Cederbaum, 2003).

Miralles e colaboradores demonstraram que o transporte de glutamato dependente de sódio e a atividade da enzima LDH são afetados pelo estresse oxidativo causado pelos radicais livres em cultura de astrócitos (Miralles et al., 2001). Corroborando com estes achados, este trabalho demonstrou que em telencéfalo e cerebelo de *zebrafish* tratados com ALD, estes dois parâmetros podem se inter-relacionar. É sabido que os transportadores de glutamato são vulneráveis aos efeitos dos radicais livres. Em roedores, por exemplo, há uma inibição da captação de glutamato por peroxinitrito (Trotti et al., 1998; Trotti et al., 1996). Supondo que o tratamento do EtOH e do ALD neste estudo cause aumento dos radicais livres seguindo o raciocínio supracitado, a diminuição da captação observada poderia ser um efeito decorrente deste aumento,

demonstrando que o *zebrafish* é uma ferramenta apropriada para o estudo dos mecanismos de toxicidade do EtOH e de seu metabólito ALD.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, podemos concluir que tanto o EtOH, quanto o ALD exercem efeitos significativos no sistema glutamatérgico em SNC de *zebrafish in vitro*. Contudo, não é possível correlacionar este efeito com a alteração da permeabilidade de membrana, visto que foram observados resultados distintos nos parâmetros de captação de glutamato e atividade da LDH nas estruturas cerebrais analisadas. Desta forma, futuros estudos que visem avaliar os efeitos do EtOH e do ALD sobre outros parâmetros do sistema glutamatérgico bem como ao estresse oxidativo poderiam fornecer importantes informações a respeito dos mecanismos de neurotoxicidade promovidos por essas moléculas. Além disso, a padronização de diferentes protocolos experimentais de exposição ao EtOH ou ALD *in vivo* poderiam ser relevantes para uma melhor compreensão dos efeitos mediados pelo álcool na sinalização glutamatérgica, bem como sua implicação na funcionalidade das diferentes estruturas cerebrais do *zebrafish*.

REFERÊNCIAS

- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14.
- Blader, P., Strahle, U., 1998. Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 201, 185-201.
- Dahchour, A., Quertemont, E., De Witte, P., 1994. Acute ethanol increases taurine but neither glutamate nor GABA in the nucleus accumbens of male rats: a microdialysis study. *Alcohol Alcohol* 29, 485-487.
- Dahm, R., Geisler, R., 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY)* 8, 329-345.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- Dasmahapatra, A.K., Doucet, H.L., Bhattacharyya, C., Carvan, M.J., 3rd, 2001. Developmental expression of alcohol dehydrogenase (ADH3) in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* 286, 1082-1086.
- Diana, M., Brodie, M., Muntoni, A., Puddu, M.C., Pillolla, G., Steffensen, S., Spiga, S., Little, H.J., 2003. Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: basis for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 27, 354-361.
- Dlugos, C.A., Rabin, R.A., 2003. Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 471-480.
- Esel, E., 2006. [Neurobiology of alcohol withdrawal inhibitory and excitatory neurotransmitters]. *Turk Psikiyatri Derg* 17, 129-137.
- Fontella, F.U., Cimarosti, H., Crema, L.M., Thomazi, A.P., Leite, M.C., Salbego, C., Goncalves, C.A., Wofchuk, S., Dalmaç, C., Netto, C.A., 2005. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 65, 443-450.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 773-782.
- Gerlai, R., Lee, V., Blaser, R., 2006. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav* 85, 752-761.
- Gonzales, R., Bungay, P.M., Kilanmaa, K., Samson, H.H., Rosselti, Z.L., 1996. In vivo links between neurochemistry and behavioral effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 20, 203A-209A.
- Goodman, L.S., Brunton, L.L., Chabner, B., Knollmann, B.C., 2011. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 12th ed. McGraw-Hill, New York.

- Grunwald, D.J., Eisen, J.S., 2002. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3, 717-724.
- Henderson, G.I., Chen, J.J., Schenker, S., 1999. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front Biosci* 4, D541-550.
- Kanungo, J., Cuevas, E., Ali, S.F., Paule, M.G., 2011. Ketamine induces motor neuron toxicity and alters neurogenic and proneural gene expression in zebrafish. *J Appl Toxicol*.
- Koh, J.Y., Choi, D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 20, 83-90.
- Koh, J.Y., Cotman, C.W., 1992. Programmed cell death: its possible contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res* 587, 233-240.
- Lassen, N., Estey, T., Tanguay, R.L., Pappa, A., Reimers, M.J., Vasiliou, V., 2005. Molecular cloning, baculovirus expression, and tissue distribution of the zebrafish aldehyde dehydrogenase 2. *Drug Metab Dispos* 33, 649-656.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15, 1835-1853.
- Li, J., Zhang, J., 1997. Inhibition of apoptosis by ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons. *Chin Med J (Engl)* 110, 535-539.
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353-367.
- Mayas, M.D., Ramirez-Exposito, M.J., Garcia, M.J., Carrera, M.P., Martinez-Martos, J.M., 2012. Influence of chronic ethanol intake on mouse synaptosomal aspartyl aminopeptidase and aminopeptidase A: Relationship with oxidative stress indicators. *Alcohol*.
- McKeown, K.A., Moreno, R., Hall, V.L., Ribera, A.B., Downes, G.B., 2012. Disruption of *Eaat2b*, a glutamate transporter, results in abnormal motor behaviors in developing zebrafish. *Dev Biol* 362, 162-171.
- Miralles, V.J., Martinez-Lopez, I., Zaragoza, R., Borrás, E., Garcia, C., Pallardo, F.V., Vina, J.R., 2001. Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res* 922, 21-29.
- Moghaddam, B., Bolinao, M.L., 1994. Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 178, 99-102.
- Moonat, S., Starkman, B.G., Sakharkar, A., Pandey, S.C., 2010. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67, 73-88.
- Nevo, I., Hamon, M., 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 26, 305-336; discussion 337-342.

- Nutt, D., 1999. Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry* 175, 114-119.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.
- Reimers, M.J., Flockton, A.R., Tanguay, R.L., 2004a. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 26, 769-781.
- Reimers, M.J., Hahn, M.E., Tanguay, R.L., 2004b. Two zebrafish alcohol dehydrogenases share common ancestry with mammalian class I, II, IV, and V alcohol dehydrogenase genes but have distinct functional characteristics. *J Biol Chem* 279, 38303-38312.
- Reynolds, J.D., Brien, J.F., 1995. Ethanol neurobehavioural teratogenesis and the role of L-glutamate in the fetal hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 1209-1223.
- Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Bogo, M.R., 2010. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res Bull* 81, 517-523.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 174, 25-30.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Langoni Ada, S., Souto, A.A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Souza, D.O., 2011. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. *Neurotoxicology* 32, 871-878.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., de Bem Arizi, M., Dias, R.D., Souto, A.A., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2008. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem Int* 52, 290-296.
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C., Klamt, F., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171, 683-692.
- Samson, H.H., Harris, R.A., 1992. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13, 206-211.
- Sattler, R., Rothstein, J.D., 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*, 277-303.
- Thoma, R., Mullins, P., Ruhl, D., Monnig, M., Yeo, R.A., Caprihan, A., Bogenschutz, M., Lysne, P., Tonigan, S., Kalyanam, R., Gasparovic, C., 2011. Perturbation of the glutamate-glutamine system in alcohol dependence and remission. *Neuropsychopharmacology* 36, 1359-1365.
- Tiedeken, J.A., Ramsdell, J.S., Ramsdell, A.F., 2005. Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* 27, 711-717.

Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19, 328-334.

Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271, 5976-5979.

Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 27, 277-284.

ANEXO 1

Em anexo, as normas da revista a qual será submetido o trabalho desenvolvido neste manuscrito.