

## Exposição embrionária ao etanol diminui o padrão de transporte e ligação de glutamato em cérebro de peixe-zebra adulto

Alberto Martins Silva<sup>1</sup>, Diogo Losch de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neuroquímica Celular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

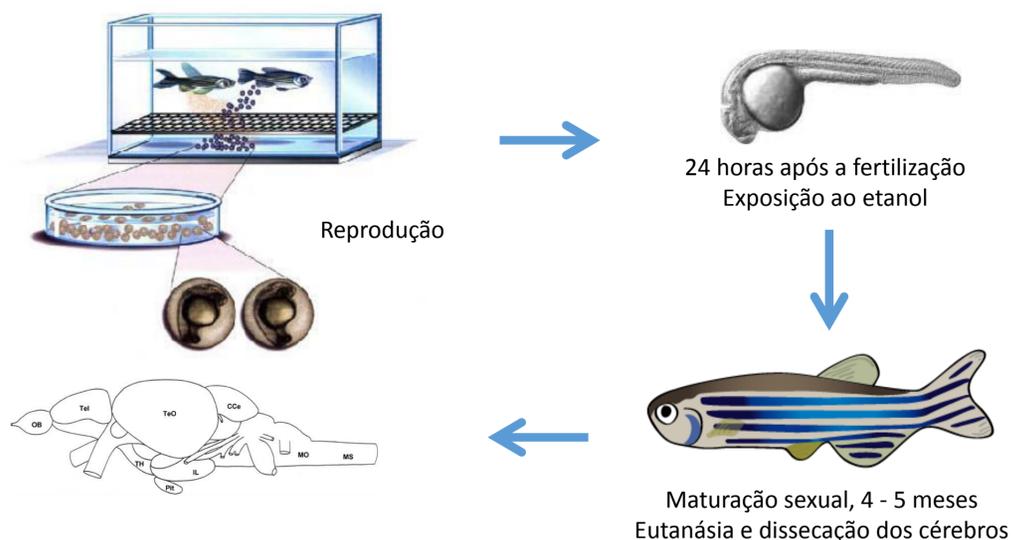
### INTRODUÇÃO

A ingestão de álcool por mulheres grávidas pode acarretar em alterações permanentes para o bebê, afetando o desenvolvimento cerebral e morfológico do feto e causando a Síndrome alcohólica fetal (SAF). A sigla FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*) abrange as formas mais brandas desta síndrome, bem como qualquer possível alteração, morfológica, fisiológica ou comportamental gerada pela exposição embrionária ao etanol. Estas formas intermediárias desta síndrome podem ser ainda mais prevalentes, resultando em problemas de aprendizagem, convívio social e comportamento, e sendo de difícil diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar as possíveis alterações neuroquímicas em peixe-zebra adulto após a exposição a diferentes concentrações de etanol na fase inicial do seu desenvolvimento, com foco no sistema glutamatérgico.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### EXPOSIÇÃO AO ETANOL

Utilizamos embriões de peixe-zebra (*Danio rerio* – *wild type*) com 24h pós-fertilização, expostos a diferentes concentrações de etanol: 0%, 0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% (durante duas horas). Acompanhamos o desenvolvimento dos animais até a fase adulta, por volta de 4 a 5 meses. Todas as análises foram realizadas com amostras de cérebro total de peixe-zebra adulto, que foram devidamente anestesiados e eutanasiados.



#### CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Realizada de acordo com Zenki et al., 2014, utilizamos o cérebro total dos animais, com incubação de 7 minutos em meio com glutamato radioativo [<sup>3</sup>H]. A captação dependente de Na<sup>+</sup> foi medida como a diferença de radioatividade incorporada entre o total de glutamato captado e o glutamato captado não dependente de Na<sup>+</sup>. Radioatividade medida com o uso de líquido de cintilação.

#### LIGAÇÃO DE GLUTAMATO

Foi utilizada uma fração enriquecida de membranas, obtidas dos cérebros totais dissecados (Bermejo et al., 2014). Com um gradiente de sacarose e múltiplas centrifugações, preparou-se membranas plasmáticas que são submetidas a um segundo protocolo para avaliação da atividade dos ligantes de glutamato, com glutamato radioativo [<sup>3</sup>H] (Soares et al., 2003).

#### TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

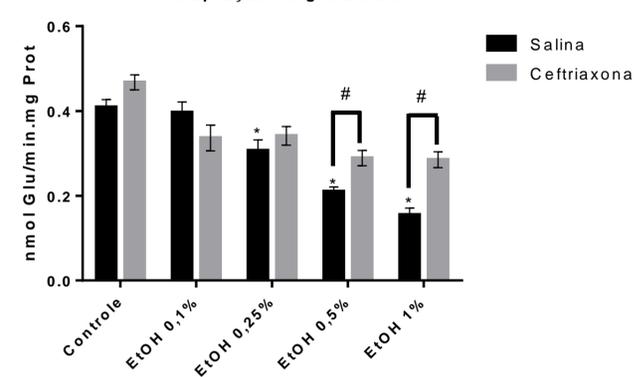
O antibiótico beta-lactâmico Ceftriaxona foi administrado, por via intraperitoneal, ao longo de 6 dias, na dose de 300 mg/kg (Rothstein et al., 2005; Miller et al., 2008). Na sequência, foram dissecados os cérebros para realização da captação de glutamato.

#### WESTERN BLOTTING

Os cérebros dissecados foram homogeneizados em pool de dois para a mensuração do conteúdo proteico do transportador vesicular de glutamato vGluT 2, com o protocolo de preparo de amostras e demais procedimentos adaptados de Pereira et al., 2014.

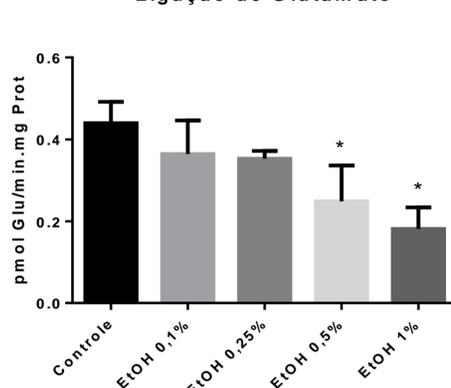
### RESULTADOS

Captação de glutamato



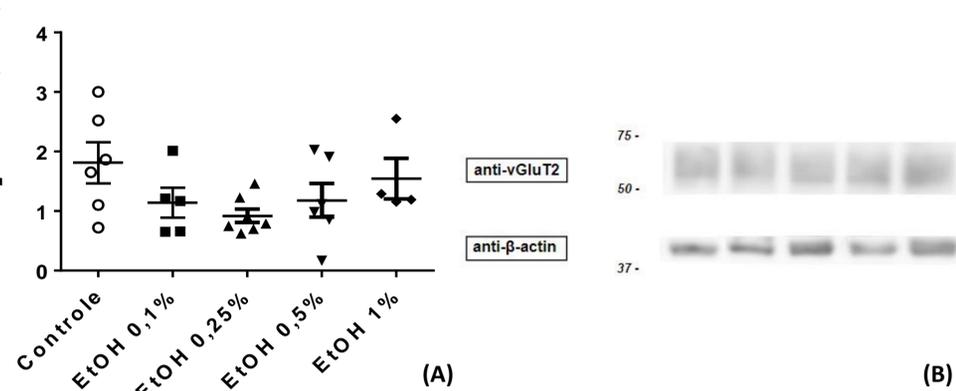
Efeito da exposição ao etanol na fase embrionária na captação de glutamato de cérebro total de peixes-zebra adultos, tratados previamente com Ceftriaxona 300mg/kg.

Ligação de Glutamato



Efeito da exposição ao etanol na fase embrionária na ligação de glutamato de fração enriquecida de membrana plasmática de cérebro de peixes-zebra adultos.

vGluT2/ $\beta$ -actin (U.A.)



Análise do imunoc conteúdo de amostras de cérebro total de vGluT2 por meio de Western Blotting.

Quantificação do raio de intensidade entre as bandas de vGluT2 e  $\beta$ -actina dos animais tratados com etanol na fase embrionária (A). bandas de Western Blotting representativas para cada grupo (B).

### CONCLUSÃO

Podemos concluir que o sistema de transporte de glutamato dos animais do modelo de FASD está fortemente comprometido, ao apresentar diminuição tanto na captação quanto na ligação deste neurotransmissor e que estes resultados podem ser modulados com o uso de tratamentos que alterem a expressão e funcionalidade de seus componentes.