

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE FARMÁCIA

Carolinne Sayury Wajima

Impactos da exposição *in vitro* ao etanol no hipocampo de ratos em desenvolvimento

Florianópolis

2019

Carolinne Sayury Wajima

Impactos da exposição *in vitro* ao etanol no hipocampo de ratos em desenvolvimento

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Coorientadora: Dr^a. Patricia Acordi Cesconetto.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wajima, Carolinne Sayury
Impactos da exposição "in vitro" ao etanol no hipocampo
de ratos em desenvolvimento / Carolinne Sayury Wajima ;
orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza,
coorientadora, Patricia Acordi Cesconetto, 2019.
61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Exposição ao etanol. 3. Hipocampo. 4.
Estresse oxidativo. 5. Neurotoxicidade. I. Zamoner Pacheco
de Souza, Ariane . II. Acordi Cesconetto, Patricia . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. IV. Título.

Carolinne Sayury Wajima

Impactos da exposição *in vitro* ao etanol no hipocampo de ratos em desenvolvimento

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 26 de novembro de 2019.

Prof^a Dr^a. Marení Rocha Farias
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Dirleise Colle
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Fabíola Branco Filippin Monteiro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais e amigos, que sempre estiveram aqui por mim.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a este momento e a esta possibilidade de concretizar mais um ciclo.

À minha orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza, pelo acolhimento desde o primeiro momento que estive no nosso Lab Cafofo, há dois anos atrás. Pela oportunidade, pelas conversas, pelas histórias, pelos ensinamentos e por ter me apresentado a ciência de forma leve e surpreendente. Por ter sido o exemplo de professora, orientadora, mãe e mulher na ciência.

À minha coorientadora Patricia Acordi Cesconetto, pela orientação, pela amizade, pelos passeios, pelas conversas, pelo tempo disponível em me passar todos os seus conhecimentos. Por ter sido o exemplo de determinação e amor à ciência, e a quem hoje desejo todo o sucesso que este mundo pode oferecer.

Meus sinceros agradecimentos aos meus queridos pais, Fernando e Auris, duas pessoas que, para mim, são uma só. Minha base, meu apoio, meu incentivo e todo o meu coração. Dedico a eles todas as minhas conquistas, meus obstáculos superados e meu amor pela sabedoria e pela ciência que descobri ao longo de todos estes anos. Agradeço por cada “Tenha um bom dia, filha!” pelas manhãs, pelo zelo, pela preocupação e toda a educação que me tornou a pessoa que sou hoje, e que me permitiu sonhar cada vez mais alto.

Ao meu irmão Leonardo, que me deseja o bem acima de qualquer situação.

Ao meu namorado e melhor amigo Gabriel, que esteve comigo em todos os meus momentos de fraqueza e vulnerabilidade. Agradeço por todo o amor, paciência e riso solto. Por ter me mostrado o que é amar de forma leve, por estar sempre presente e pelo cuidado.

A todos os meus mentores e amigos do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular - LaBioSignal, pelos experimentos, parcerias, conversas descontraídas e momentos de sabedoria. Em especial, às pessoas que me apoiaram e me incentivaram na reta final: Katiuska e Joseane, pela amizade e maturidade. Às demais colegas de laboratório Adny e Fabiana, que sempre se mostraram muito abertas a me ajudar. E aos colegas que já estão seguindo seus caminhos: Alessandra, Bene, Juliana e Vitória, que me incentivaram desde o início.

A todos os meus amigos do Curso de Farmácia, que passaram por esta jornada comigo.

Ao Programa Institucional de Iniciação Científica - PIBIC, pela oportunidade e incentivo financeiro.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”

- John Dewey

RESUMO

O uso nocivo de álcool é considerado um importante problema de saúde pública em todo o mundo. O consumo de álcool por mulheres grávidas é responsável por sérias consequências e alterações morfofisiológicas nos fetos. A exposição intrauterina ao etanol pode levar ao espectro mais grave de desordens alcólicas fetais, a Síndrome Alcólica Fetal (SAF), responsável por comprometimento no desenvolvimento, dimorfismo facial, bem como alterações comportamentais e cognitivas. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da exposição *in vitro* ao etanol sobre o metabolismo celular do hipocampo de ratos de 21 dias de idade. Fatias de hipocampo foram expostas ao etanol 200 mM para a avaliação dos seus efeitos no sistema glutamatérgico, no influxo de cálcio, na captação de glutamato, na captação de glicose, na atividade das enzimas glutamina sintetase (GS), lactato desidrogenase (LDH), gama-glutamil transferase (GGT), bem como da alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST, respectivamente). Também foram determinados o conteúdo de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Os resultados mostraram que a exposição ao etanol em hipocampus de ratos em desenvolvimento aumentou o influxo de cálcio, diminuiu a captação de glutamato e aumentou a atividade da GS. Também houve um aumento da atividade da ALT sem alteração na atividade da AST. A captação de glicose mostrou-se diminuída com aumento da atividade da LDH como um mecanismo compensatório. Além disso, em relação ao estresse oxidativo, observou-se diminuição do conteúdo de GSH, assim como na atividade da GGT, SOD, CAT e GPx, sem alteração na atividade da GR. Desse modo, os resultados obtidos sugerem alteração no funcionamento do sistema glutamatérgico, no metabolismo energético e na indução de estresse oxidativo. Novos estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos de toxicidade do etanol no intuito de propor estratégias de redução de danos causados pela exposição materna a essa substância.

Palavras chave: Síndrome alcólica fetal, estresse oxidativo, hipocampo, neurotoxicidade.

ABSTRACT

Harmful use of alcohol is considered a major public health problem worldwide. Alcohol consumption by pregnant women is responsible for serious consequences and morphophysiological changes in fetuses, which can include physical problems and problems with behavior and learning. Fetal alcohol spectrum disorders (FASDs) are a group of conditions that can be caused by intrauterine exposure to ethanol. Fetal Alcohol Syndrome (FAS) represents the most severe outcome from drinking alcohol during pregnancy. Children with FAS might have facial dysmorphism, growth problems, developmental impairment as well as well as behavioral and cognitive changes. The aim of the present study was to investigate the effects of *in vitro* exposure to ethanol on hippocampal slices from 21-day-old rats. Hippocampal slices were exposed to 200 mM ethanol for evaluation glutamatergic system, calcium influx, glutamate uptake, glucose uptake, as well as the enzymatic activity of glutamine synthetase (GS), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transferase (GGT), alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST, respectively). GSH levels and enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were also determined. Results showed that exposure to ethanol in developing rat hippocampus increased calcium influx, decreased glutamate uptake and increased GS activity. There was also an increase in ALT activity without change in AST activity. Glucose uptake was decreased with increased LDH activity as a compensatory mechanism. In addition, decreased GSH levels were accompanied by decreased activity of GGT, SOD, CAT and GPx, while GR activity was unaltered by ethanol exposure. Therefore, the results suggest that ethanol altered glutamatergic system, energy metabolism and lead to redox imbalance in hippocampal cells. Further studies are needed to better understand the mechanisms of ethanol toxicity in order to propose strategies to reduce damage caused by maternal exposure to this substance.

Key words: Fetal alcoholic syndrome, oxidative stress, hippocampus, neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo oxidativo do etanol no cérebro.....	17
Figura 2 - Características morfológicas da SAF.....	19
Figura 3 - Receptores glutamatérgicos no sistema nervoso central.....	22
Figura 4 - Esquema das defesas antioxidantes e a detoxificação de espécies reativas.....	24
Figura 5 - Efeito da exposição ao etanol na dose de 200 mM sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	35
Figura 6 - Consequências da exposição a 200 mM de etanol sobre a captação de [^{14}C]-glutamato em fatias de hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	36
Figura 7 - Efeito da exposição ao etanol sobre a atividade da glutamina sintetase no hipocampo da prole de 21 dias de idade.....	37
Figura 8 - Efeito da exposição a 200 mM de etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	37
Figura 9 - Efeito do etanol no acúmulo de [^{14}C]-2-desoxi-glicose em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	38
Figura 10 - Efeito do etanol na atividade da LDH em fatias de hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	39
Figura 11 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao etanol no conteúdo de GSH em hipocampo de ratos de 21 dias de idade.....	40
Figura 12 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao etanol na atividade da GR em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	40
Figura 13 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao etanol na atividade da GPx em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	41
Figura 14 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao etanol na atividade da SOD em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade.....	41

Figura 15 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao etanol na atividade da CAT em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade.....	42
Figura 16 - Efeito do etanol na dose de 200 mM na atividade da GGT em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.....	42
Figura 17 - Mecanismo de toxicidade do etanol sobre o hipocampo de ratos de 21 dias de idade após a exposição ao etanol em uma concentração de 200 mM.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -KG	Alfa-cetogluturato
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADH	Álcool desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AST	Aspartato aminotransferase
BHE	Barreira hematoencefálica
^{14}C -DG	^{14}C -2-desoxi-D-glicose
CAT	Catalase
CISA	Centro de Informações sobre Saúde e Álcool
CYP2E1	Citocromo P450 isoforma 2E1
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico (5,5'-Ditiobis(2-Ácido Nitrobenzoico))
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAE	Efeitos fetais do álcool
FASD	Transtornos do espectro alcóolico fetal
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamilttransferase
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
$\text{HO}_2\cdot$	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KA	Cainato
LDH	Lactato desidrogenase
NAD^+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP^+	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NMDA	N-metil-D-aspartato
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
SAF	Síndrome Alcoólica Fetal
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ácido tionitrobenzoico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	USO NOCIVO DO ETANOL	15
1.2	METABOLISMO E EFEITOS DO ETANOL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	16
1.3	USO DE ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO.....	17
1.4	O HIPOCAMPO.....	20
1.5	GLUTAMATO E AMINOTRANSFERASES.....	20
1.6	DESBALANÇO DO ESTADO REDOX	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	JUSTIFICATIVA	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAIS.....	28
4.2	ANIMAIS	28
4.3	TRATAMENTO COM ETANOL.....	28
4.4	CAPTAÇÃO DE [¹⁴ C]-GLUTAMATO.....	29
4.5	INFLUXO DE ⁴⁵ CA ²⁺	29
4.6	CAPTAÇÃO DE [¹⁴ C]-2-DESOXI-D-GLICOSE.....	30
4.7	CONTEÚDO DE GLUTATIONA - GSH.....	30
4.8	GLUTAMINA SINTETASE – GS.....	30
4.9	ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE – ALT E AST	31
4.10	ATIVIDADE DA γ -GLUTAMIL TRANSFERASE – GGT	31
4.11	ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE – LDH.....	32
4.12	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	32

4.12.1	Superóxido Dismutase – SOD.....	32
4.12.2	Catalase – CAT	33
4.12.3	Glutathione Peroxidase – GPx.....	33
4.12.4	Glutathione Redutase – GR.....	33
4.13	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	34
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5	RESULTADOS	35
5.1	INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	35
5.2	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM HIPOCAMPO DE FILHOTES EXPOSTOS A 200 mM DE ETANOL	36
5.3	EFEITOS DO ETANOL EM PARÂMETROS ENVOLVIDOS NO DESBALANÇO DO ESTADO REDOX EM HIPOCAMPO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	39
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO.....	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

O álcool é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo seu uso considerado um importante problema de saúde pública. De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS), 3 milhões de mortes por ano resultam do uso nocivo do álcool em todo o mundo, representando 5,3% de todas as mortes. Esse uso danoso é um fator causal para mais de 200 doenças e agravos à saúde, além de envolver uma série de transtornos psiquiátricos, comportamentais e de doenças não transmissíveis. Além dos danos à saúde, o uso nocivo de álcool provoca problemas sociais e perdas econômicas significativas para os indivíduos, para a sociedade e para o sistema de seguridade social.

1.1 uso nocivo do etanol

Encontrado em bebidas abundantemente consumidas pelo mundo, como em cervejas, vinhos e destilados, o álcool está presente em concentrações aproximadas de 5%, 12% e 40%, respectivamente. A molécula, quimicamente classificada como etanol, consiste em dois átomos de carbono e um grupamento hidroxila, propriedades que conferem à molécula uma característica hidrofílica-hidrofóbica que, junto ao baixo peso molecular, garante alta capacidade de distribuição e dispersão em vários tecidos e fluidos corporais, principalmente ao favorecer sua ação no sistema nervoso central (SNC) (COSTARDI et al., 2015; HECKMANN; SILVEIRA, 2009).

O consumo nocivo do etanol gera efeitos adversos sobre vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, pâncreas, coração, SNC e trato gastrointestinal (TGI) (KARINCH; MARTIN; VARY, 2008; YANG et al., 2008). O fígado foi considerado, por muito tempo, como o principal órgão afetado pelo uso do etanol. No entanto, muitas evidências sugerem que doenças hepáticas causadas pelo etanol são, na verdade, doenças sistêmicas (ROCCO et al., 2014). Além disso, esse consumo também tem sido associado a dano direto à mucosa do TGI ou prejuízos indiretos ao organismo devido a alterações na microbiota residente, acarretando em comprometimento ao sistema imune (RAJENDRAM; PREEDY, 2006). Estudos mostram que o consumo excessivo de etanol resulta em perda significativa de volume cerebral e comprometimento cognitivo, mas ainda não foi classificado como agente causal de doença neurodegenerativa (CREWS; NIXON, 2009; DE LA MONTE; KRIL, 2014; MARK MAYNARD, EMILY

BARTON, CALEB ROBINSON, JESSICA WOODEN, 2017; PFEFFERBAUM et al., 1992; SULLIVAN; ROSENBLOOM; PFEFFERBAUM, 2000).

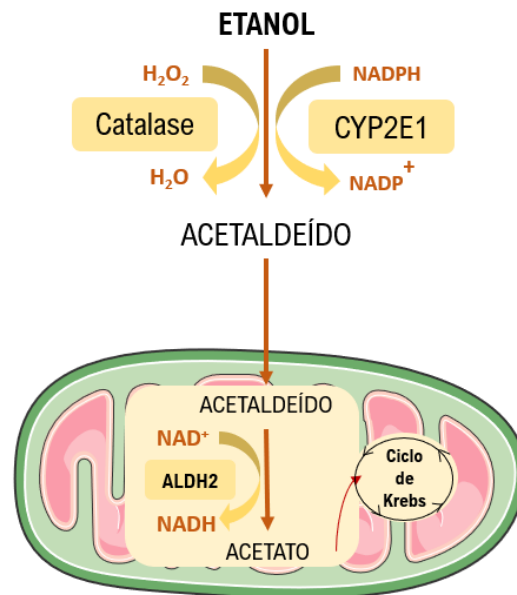
1.2 METABOLISMO e efeitos DO ETANOL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O etanol é uma substância psicotrópica depressora do SNC que promove alteração simultânea de inúmeras vias neuronais, gerando profundo impacto neurológico e traduzindo-se em diversas alterações biológicas e comportamentais. As dificuldades no armazenamento de informações, raciocínio lógico, falta de coordenação motora, além da estimulação do sistema de recompensa são algumas consequências que podem explicar o desenvolvimento da dependência química (COSTARDI et al., 2015). O seu caráter lipofílico o torna capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, causar alterações bioquímicas e comportamentais em diferentes áreas cerebrais.

Assim como outros álcoois, o etanol é sensível à oxidação química ou física. Assim, em mamíferos, a principal via de desintoxicação do etanol baseia-se na enzima álcool desidrogenase (ADH) e na acetaldeído desidrogenase (ALDH), que oxidam sequencialmente os álcoois à ácidos. No entanto, outras vias bioquímicas menos específicas podem desempenhar um papel no metabolismo (POHANKA, 2016). No cérebro, o etanol é predominantemente oxidado pela enzima catalase, localizada nos peroxissomos, com consumo concomitante de peróxido de hidrogênio citotóxico, levando à formação de acetaldeído. A catalase é induzida pelo etanol e responsável por aproximadamente 60% do metabolismo do etanol no cérebro. No entanto, é capaz de oxidar apenas uma pequena quantidade de etanol, cerca de 2% do total ingerido. O citocromo P450 isoforma 2E1 (CYP2E1) é a segunda mais importante enzima de degradação de etanol (ASPBERG; TOTTMAR, 1994; JULIENE; MCCLAIN, 2010; LEDESMA; BALIÑO; ARAGON, 2014; POHANKA, 2016)

Como primeiro produto da metabolização do etanol, o acetaldeído é prioritariamente metabolizado pela ALDH2, que também acopla a oxidação do acetaldeído com a redução de NAD^+ em NADH (Figura 1). O acetato, como o produto final, pode ser convertido em acetil-Coenzima A (acetil-CoA) pela atividade da acetil-CoA sintetase. O acetil-CoA gerado pode ser metabolizado no ciclo de Krebs, gerando CO_2 e água. Além disso, o acetil-CoA pode ser utilizado para gerar corpos cetônicos, aminoácidos, ácidos graxos e esteroides, como o colesterol (AGARWAL, 2001).

Figura 1 – Metabolismo oxidativo do etanol no cérebro.



Fonte: Autor, 2019.

1.3 USO DE ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou no ano de 2018 o relatório global sobre etanol e saúde, reunindo alguns dos mais atuais estudos frente ao uso de etanol por mulheres durante a gestação. Dentre eles, estima-se que a prevalência global de uso de etanol durante a gravidez na população em geral é de 9,8% (POPOVA et al., 2017). Nesse contexto, o relatório destaca que a prevalência de síndromes relacionadas ao consumo de etanol em recém-nascidos varia de acordo com cada região, uma vez que a região das Américas e a Europa apresentam-se como as de maior prevalência.

O consumo de etanol por mulheres durante a gravidez pode também ser considerado um importante problema de saúde pública. Em humanos, esse consumo resulta em malformações no desenvolvimento do SNC, com atraso na migração neuronal, anormalidades estruturais e funcionais no cérebro e até mesmo com ação indireta, ao prejudicar o transporte de nutrientes essenciais ao desenvolvimento fetal realizado pela placenta, com consequente favorecimento da má nutrição materna (GOODLETT; HORN, 2001).

Após o consumo de etanol pelas gestantes, a substância é capaz de atravessar facilmente a placenta e atingir o feto. Tal exposição pode causar diversas malformações e déficits ao longo da vida, que fazem parte dos tópicos que abrangem a Síndrome Alcólica Fetal (SAF), o

espectro mais grave de desordens alcóolicas fetais. Mesmo o consumo leve a moderado durante a gestação, a ingestão de etanol está associada a efeitos fetais danosos e é especialmente prejudicial se a ingestão ocorre durante o período crítico de formação de órgãos, principalmente da 1ª a 6ª semanas de gestação (BEAN, 2002). No entanto, a exposição ao etanol em qualquer período da gravidez pode causar efeitos deletérios especialmente no SNC, tendo como consequência a diminuição do crescimento cerebral, manifestado em sua forma mais expressiva pela microcefalia (MAY et al., 2008).

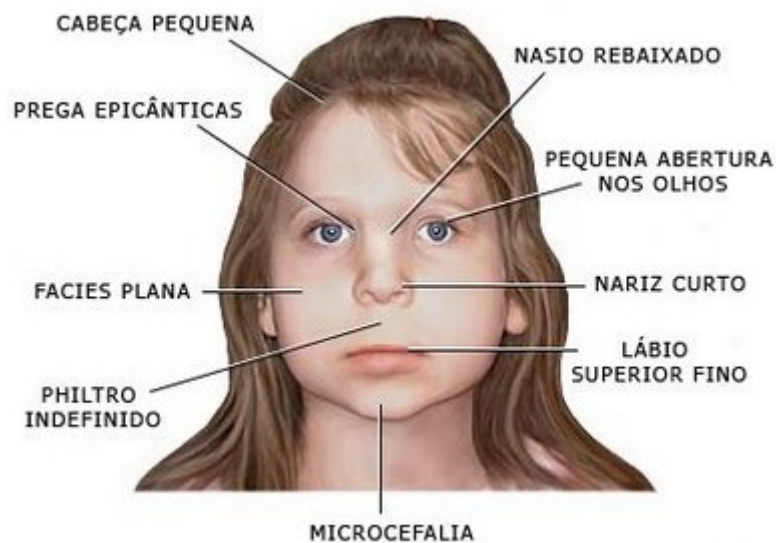
O consumo de bebidas alcóolicas durante a gestação pode afetar o feto, ocasionando distúrbios do desenvolvimento neurológico ou acometimento da SAF, a causa mais comum de retardo mental em todo o mundo (SAMPSON et al., 1994). Ainda, a SAF é uma das principais deficiências intelectuais, que é considerada evitável (SAMHSA, 2012). De acordo com Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2012), há uma estimativa de 40.000 recém-nascidos que nascem com a SAF anualmente nos Estados Unidos. Altas taxas de prevalência são relatadas em todo o mundo, incluindo a África do Sul (OMS, 2011), Austrália (FITZPATRICK et al., 2015) e América (BELL E CHIMATA, 2015). De acordo com o Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA, 2019), acredita-se que a prevalência média mundial se encontre entre 0,5 a 2 casos para 1000 nascidos vivos, superando índices de outros distúrbios do desenvolvimento como síndrome de Down e espinha bífida. Considerando tal prevalência, estima-se que podem surgir de 1500 a 3000 novos casos no Brasil anualmente. A alta taxa de ingestão de bebidas destiladas de baixo preço e alto teor alcoólico, como a aguardente de cana, principalmente nas classes sociais mais baixas, tornou-se um fator que contribui para uma expectativa de alta incidência de SAF no país. Devido à variabilidade do quadro clínico, a não obrigatoriedade de notificação, ao despreparo do profissional para investigar adequadamente e obter informações que confirmem a ingestão materna de álcool na gravidez (LOUREIRO et al., 1982), é levantada a hipótese de que a SAF seja subdiagnosticada no Brasil.

As concentrações de etanol que atingem o feto e encontram-se no líquido amniótico são equivalentes a quantidade no sangue da gestante em cerca de uma hora após a ingestão. Nesse caso, o feto fica exposto às mesmas concentrações de etanol observadas no sangue materno (BURD et al., 2007). Entretanto, a metabolização da substância no feto ocorre de maneira diferente. A placenta apresenta funcionalidade metabólica devido à sua expressão enzimática, particularmente no primeiro trimestre, em que o fígado está em desenvolvimento (MYLLYNEN; PASANEN; PELKONEN, 2005). Nesse contexto, a CYP2E1 placentária é a principal enzima responsável pelo metabolismo do etanol (CUMMINGS; KAVLOCK, 2004),

uma vez que apresenta maior afinidade pela molécula comparado à ADH (RASHEED; HINES; MCCARVER-MAY, 1997). Desse modo, o álcool tem um efeito prolongado no feto pelo seu acúmulo no líquido amniótico, além de concentração reduzida de enzimas metabolizadoras (níveis de CYP2E1 permanecem relativamente baixos durante a gravidez) e eliminação reduzida (GUPTA; GUPTA; SHIRASAKA, 2016).

Crianças com SAF podem apresentar em diferentes graus o retardo mental, baixo QI, comportamento inapropriado ou imaturo, falta de organização, dificuldade na leitura e memória, dificuldades motoras, na fala e na audição, déficit de atenção e hiperatividade. Além disso, apresentam aspectos faciais muito característicos que auxiliam no diagnóstico, incluindo hipoplasia do terço médio da face, fendas oculares curtas, olhos pequenos amplamente espaçados e epicanto interno, lábio superior fino, indistinto sulco entre o lábio superior e o filtro nasal longo e liso (Figura 2), além de restrição de crescimento (STOLER; HOLMES, 1999); (STREISSGUTH et al., 2003; BERTRAND et al., 2005).

Figura 2 – Características morfológicas da SAF.



Fonte: Adaptado de Clarke e Gibbard, 2003.

Modelos animais utilizados como estudo da síndrome mostram que os efeitos danosos causados pelo etanol envolvem vários mecanismos que levam a malformações anatômicas provenientes de apoptose de células progenitoras durante a exposição precoce, além de apoptose neuronal/gliial na diferenciação celular (LOTFULLINA; KHAZIPOV, 2018). Aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro, baixo peso ao nascer, anomalias de crescimento,

perímetro cefálico menor, a SAF e os efeitos fetais do álcool (FAE), ou transtornos do espectro alcohólico fetal (FASD), são alguns dos efeitos causados pela ingestão de álcool durante a gestação (RUSSELL; SKINNER, 1988).

1.4 O HIPOCAMPO

Nos seres humanos, o hipocampo é uma estrutura alongada, localizada em região profunda do lobo temporal medial. É a semelhança na sua dissecação com um cavalo-marinho que inspirou sua nomenclatura. Trata-se de uma estrutura composta por duas lâminas entrelaçadas: o giro denteado e as sub-regiões CA (*Cornu ammonis*), que são geralmente divididos nos quatro sub-regiões CA1, CA2, CA3 e CA4, divisão baseada na morfologia celular dos neurônios. O aspecto intraventricular do hipocampo é coberto por uma fina camada de substância branca chamada alvéolo, que contém fibras aferentes e eferentes da estrutura (TATU; VUILLIER, 2014). Em roedores, o hipocampo é uma estrutura relativamente grande, situada logo abaixo do neocórtex (KNIERIM, 2015).

Pertencendo ao sistema límbico, desempenha uma importante função na consolidação das informações da memória de curto prazo para a memória de longo prazo, além de estar relacionado com aprendizagem e orientação espacial (HOU; YANG; YUAN, 2013). Por isso, o hipocampo é talvez a região mais estudada em relação a alterações morfológicas de doenças que afetam o cérebro, como a doença de Alzheimer, doença vascular cerebral, epilepsia do lobo temporal, amnésia, esquizofrenia, transtornos depressivos e de ansiedade e até mesmo o envelhecimento. Tais doenças são baseadas em mudanças no metabolismo basal, principalmente na absorção de glicose e o consumo de oxigênio (SMALL et al., 2011).

Nesse cenário, o sistema glutamatérgico é responsável por participar de cerca de 80% a 90% das sinapses no hipocampo. Estudos demonstram que é o elevado aumento de expressão de receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato em CA1 diante de situações como a hipóxia e isquemia associada a doença vascular, que ajudam a explicar a sua vulnerabilidade e sua excitotoxicidade (DANBOLT, 2001; SMALL et al., 2011).

1.5 GLUTAMATO E AMINOTRANSFERASES

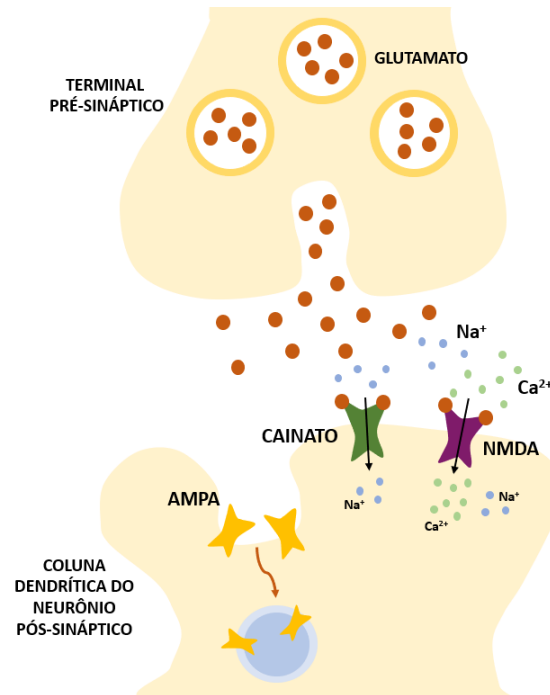
O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e suas ações estão relacionadas com os efeitos comportamentais de drogas psicoestimulantes em geral, que atuam

por interação com vários receptores de glutamato (MÁRQUEZ et al., 2017). Após sua liberação na fenda sináptica, o glutamato pode interagir com receptores ionotrópicos ou metabotrópicos e desencadear diversas funções, sendo o principal mediador da informação sensorial, coordenação motora, emoções e cognição, incluindo a formação e a recuperação da memória, bem como a formação de redes neurais durante o desenvolvimento (DANBOLT, 2001).

O etanol apresenta uma variedade de alvos moleculares, principalmente em canais iônicos na membrana de células e ativação de vias de sinalização intracelulares. Em consumo agudo, atua como um inibidor da função de todas as classes de receptores de glutamato ionotrópicos, conhecidos por comporem o mais abundante sistema de neurotransmissores excitatórios no cérebro de mamíferos. São representantes dessa classe os receptores NMDA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os receptores de cainato (KA) (Figura 3), que excitam rapidamente o neurônio durante a transmissão sináptica, enquanto os receptores de glutamato metabotrópicos acabam reduzindo a transmissão (MÖYKKYNEN; KORPI, 2012).

A atuação do etanol nos receptores NMDA (canal iônico não seletivo em fendas neurosinápticas) é intimamente envolvido na deficiência de memória, além de ocasionar disfunção cognitiva a longo prazo e incapacidade mental (CARLI; INVERNIZZI, 2014; MÖYKKYNEN; KORPI, 2012; POHANKA, 2016; ZORUMSKI; MENNERICK; IZUMI, 2013). Como já descrito por Cesconetto e colaboradores (2016), uma exposição crônica ao etanol durante a gravidez e lactação no hipocampo de ratos em desenvolvimento envolve o aumento de captação de glutamato em astrócitos e consequente diminuição do influxo de Ca^{2+} através de receptores NMDA, gerando assim um prejuízo nos processos de aprendizagem e memória, modulados classicamente pelo sistema glutamatérgico. Quando nos astrócitos, o glutamato pode seguir diversas vias, como conversão à glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS) antes de retornar para o neurônio pré-sináptico para ser transformado novamente em glutamato. No hipocampo de animais expostos ao etanol, já é descrito que a diminuição da atividade da GS indica um comprometimento no ciclo glutamato-glutamina (CESCONETTO et al., 2016).

Figura 3 – Receptores glutamatérgicos no Sistema Nervoso Central



Localização e função sináptica geral de receptores glutamatérgicos. Os receptores de glutamato ionotrópicos, NMDA, KA e AMPA, medeiam a transmissão rápida e estão associados a plasticidade neuronal.

Fonte: Autor, 2019.

É a partir da glicose plasmática que grande parte de glutamato do cérebro é sintetizado. Quando em astrócitos, a glicose é convertida em glicogênio através da reação catalisada pela glicogênio sintase ou mesmo em piruvato, que pode ser convertido a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) ou a acetilCoA e assim entrar no ciclo de Krebs (EID; COULTER, 2012; LOMAKO et al., 1993). Em seguida, o alfa-cetoglutarato (α -KG), intermediário do ciclo de Krebs, gera o glutamato via glutamato desidrogenase (GDH) (EID; COULTER, 2012).

A GDH e as aminotransferases, tais como AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), são capazes de catalisar a conversão reversível de glutamato ao α -KG por reações de transaminação. O glutamato também pode ser convertido em α -KG por desaminação oxidativa via glutamato desidrogenase, pelo uso de NAD^+ ou NADP^+ , contribuindo para a produção de energia celular (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006). Quando o glutamato é acumulado nos astrócitos, ocorre uma reação com piruvato para formar alanina pela ALT. Enquanto nos neurônios, a alanina poderá fornecer seu grupo amino ao α -KG, que é convertido em glutamato através da reação de transaminação (ARMANO et al., 2002). Esse mesmo grupo α -amino do glutamato também pode ser transferido ao oxaloacetato

produzindo α -KG e aspartato, em uma reação catalisada pela AST (LANOUE et al., 2001). Ainda, as espécies reativas de oxigênio geradas devido ao consumo do etanol podem ser o mecanismo subjacente que causa a liberação de ALT e AST séricos como uma resposta (LOOMBA; BETTENCOURT; BARRETT-CONNOR, 2009). Nesse contexto, já é descrito que a atividade da ALT, aumentada pelo etanol, pode catalisar reversivelmente a conversão de glutamato à α -KG, intermediário do Ciclo de Krebs (CESCONETTO et al., 2016).

1.6 desbalanço do estado redox

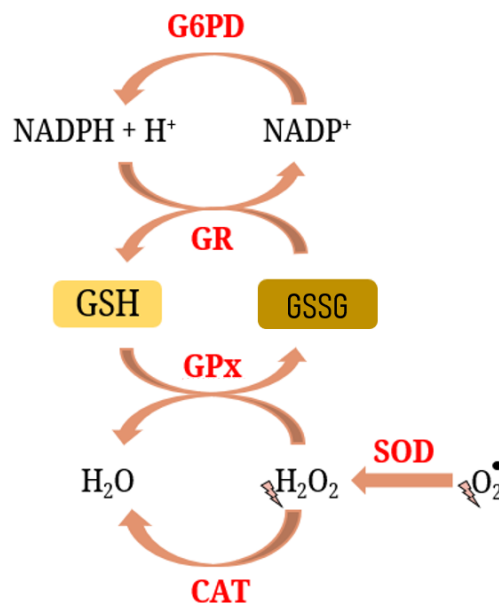
A fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias, é uma importante fonte de trifosfato de adenosina (ATP), principal nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas. Como subproduto, esse processo produz radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e radicais centrados em carbono e enxofre. Em quantidades moderadas ou baixas, as EROs são consideradas essenciais para o desenvolvimento e função neuronal, enquanto níveis excessivos podem causar prejuízos graves (PERO, R. W.; ROUSH, G. C.; MARKOWITZ, M. M.; MILLER, 1990; SALIM, 2017). O etanol pode aumentar a geração de EROs, agindo diretamente na respiração mitocondrial e levando à formação de radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}) e óxido nítrico (NO^{\cdot}), enquanto o seu metabolismo também pode gerar estresse oxidativo (PREEDY, 2019).

Consequentemente, o cérebro como um órgão rico em lipídeos, alta demanda energética e com defesas antioxidantes reduzidas, torna-se o alvo mais propício aos prejuízos causados pelo estresse oxidativo (HULBERT et al., 2007). No cérebro em desenvolvimento, um aumento na geração de EROs pode levar a danos celulares pelos radicais livres, que podem interagir com carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando um aumento na peroxidação lipídica ou em produtos proteicos carbonílicos, bem como mutações no DNA que, por sua vez, resultam em alterações na transcrição de genes, muitas vezes irreversíveis, com prejuízo da função celular (BROCARDI; GIL-MOHAPEL; CHRISTIE, 2011).

Dois tipos de mecanismos de proteção operam no cérebro para combater a ameaça representada pelas EROs: o sistema enzimático antioxidante e os antioxidantes de baixo peso molecular (KOHEN et al., 2000). O sistema de enzimas antioxidantes inclui a superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (GRIENGLING et al., 2000).

Cada uma das enzimas é importante para compor esse sistema de defesa. A SOD converte o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Já a GPx transfere dois elétrons da GSH para reduzir os peróxidos e a GR reduz a glutatona a partir de sua forma oxidada (dissulfeto de glutatona, GSSG) para sua forma reduzida (GSH). Essa reciclagem de GSH é fundamental no intuito de neutralizar mais espécies reativas. Por fim, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) regenera o NADPH, criando um ambiente redutor (Figura 4) (CAROCHO; FERREIRA, 2012; RATNAM et al., 2006).

Figura 4 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a detoxificação de espécies reativas



Antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR). Espécies reativas: radical ânion superóxido (O₂^{•-}).

Fonte: Autor, 2019.

A enzima γ -glutamil transferase (GGT) pode ser considerada um marcador sensível do uso de álcool, disfunção hepática e estresse oxidativo. Trata-se de uma enzima glicoproteica incorporada à superfície externa da membrana plasmática e atua como uma enzima passo limitante no metabolismo da glutatona (GSH), mantendo seus níveis intracelulares e, conseqüentemente, na regulação do estresse oxidativo (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; NIEMELÄ, 2016; WHITFIELD, 2001). Isso acontece pela participação na reciclagem de aminoácidos da glutatona e conjugados de glutatona secretados para o meio extracelular, catalisando a transferência da porção de γ -glutamil da glutatona, ou conjugados de glutatona,

para aceptores tais como aminoácidos e dipeptídeos. Esses aminoácidos são reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese *de novo* de GSH. A GGT também é responsável pela degradação da glutatona, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese *de novo* de GSH (MAREŠ et al., 2005).

A GSH tem o papel de principal antioxidante não enzimático abundantemente encontrada no citosol, núcleo e mitocôndrias. Dentre as suas funções, inclui-se a participação no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, bem como detoxificação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos lipídicos através da ação catalítica da GPx (VALKO et al., 2006). Sendo assim, o desbalanço do estado redox, a modulação do sistema glutamatérgico e do metabolismo energético podem ser alvos da toxicidade do etanol em outros tecidos de animais expostos a esta substância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição *in vitro* ao etanol sobre o metabolismo e o estado redox em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do etanol na captação de [¹⁴C]-glutamato, no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ e no influxo de [¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose em fatias de hipocampo de ratos em desenvolvimento;
- Investigar as consequências da exposição *in vitro* ao etanol na atividade das enzimas GS, ALT, AST, LDH e GGT em fatias de hipocampo de ratos;
- Verificar o efeito do etanol no conteúdo de GSH em fatias de hipocampo de ratos;
- Estudar os efeitos do etanol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR nas fatias de hipocampo dos ratos.

3 JUSTIFICATIVA

O consumo de bebidas alcóolicas é comum na grande maioria das sociedades, desde o início da História da humanidade. Por seus efeitos como a euforia e a desinibição em um primeiro momento, o etanol está presente em diferentes momentos de celebração e festividades em que o uso excessivo e banalizado se tornou recorrente, reflexo de uma sociedade que pouco tem ciência dos reais impactos e prejuízos, muitas vezes irreversíveis, causados por essa substância no organismo humano.

O uso de álcool durante a gestação é um assunto controverso. Os costumes globais comuns associados às mídias sociais acabam sendo estímulos eficazes no aumento de consumo desse tipo de substância em diversas situações, contribuindo para uma sociedade que pouco se preocupa com os riscos que está envolvida. Transtornos de hiperatividade, déficits de atenção, retardo mental ou até mesmo a morte fetal são cenários recorrentes do uso indiscriminado, dependentes da quantidade ingerida e o período gestacional.

Com o intuito de promover a saúde da população, prevenir contra prejuízos neurais causados pela exposição fetal ao etanol e auxiliar na recuperação de casos prevalentes, torna-se necessário esclarecer os mecanismos neurotóxicos envolvidos no consumo de etanol durante os períodos críticos do desenvolvimento. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para a elaboração de estratégias específicas na prevenção e conscientização da população em geral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O etanol absoluto foi obtido da marca Neon Comercial Ltda (Suzano, SP, Brasil). Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico provenientes de empresas nacionais e internacionais (Merck[®], Vetec[®] e Reagen[®]). As soluções reagentes, assim como os meios, foram preparadas utilizando balança analítica marca Ohaus[®] modelo AR2140 e pHmetro marca Digimed[®], modelo DM20. Para as avaliações bioquímicas, o leitor de placas Multileitora Infinite M200 TECAN[®] do Laboratório Multiusuário do Centro de Ciências Biológicas (LAMEB/CCB/UFSC) foi utilizado.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC, os quais foram mantidos em gaiolas com controle do ciclo claro/escuro 12/12h a 21°C, com água e ração *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do CONCEA, em protocolo submetido ao Comitê de Ética no uso de animais da UFSC (CEUA/UFSC/PP00854). Ao completarem 21 dias de idade, os filhotes foram eutanasiados por decapitação.

4.3 TRATAMENTO COM ETANOL

Para os experimentos *in vitro*, 20 fatias de hipocampo de ratos com 21 dias de idade foram randomizadas em dois grupos: controles e tratados. Todas as fatias foram pré-incubadas com solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄) por 15 minutos a 37°C, para estabilização do tecido. Em seguida, o grupo de fatias destinado ao tratamento foi incubado por um tempo de 60 minutos com 200 mM de etanol diluído em HBSS (concentração padronizada em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório LaBioSignal através da realização de uma curva de concentração, em que foram observados efeitos mais significativos no influxo de cálcio em hipocampo de ratos com essa concentração). Posteriormente, as fatias de hipocampo

submetidas ao HBSS (grupo controle) e ao HBSS+etanol (grupo tratado) foram utilizadas para execução de reações de influxo e captação ou armazenadas em tampões específicos para análises posteriores.

4.4 CAPTAÇÃO DE [¹⁴C]-GLUTAMATO

Para a captação de glutamato, as fatias do hipocampo previamente imersas em HBSS ou em HBSS+etanol tiveram o seu meio trocado pela adição de 0,2 µCi [¹⁴C]-glutamato (meio de captação), por 10 minutos. Essa incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e seguida de lavagem com 200 µL de HBSS gelado duas vezes. Para solubilização das fatias, foram adicionados aos poços 300 µL de solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01%. Alíquotas de 100 µL desse homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, realizada em espectrômetro de cintilação líquida, que permite determinar o conteúdo intracelular de glutamato. A captação de glutamato é corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para dosagem de proteínas. Os resultados são expressos como nmol [¹⁴C]-glutamato/µg proteína/min (ZAMONER et al., 2007).

4.5 INFLUXO DE ⁴⁵Ca²⁺

Para o influxo de ⁴⁵Ca²⁺, as fatias de hipocampo previamente imersas em HBSS ou em HBSS+etanol tiveram o seu meio trocado por HBSS fresco com 0,1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ e o tecido incubado durante 5, 15, 30 ou 60 minutos. Posteriormente, o ⁴⁵Ca²⁺ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl₃ 10 mM, pH 7,0) interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 10 minutos, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 300 µL de NaOH 0,5M foram adicionados a cada poço. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para dosagem de proteína. A determinação foi realizada conforme descrito no item 4.4, por cintilação líquida. Os resultados são expressos como pmol ⁴⁵Ca²⁺/µg de proteína (ZAMONER et al., 2007).

4.6 CAPTAÇÃO DE [¹⁴C]-2-DESOXI-D-GLICOSE

Para a captação de [¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose, as fatias do hipocampo previamente imersas em HBSS ou em HBSS+etanol foram incubadas com HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e [¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose 0,2 µCi/mL por 30 e 60 minutos. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado e o tecido lavado três vezes com HBSS fresco, e lisado em solução NaOH 0,5 M. A determinação foi realizada conforme descrito no item 4.4, por cintilação líquida, e uma alíquota de 5 µL será usada para a dosagem de proteínas. Os resultados são expressos como pmol [¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose/mL/mg proteína (ZAMONER et al., 2007)

4.7 CONTEÚDO DE GLUTATIONA - GSH

Para determinar o conteúdo de GSH, as fatias de hipocampo dos grupos controle e tratado foram homogeneizados em solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 (m/v). A determinação foi realizada com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. Os níveis de glutathiona foram determinados segundo o método descrito por Beutler et al. (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis ácido 2-nitrobenzóico) formando o ânion conjugado TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 µL da amostra é colocada no poço de microplaca junto a 950 µL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 µL de DTNB 2,5 mM. Após cerca de dois minutos é obtida a máxima formação de TNB, medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em µmol.g⁻¹/proteína.

4.8 GLUTAMINA SINTETASE – GS

As fatias de hipocampo dos grupos controle e tratamento foram homogeneizadas em 150 µL de tampão de lise (imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. Em uma microplaca, 50 µL desse sobrenadante é adicionado em 100 µL de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl₂ 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C, a

reação foi interrompida por adição de 200 μL de uma mistura contendo FeCl_3 3,7 mM, TCA 1,2 M, HCl 10 M e água. O produto da reação γ -glutamilhidroxamato foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática é expressa como mM hidroxamato/mg proteína (SHAPIRO; STADTMAN, 1970).

4.9 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE – ALT E AST

As fatias de hipocampo dos grupos controle e tratamento foram homogeneizadas em 300 μL de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 e a concentração de proteínas determinada previamente. As atividades das enzimas ALT e AST foram mensuradas através de reações colorimétricas. Na reação, a ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μg proteína.

4.10 ATIVIDADE DA γ -GLUTAMIL TRANSFERASE – GGT

As fatias de hipocampo dos grupos controle e tratamento foram homogeneizadas em 300 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. A atividade enzimática da GGT foi realizada através da seguinte reação (cinético e colorimétrico): A GGT catalisa a transferência do grupamento glutamil da γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida (substrato) para a glicilglicina (aceptor), formando γ -glutamil-glicilglicina e 3-carboxi-4-nitroanilina. A concentração da enzima é determinada pela razão de formação de 3-carboxi-4-nitroanilina. Os resultados da atividade da GGT foram expressos como U/L/ μg proteína.

4.11 ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE – LDH

As fatias de hipocampo dos grupos controle e tratamento foram homogeneizadas em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática da LDH foi determinada através de uma mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopiridino nucleótido (NAD^+), fenazina metosulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, utilizando a reação de lactato à piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática. Os resultados foram expressos como % do controle. Método realizado por kit comercial Dolles[®], seguindo as instruções do fabricante.

4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx e GR as fatias de hipocampo dos grupos controle e as submetidas ao tratamento foram homogeneizadas com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 m/v). Uma alíquota de 5 μL foi separada para a determinação de proteínas. As determinações enzimáticas foram realizadas com a utilização do sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 minutos).

4.12.1 Superóxido Dismutase – SOD

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich, (1972), modificado por Puntarulo e colaboradores, (1991), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Em uma microplaca de 96 poços foi feita uma curva de diferentes concentrações de amostras (5,10, 15, 20, 40 μL) com a adição de glicina 50 mM, pH 10,2. Além disso, foram adicionados 5 μL de adrenalina 60 mM no momento da leitura. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da enzima foram expressos em termos de atividade da enzima, em que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade da velocidade de formação do adrenocromo.

4.12.2 Catalase – CAT

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Packer e Glazer, (1990) baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Foram adicionados 2 μL dessa solução na placa de 96 poços, com acréscimo de 20 μL da amostra. Em seguida realizou-se a leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 5 minutos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}/\text{proteína}$.

4.12.3 Glutathione Peroxidase – GPx

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, baseado na redução de tertbutilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e com conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 5 μL de t-BuOOH e 5 μL de amostra em 200 μL de um meio de reação na placa de 96 poços. Os valores serão expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}/\text{proteína}$.

4.12.4 Glutathione Redutase – GR

A GR foi determinada pelo método de Carlberg e Mannervik (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0/8,6 mg de NADPH/30,6 mg de glutathione oxidada/DPTA 5 mM é adicionado na placa de 96 poços (200 μL), e a adição de 5 μL de amostra deu início à reação, monitorada durante 3 minutos gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}/\text{proteína}$.

4.13 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi avaliada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma[®]) é utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 4 experimentos independentes, conforme número de amostras. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário, utilizando-se o Software GraphPad Prism 6.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

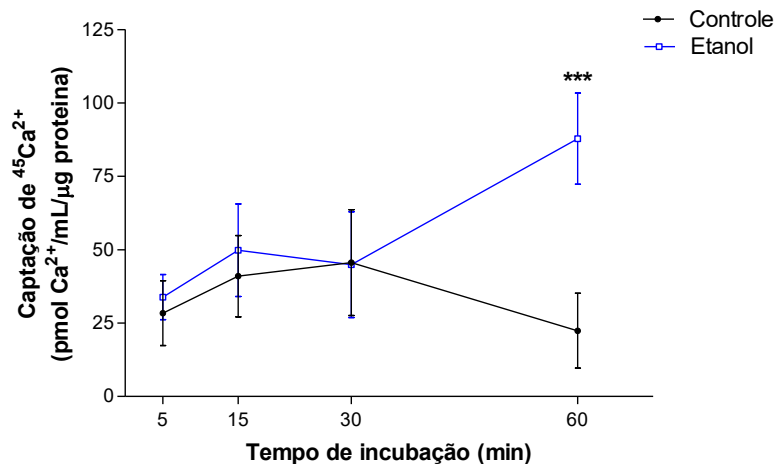
5 RESULTADOS

Este trabalho utilizou um modelo experimental de exposição *in vitro* ao álcool na concentração de 200 mM com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas induzidas no hipocampo de ratos aos 21 dias de idade. Foram determinadas a captação de [^{14}C]-glutamato, o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, a captação de [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose (2-DG), o conteúdo de GSH, a atividade das enzimas GS, GGT, AST, ALT, LDH, bem como a atividade das enzimas antioxidantes.

5.1 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Para investigar os efeitos da exposição ao etanol sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fatias de hipocampo foram incubadas com álcool (200 mM) e $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 5, 15, 30 ou 60 min. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol induz o aumento no influxo e acúmulo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após 60 minutos de incubação com o radioisótopo (Figura 5).

Figura 5 – Efeito da exposição ao etanol sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fatias de hipocampus de ratos de 21 dias de idade.



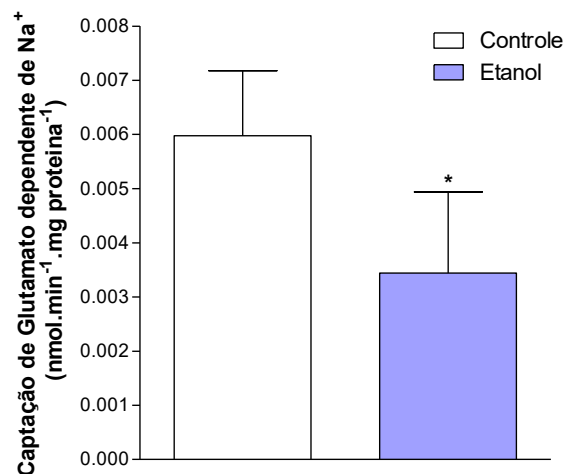
Fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 minutos. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais e expressos em $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$ de proteína. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer: $*p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: Autor, 2019.

5.2 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM HIPOCAMPO DE FILHOTES EXPOSTOS A 200 mM DE ETANOL

No intuito de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pelo etanol sobre o hipocampo de ratos imaturos, foram realizados ensaios de captação de [^{14}C]-glutamato e atividade da GS. Os resultados mostraram que a exposição *in vitro* ao etanol foi capaz de diminuir a captação de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ em fatias de hipocampo dos filhotes de 21 dias de idade (Figura 6).

Figura 6 – Efeito da exposição ao etanol sobre a captação de [^{14}C]-glutamato em fatias de hipocampus de ratos de 21 dias de idade.

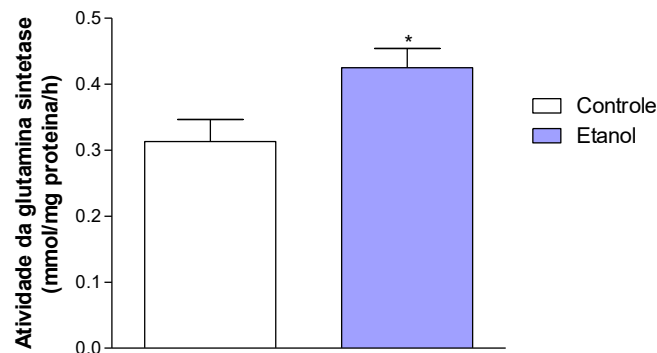


Fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 min e a captação foi iniciada com a adição de 0,33 μCi [^{14}C]-glutamato ao meio de incubação (10 min), corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

Fonte: Autor, 2019.

A diminuição da captação do neurotransmissor excitatório glutamato sugere aumento de suas concentrações na fenda sináptica, o que pode acarretar no fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, uma estimulação excessiva dos seus receptores. Sendo assim, investigou-se a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do glutamato, como a GS, que tem como função a amidação de glutamato a glutamina, processo fundamental para o ciclo glutamato-glutamina. Os resultados demonstraram aumento significativo na atividade da GS (Figura 7).

Figura 7 – Efeito da exposição ao etanol sobre a atividade da glutamina sintetase em fatias de hipocampo da prole de 21 dias de idade.

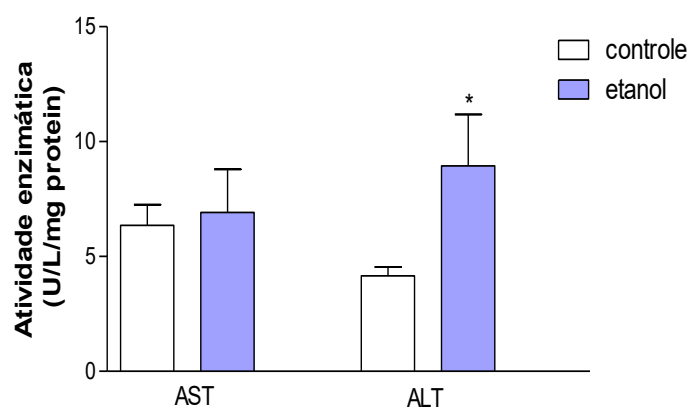


Fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 min. Após a incubação as fatias foram processadas para a determinação da atividade da GS conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

Fonte: Autor, 2019.

A atividade das aminotransferases ALT e AST foi determinada no intuito de verificar as consequências da exposição ao etanol sobre as reações de transaminação do glutamato no hipocampo de ratos imaturos. Os resultados mostraram que o etanol induz aumento na atividade da ALT, sem alterar a atividade da AST, em hipocampo de ratos imaturos (Figura 8).

Figura 8 – Efeito da exposição ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT em fatias de hipocampus de ratos de 21 dias de idade.



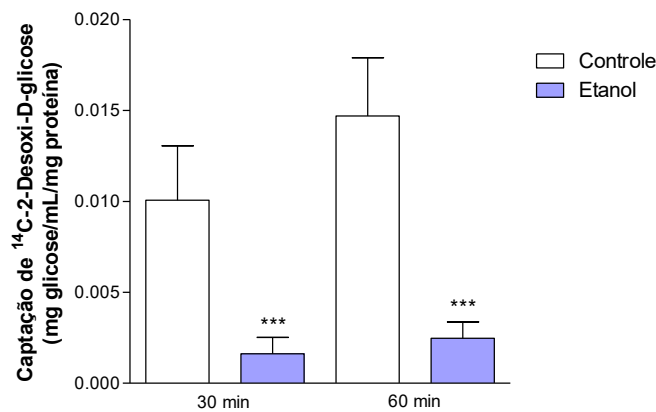
A atividade das aminotransferases AST e ALT foi mensurada no homogeneizado de hipocampo dos ratos de 21 dias de idade expostos a 200 mM de etanol. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student:

* $p < 0,05$.

Fonte: Autor, 2019.

A glicose já é bem estudada como substrato energético, atuando como precursora de moléculas como lactato, oxaloacetato, glicogênio e alanina, contribuindo para a função normal do cérebro. Assim, analisamos o envolvimento de possíveis alterações na captação e acúmulo de glicose no efeito causado pelo álcool em fatias de hipocampo de filhotes de 21 dias expostos a uma concentração de 200 mM. Os resultados mostraram que o álcool diminui a entrada e acúmulo de [^{14}C]-2-DG em hipocampo de ratos de 21 dias de idade após 30 e 60 minutos de incubação com a mesma (Figura 9), corroborando dados prévios do grupo que demonstraram que a exposição *in vivo* ao etanol também compromete a entrada de glicose em células hipocampais (CESCONETTO et. al., 2016).

Figura 9 – Efeito do etanol no acúmulo de [^{14}C]-2-desoxi-glicose em hipocampus de ratos de 21 dias de idade.



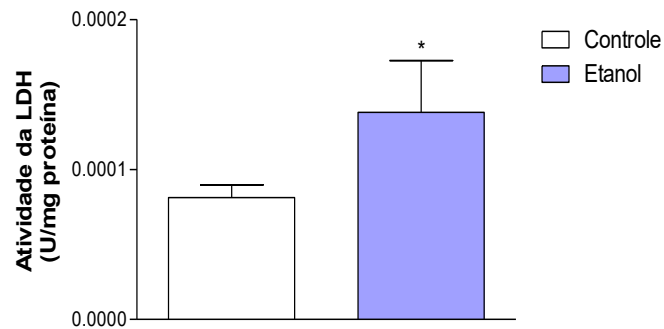
Fatias de hipocampo foram incubadas com 200 mM de etanol e 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C]-2-DG durante 30 min e 60 minutos. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle (8 animais), foram determinadas através do teste “t” de Student: * $p < 0,05$.

Fonte: Autor, 2019.

A captação e o metabolismo do glutamato são fundamentais para controlar as concentrações do mesmo na fenda sináptica e suas funções. Uma vez na fenda sináptica, o glutamato pode ser captado pelas células gliais e posteriormente metabolizado a glutamina ou a α -KG, o qual poderá ser oxidado no Ciclo de Krebs. Em última instância, o glutamato poderá ainda resultar na formação de lactato, o qual também pode contribuir para o metabolismo energético cerebral. A atividade da LDH foi determinada com o intuito de avaliar o papel desta enzima na toxicidade induzida pelo etanol no hipocampo de ratos imaturos, salientando-se que a sua função principal envolve a conversão de piruvato a lactato em células gliais. Os resultados

mostraram que o etanol aumentou a atividade da LDH, o que pode estar relacionado com alterações no metabolismo energético do hipocampo. Esse efeito pode ser uma resposta à diminuição no influxo de glicose, como um mecanismo compensatório (Figura 10).

Figura 10 – Efeito do etanol na atividade da LDH em fatias de hipocampus de ratos de 21 dias de idade.



A atividade da LDH foi mensurada no homogeneizado de hipocampo de ratos 21 dias de idade expostos a 200 mM de etanol durante 60 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativa determinadas pelo teste “t” de Student: * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

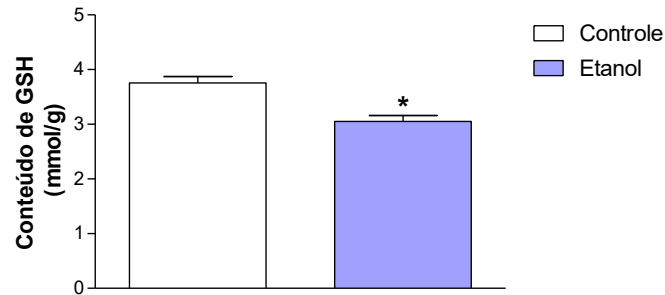
Fonte: Autor, 2019.

5.3 EFEITOS DO ETANOL EM PARÂMETROS ENVOLVIDOS NO DESBALANÇO DO ESTADO REDOX EM HIPOCAMPO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

Com o objetivo de investigar a indução de estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos pelo etanol, avaliaram-se os efeitos do álcool na modulação dos sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os resultados mostraram que a exposição ao etanol levou à diminuição do conteúdo de GSH (Figura 11), sugerindo depleção do mais importante sistema de defesa antioxidante do cérebro.

Considerando-se que o “turnover” da GSH é dependente da atividade da GPx e da GR, analisou-se o efeito da exposição *in vitro* ao etanol (200 mM) na atividade dessas enzimas. Os resultados mostraram que a exposição ao etanol não altera a atividade da GR no hipocampo dos filhotes de 21 dias de idade (Figura 12). No entanto, é visto que a exposição diminuiu a atividade da GPx no tecido em análise (Figura 13).

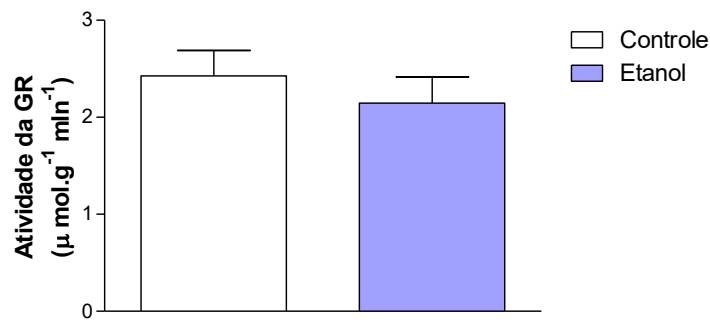
Figura 11 – Efeito da exposição *in vitro* ao etanol no conteúdo de GSH em hipocampo de ratos de 21 dias de idade.



Fatias de hipocampo ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 min, seguidas por precipitação em TCA 12%, homogeneizadas e centrifugadas. Aliquotas de extrato ácido foram transferidas para uma cubeta (50 μ L) seguida da adição de 100 μ L uma solução contendo DTNB (2,5 M), após 2 min ocorreu a formação do TNB. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student.

Fonte: Autor, 2019.

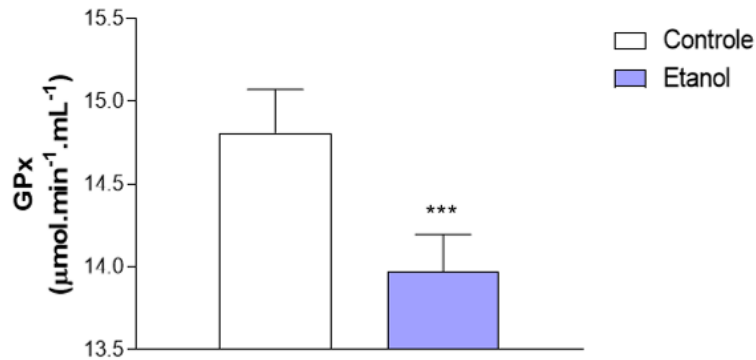
Figura 12 – Efeito da exposição *in vitro* ao etanol na atividade da GR em hipocampos de ratos de 21 dias de idade.



Fatias de hipocampos foram incubadas na presença ou ausência de 200 mM de etanol por 60 minutos. A atividade da GR foi avaliada através da determinação da taxa de oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Fonte: Autor, 2019.

Figura 13 – Efeito da exposição *in vitro* ao etanol na atividade da GPx em hipocampos de ratos de 21 dias de idade

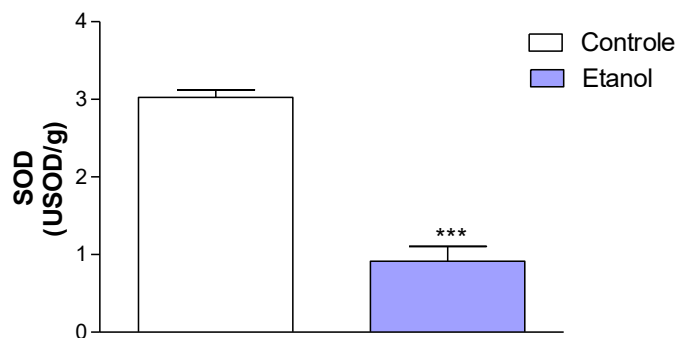


Fatias de hipocampo ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 min. A atividade da GPx foi avaliada através da determinação da velocidade de decomposição do NADPH, que é proporcional à velocidade da produção da GSSG. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student.

Fonte: Autor, 2019.

Corroborando com os efeitos do etanol sobre as defesas antioxidantes, os resultados também mostraram que a exposição a 200 mM de etanol causa a diminuição na atividade da SOD (Figura 14), a qual está associada a diminuição na atividade da CAT (Figura 15).

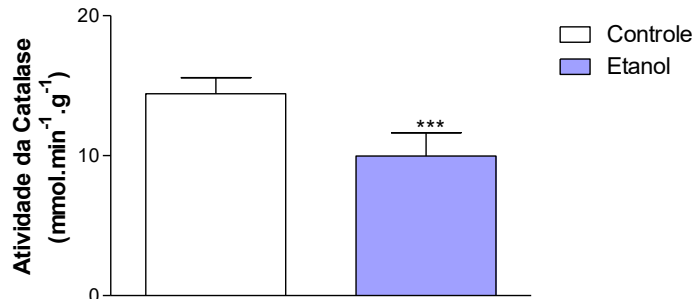
Figura 14 – Efeito da exposição *in vitro* ao etanol na atividade da SOD em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade



Fatias de hipocampo ratos de 21 dias de idade foram expostas a 200 mM de etanol por 60 min. As fatias foram homogeneizadas e incubadas com glicina 50 mM e adrenalina 60 mM. Os resultados foram reportados como a média ± E.P.M de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas através do teste “t” de Student: ***p < 0,001, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Autor, 2019.

Figura 15 – Efeito da exposição *in vitro* ao etanol na atividade da CAT em fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade

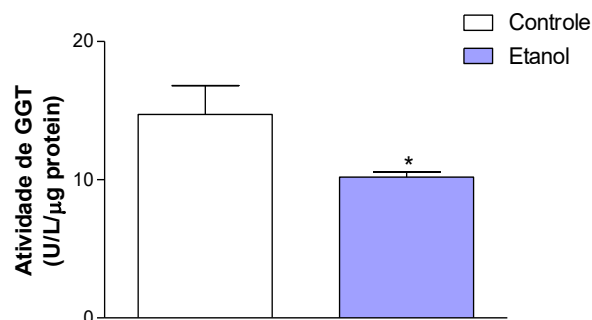


Fatias de hipocampo de ratos de 21 dias de idade foram expostas ao etanol (200 mM) por 60 min. A atividade da CAT foi determinada pela taxa de degradação do peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. **p<0,01 comparado com o grupo controle.

Fonte: Autor, 2019.

Por fim, avaliou-se a atividade da GGT, que participa da reciclagem de aminoácidos da GSH no meio extracelular, permitindo que esses aminoácidos sejam recaptados para o meio intracelular e participem da síntese *de novo* de GSH e regeneração da cisteína. A atividade desta enzima apresentou-se diminuída no hipocampo dos animais de 21 dias de idade expostos a 200 mM de álcool durante 60 minutos (Figura 16).

Figura 16 – Efeito do etanol na dose de 200 mM na atividade da GGT em hipocampus de ratos de 21 dias de idade



A atividade da GGT foi avaliada através da reação onde o substrato γ -glutamil-p-nitroanilida é transferido pela GGT para a molécula aceptora glicilglicina, com liberação de p-nitroanilina. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de 8 animais. Análise estatística: teste “t” de Student. *p<0,05 comparado com o grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

6 DISCUSSÃO

A fim de compreender os efeitos neurotóxicos do etanol durante o desenvolvimento, foi escolhido um modelo experimental *in vitro* para a representação. Desse modo, foram utilizados ratos com 21 dias de idade, uma vez que a literatura demonstra ser a idade do desmame (SENGUPTA, 2013), equivalente ao desmame em humanos que é de, aproximadamente, 6 meses (180 dias) (American Academy of Pediatrics, 2005). Como com 21 dias de idade os animais são considerados sexualmente imaturos, é sabido que a idade média que os ratos atingem a puberdade é de 50 dias após o nascimento, com maturidade sexual em 38 dias pós-natal. Tais dados demonstram que a idade de 21 dias escolhida equivale a idade de 11,5 anos em humanos (SENGUPTA, 2013; LONG; EVANS, 1920).

Diversos estudos na literatura demonstram os prejuízos neurais causados pelo etanol, principalmente no hipocampo, estrutura cerebral intimamente envolvida na formação de memória, aprendizado e humor (RAJPUT et al., 2017; REYNOLDS; BRIEN, 1995; SIRCAR, 2017; WHITE; MATTHEWS; BEST, 2000; ZORUMSKI; MENNERICK; IZUMI, 2013). No entanto, a fisiopatologia dos transtornos causados pelo etanol na exposição durante a gestação e os mecanismos responsáveis pelas alterações causadas não são bem esclarecidos. Portanto, este estudo investigou os efeitos do etanol sobre o hipocampo de ratos imaturos expostos na concentração de 200 mM deste agente neurotóxico, com o intuito de investigar os mecanismos relacionados ao sistema glutamatérgico, ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo. Estudo prévio do grupo mostrou alterações nesses parâmetros em ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e o aleitamento, como também alterações morfológicas e de peso (CESCONETTO et al., 2016).

O íon Ca^{2+} possui grande importância para a função neuronal normal, principalmente pelo fato de estar envolvido em diversas funções celulares e ser regulado por vários mecanismos. O influxo desse íon é relevante na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, como também na atividade de segundos mensageiros celulares (WEBER, 2012). Entretanto, é sabido que, em altas concentrações, o Ca^{2+} pode desencadear uma desregulação no citoesqueleto, através da ativação dos receptores de glutamato NMDA, com possível morte neuronal, relacionado com desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (PESSOA-PUREUR; WAJNER, 2007).

Com o intuito de verificar os danos do etanol ao cérebro de ratos imaturos, avaliou-se o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no hipocampo. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a exposição

a 200 mM de etanol em fatias de hipocampo levou a um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após 60 minutos de exposição, sem alterações nos tempos iniciais. Corroborando esse resultado, Mayer e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento de células de hipocampo em cultura com etanol em uma concentração de 10 mM levou a um aumento do influxo de cálcio. Contudo, Catlin e colaboradores (2000) demonstraram que incubação com a concentração de 75 mM de etanol em cultura de neurônios hipocâmpais não modificou as concentrações de cálcio intracelular após exposição em tempos curtos (15 minutos), apresentando aumento no influxo apenas após 24 horas de exposição ao etanol. Tais dados corroboram os resultados sem alterações no influxo de cálcio após 30 minutos de exposição ao etanol. Nesse contexto, foi recentemente demonstrado que a exposição materna ao etanol *in vivo* leva a uma diminuição no influxo de cálcio em hipocampo de animais imaturos (CESCONETTO et al., 2016). Portanto, sugere-se que os mecanismos envolvidos no influxo de Ca^{2+} não são diretamente afetados pelo etanol, mas que a substância pode alterar a expressão ou a atividade das proteínas envolvidas no influxo e na liberação de Ca^{2+} , principalmente nos receptores glutamatérgicos. É visto que a capacidade do etanol em modular os receptores NMDA não é imediata e depende de determinado tempo para ocorrer.

A ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, permeável aos íons Ca^{2+} , viabiliza o aumento do influxo de Ca^{2+} induzido pelo etanol. Estudos relatam que o aumento do glutamato na fenda sináptica causa a estimulação de seus receptores, principalmente os ionotrópicos, como o NMDA, o que provoca um aumento no influxo de cálcio para o meio intracelular (DANBOLT, 2001; PESSOA-PUREUR; WAJNER, 2007). A ativação excessiva desses receptores pelo etanol pode ocasionar processos de morte celular, decorrente da excitotoxicidade glutamatérgica. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram essa hipótese. Com isso, também investigamos a captação de ^{14}C -glutamato no hipocampo dos animais expostos, bem como a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo desse importante neurotransmissor excitatório, como a glutamina sintetase (GS) e as aminotransferases, ALT e AST.

Ao observar o resultado de diminuição da captação de ^{14}C -glutamato, sugere-se que o aumento desse neurotransmissor na fenda sináptica desencadeie o aumento do influxo de cálcio. No entanto, é visto que a exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação induziu estímulo na captação de glutamato em fatias de hipocampo (CESCONETTO et al., 2016). Uma vez nos astrócitos, o glutamato pode ser convertido em glutamina pela GS, antes de retornar para o neurônio pré-sináptico para ser transformado novamente em glutamato (DANBOLT,

2001). Embora tenha sido observada uma diminuição na captação de glutamato induzida pela exposição *in vitro* ao etanol, foi também observado um aumento na atividade da GS, provocando à conversão de glutamato a glutamina.

O ciclo glutamato-glutamina não é particularmente fechado, uma vez que existem diversas vias que podem gerar o glutamato, tanto em astrócitos, quanto em neurônios, e que não estão diretamente envolvidas na neurotransmissão. Dentre tais vias, estão a entrada do glutamato no ciclo de Krebs (reação reversível) e as vias reações de desaminação oxidativa ou transaminação, com conseqüente geração de energia (MCKENNA, 2007). As reações de transaminação podem ser consideradas como um efeito compensatório, em que a alanina pode fornecer seu grupo amino ao α -KG, que é convertido em glutamato e piruvato nos neurônios (ARMANO et al., 2002), sendo esta uma reação reversível. Nesse sentido, sugere-se que esse processo esteja sendo induzido pelo etanol, visto que foi demonstrado neste estudo um aumento da atividade da ALT, sem alterar a atividade da AST, após exposição a essa neurotoxina.

As células do SNC consomem grande quantidade de glicose que, junto ao consumo de oxigênio, são essenciais para o metabolismo energético cerebral. O cérebro expressa transportadores de glicose (GLUTs), bem como enzimas glicolíticas e do ciclo de Krebs. Sendo assim, a glicose pode ser utilizada como substrato energético (SILVER; ERECÍNSKA, 1990; CASTRO et al., 2009), além de ser um importante precursor para a síntese de neurotransmissores, como o glutamato (SILVER; ERECÍNSKA, 1990). Entretanto, alguns estudos discutem que o metabolismo oxidativo neuronal não é dependente da energia proveniente da glicose durante a neurotransmissão, mas sim do lactado proveniente de astrócitos (CASTRO et al., 2009; SONNEWALD, 2014). Normalmente, quando a taxa da glicólise excede a taxa de entrada de intermediários no ciclo de Krebs, o piruvato pode ser reduzido a lactato. Nesse contexto, a interconversão de lactato e piruvato é catalisada pela LDH (SONNEWALD, 2014).

Este trabalho teve como resultado uma diminuição na captação de glicose e um aumento da atividade da LDH em fatias de hipocampo expostas a concentração de 200 mM de etanol, similar ao que foi observado em hipocampo de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e o aleitamento (CESCONETTO et al., 2016). Em meio a isso, Mitchell e colaboradores (1998) consideram que, além da neurotoxicidade causada ao feto pelo etanol, a hipoglicemia e a hipóxia são fatores que contribuem e são muito relevantes para o acometimento da SAF.

O efeito inibitório do etanol sobre a captação de glicose e o transporte pelas células endoteliais do cérebro provoca a disfunção da BHE e degeneração neuronal (MUNEER et al.,

2011). O aumento na atividade da LDH observado neste estudo pode ser uma via compensatória do metabolismo energético devido à baixa captação de glicose. Neste sentido, sugere-se que a atividade aumentada desta enzima esteja favorecendo a formação de lactato nos astrócitos e de piruvato nos neurônios, em que o lactato é transportado e utilizado nos neurônios através de transportadores de monocarboxilatos. Estudos demonstram que o cérebro pode utilizar o lactato durante a hipoglicemia (quando a taxa de glicose permanece baixa) ou em situações em que as concentrações plasmáticas de lactato estão elevadas (STOBART; ANDERSON, 2013).

O etanol pode causar prejuízos que levam a diferentes efeitos sobre diversos tecidos, mediados pela presença de metabólitos tóxicos, responsáveis pelo estímulo da produção de EROs e diminuição das defesas antioxidantes (TURCATEL et al., 2012). Esses danos provocados pela ingestão excessiva de bebidas alcoólicas estão associados, ao menos em parte, com o desbalanço do estado redox, decorrente da produção de espécies reativas durante o metabolismo do etanol. O processo ocorre pelo aumento da formação de radicais superóxido e hidroxila, via mitocôndria, pelas enzimas do citocromo P450 (CYP2E1) durante a oxidação do acetaldeído à acetato (GOODLETT; HORN, 2001), o que acaba alterando a homeostase redox e causando alterações estruturais e nas funções celulares (PUSHPAKIRAN et al., 2004).

O cérebro é o órgão mais suscetível a geração dessas moléculas reativas, por conter alta concentração de lipídeos e consumir cerca de 20% de oxigênio consumido pelo organismo (SOKOLOFF, 1999). Além disso, ao processar grande quantidade de O₂, existe um elevado teor de substratos disponíveis para oxidação (ácidos graxos poli-insaturados e catecolaminas). Em fase de desenvolvimento, o cérebro possui apenas uma fração da atividade de enzimas antioxidantes do cérebro adulto e, por este motivo, torna-se ainda mais vulnerável aos efeitos neurotóxicos relacionados ao desbalanço do estado redox comparado ao cérebro adulto (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, HENDERSON; CHEN; SCHENKER, 1999).

Certas regiões do SNC, como o hipocampo e o cerebelo, podem ser particularmente sensíveis ao estresse oxidativo em relação a outras regiões do cérebro devido aos baixos níveis endógenos de vitamina E, um importante agente bioquímico antioxidante (ABEL; HANNIGAN, 1995). No cérebro, a exposição ao etanol pode induzir estresse devido a um desequilíbrio entre a geração de EROs (radicais superóxido, hidroxil e outros) e as defesas antioxidantes celulares. Um sistema de defesa deprimido pode ser comum em circunstâncias normais. Contudo, em condições pró-oxidativas, como durante a exposição ao etanol, essas defesas antioxidantes baixas podem predispor a danos oxidativos consideráveis (AKYOL et al., 2004; HALLIWELL, 2006).

A fim de proteger as células contra os insultos causados, o organismo apresenta um sistema de defesa enzimático e não-enzimático que atuam como detoxificadores de tais agentes, constituídos pela glutathiona reduzida (GSH), SOD, CAT, GPx, entre outros (DE BOER; YAO; RAHMAN, 2007). Com isso, foi avaliada a atividade dessas enzimas e agentes antioxidantes no modelo *in vitro* de exposição ao etanol na concentração de 200 mM em hipocampo de ratos imaturos. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa da GSH, SOD, CAT e GPx, além de não mostrar alteração na GR. Tais dados se mostram diferentes do observado em um modelo *in vivo*, em que foi visto um aumento da SOD, enquanto o conteúdo de GSH e a atividade da GST e da GPx não foram observadas alterações (CESCONETTO et al., 2016). Segundo os estudos realizados por Heaton e colaboradores (2003), não foram observadas diferenças na produção de EROs entre animais controle e os que foram expostos ao etanol, resultado observado em animais com idade semelhante a este estudo (após serem expostos ao etanol com 7 dias de idade).

A GSH é a principal defesa antioxidante não enzimática na célula, ao desempenhar um papel importante na defesa celular contra EROs e intermediários reativos (REED, 1990). Dentre as funções da GSH, inclui-se a participação no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, bem como a detoxificação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos lipídicos através da ação catalítica da GPx (VALKO et al., 2006). Patten e colaboradores (2013) mostraram em seu estudo que o conteúdo de GSH foi significativamente diminuído nas quatro regiões cerebrais analisadas de ratos adultos que foram expostos ao etanol durante o desenvolvimento embrionário. Montoliu e colaboradores (1995) mediram os níveis de GSH em culturas de astrócitos expostas a 25 ou 50 mM de etanol e observaram uma considerável diminuição nos níveis de GSH em períodos de cultura diferentes.

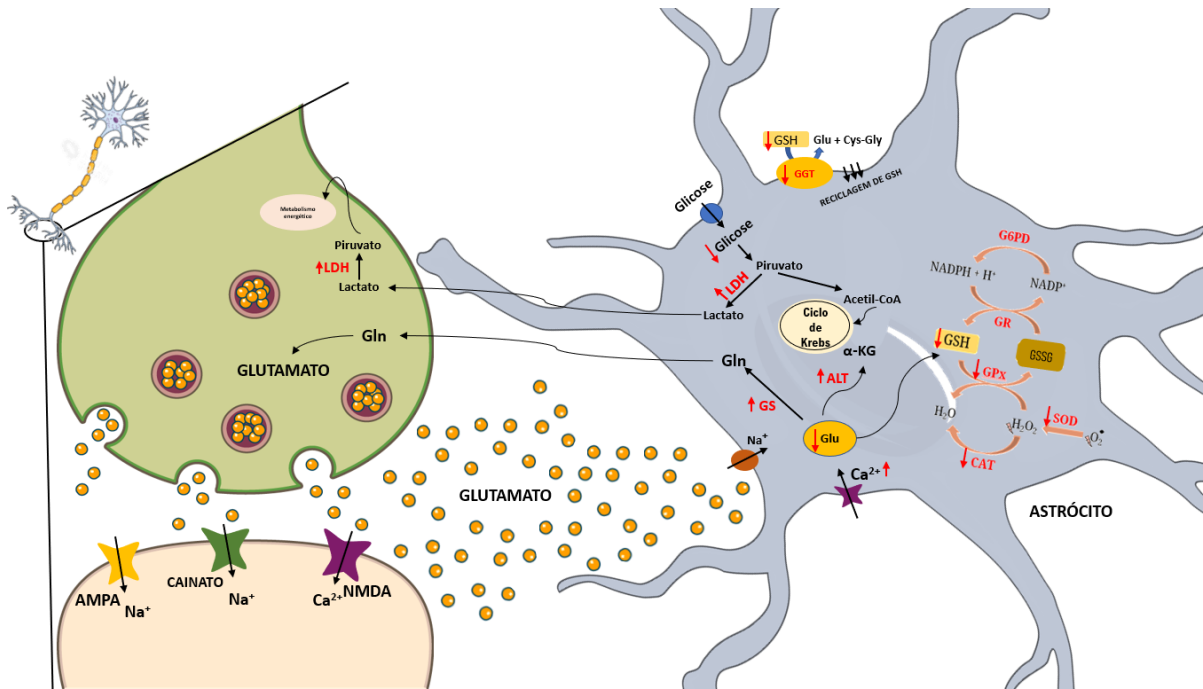
A partir das alterações observadas nas atividades das enzimas antioxidantes e na depleção dos níveis de GSH na exposição *in vitro* ao etanol, investigou-se o efeito dessa exposição sobre atividade da GGT. A enzima γ -glutamyl-transferase (GGT) é uma glicoproteína ligada à membrana celular, responsável por iniciar a metabolização da GSH extracelular, transferindo os grupos glutamyl da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos, tendo a glutathiona como principal substrato (ZHANG et al., 2005). Participa da reciclagem de aminoácidos da glutathiona e seus conjugados secretados para o meio extracelular e na manutenção do estado redox das células (MAREŠ et al., 2005). Neste estudo, foi observada uma diminuição na atividade da GGT, enquanto que um resultado similar foi demonstrado em estudo prévio de exposição

materna ao etanol (CESCONETTO et al., 2016) com consequente alteração na reciclagem de aminoácidos da GSH no meio extracelular.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a exposição *in vitro* a 200 mM de etanol induz diversas alterações neuroquímicas no hipocampo de ratos de 21 dias de idade, associadas à diminuição da transmissão glutamatérgica, déficit energético e desbalanço do estado redox (Figura 17). Sugere-se que tais alterações neuroquímicas podem explicar, ao menos em parte, o comprometimento neurológico causado pela exposição ao etanol durante o desenvolvimento, podendo estar relacionado à fisiopatologia da SAF ao comprometer os processos de aprendizagem e memória em uma exposição durante a gestação. Novos experimentos são necessários para esclarecer o envolvimento dessas alterações em cenários de comprometimento neurológico.

Figura 17 – Mecanismo de toxicidade do etanol sobre o hipocampo de ratos de 21 dias de idade após a exposição ao etanol em uma concentração de 200 mM



Esquema representativo do mecanismo de toxicidade do etanol, demonstrando o comprometimento na captação astrocitária de glutamato, que culmina em aumento no influxo de Ca^{2+} via receptores do tipo NMDA, o que pode resultar em comprometimentos nos processos de aprendizagem e memória, classicamente modulados via sistema glutamatérgico. Uma vez nos astrócitos, o glutamato pode seguir diversas rotas. Nos animais expostos ao etanol, observa-se aumento na atividade da GS, indicando aumento na formação de glutamina, que pode ser transferida aos neurônios e convertida novamente em glutamato. O aumento na atividade da ALT pode estar convertendo glutamato em α -KG e conseqüentemente levando a uma maior utilização deste neurotransmissor no metabolismo energético celular, conseqüência observada pela diminuição no influxo de glicose pelas células neurais, o que corrobora a maior necessidade energética e utilização do esqueleto carbonado do glutamato no ciclo de Krebs, como um mecanismo compensatório. Além disso, observa-se que a exposição ao etanol induz aumento compensatório na atividade da LDH, provavelmente para gerar lactato nos astrócitos, que será secretado e captado pelos neurônios, onde será utilizado no metabolismo energético. As alterações no sistema glutamatérgico e no metabolismo energético estão associadas à indução de estresse oxidativo com alteração na atividade das enzimas antioxidantes e conseqüente dano oxidativo.

Fonte: Autor, 2019.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. L.; HANNIGAN, J. H. Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influences. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 17, n. 4, p. 445–462, 1995.

AGARWAL, D. P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. **Pathologie Biologie**, v. 49, n. 9, p. 703–709, 2001.

AKYOL, Z. et al. Apo-Calmodulin Binds with its C-terminal Domain to the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 C0 Region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 3, p. 2166–2175, 2004.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. 2005. **Revised breastfeeding recommendations.** Disponível em: <http://www.aap.org/advocacy/releases/feb05breastfeeding.html>.

ARMANO, S. et al. Localization and functional relevance of system a neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10467–10473, 2002.

ASPBERG, A.; TOTTMAR, O. Ethanol-Induced Increase in Catalase Activity in Reaggregation Cultures of Rat Brain Cells is Due to Increased Oligodendrocyte Differentiation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 18, n. 3, p. 620–624, 1994.

BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, 2006.

BEAN, P. Biochemical markers for alcohol abuse: highlights of 2000. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 4, p. 5, 2002.

BERTRAND, J.; FLOYD, L. L.; WEBER, M. K. Fetal Alcohol Syndrome Prevention Team, division of Birth defects and developmental disabilities, national center on Birth defects and

developmental disabilities, centers for disease control and Prevention (CDC). Guidelines for 24 identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Recommendations and Reports**, v. 54, n. 11, p. 1-14, 2005.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-8, 1963.

BROCARD, P. S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1-2, p. 209-225, 2011.

BURD, L. et al. Ethanol and the placenta: A review. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 20, n. 5, p. 361-375, 2007.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione Reductase (GSR). **Methods in Enzymology**, v. 13, n. 1955, p. 807-807, 1985.

CARLI, M.; INVERNIZZI, R. W. Serotonergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuit in executive and attention deficits induced by NMDA receptor hypofunction in the 5-choice serial reaction time task. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. JUNE, p. 1-20, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants prooxidants and related controversy Natural. v. 51, p. 15-25, 2012.

CASTRO, M. A. et al. A metabolic switch in brain: Glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 2, p. 423-440, 2009.

CATLIN, M. C.; GUIZZETTI, M.; COSTA, L. G. Effect of ethanol on muscarinic receptor-induced calcium responses in astroglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 60, n. 3, p. 345-355, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Alcohol use and binge drinking among women of childbearing age: United States, 2006–2010. **MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 61, n.28, p. 534–538, 2012.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). 2019. **Síndrome Alcoolica Fetal**. Disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/4763/sindrome-alcoolica-fetal.php>.

CESCONETTO, P. A. et al. Maternal Exposure to Ethanol During Pregnancy and Lactation Affects Glutamatergic System and Induces Oxidative Stress in Offspring Hippocampus. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, n. 1, p. 52–61, 2016.

COSTARDI, J. V. V. et al. A review on alcohol: From the central action mechanism to chemical dependency. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 4, p. 381–387, 2015.

CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 115–127, 2009.

CUMMINGS, A. M.; KAVLOCK, R. J. Gene-environment interactions: A review of effects on reproduction and development. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 461–485, 2004.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. [Review]. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1–105, 2001.

DE BOER, W. I.; YAO, H.; RAHMAN, I. Future therapeutic treatment of COPD: Struggle between oxidants and cytokines. **International Journal of COPD**, v. 2, n. 3, p. 205–228, 2007.

DE LA MONTE, S. M.; KRIL, J. J. Human alcohol-related neuropathology. **Acta Neuropathologica**, v. 127, n. 1, p. 71–90, 2014.

EID, T.; COULTER, D. A. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. **Glia**, v. 60(8), n. 8, p. 1215–1226, 2012.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. FORMATION OR REMOVAL OF OXYGEN RADICALS.

Health (San Francisco), v. 105, p. 114–120, 1984.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver Enzyme Alterations. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, v. 172, n. 3, p. 367–79, 2005.

GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcohol Research and Health**, v. 25, n. 3, p. 175–184, 2001.

GRIENDLING, K. K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 10, p. 2175–2183, 2000.

GUPTA, K. K.; GUPTA, V. K.; SHIRASAKA, T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome—Pathogenesis, Risks, and Treatment. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, n. 8, p. 1594–1602, 2016.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press Inc.**, New York. 1999.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4.ed. Oxford University Press. 2007.

HEATON, M. B. et al. Ethanol effects on neonatal rat cortex: Comparative analyses of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and oxidative processes during vulnerable and resistant periods. **Developmental Brain Research**, v. 145, n. 2, p. 249–262, 2003.

HECKMANN, W.; SILVEIRA, C. M. Dependência do álcool : aspectos clínicos e diagnósticos. **Álcool E Suas Consequências: Uma Abordagem Multiconceitual.**, p. 67- 87., 2009.

HENDERSON, G. I.; CHEN, J.; SCHENKER, S. [Frontiers in Bioscience, 4, d541-550, June 15, 1999] ETHANOL, OXIDATIVE STRESS, REACTIVE ALDEHYDES, AND THE FETUS George I. Henderson, JuanJuan Chen and Steven Schenker. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 1972, n. 1, p. 541–550, 1999.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T. F. Hippocampal asymmetry: Differences in structures and functions. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 3, p. 453–460, 2013.

HULBERT, A. J. et al. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1175–1213, 2007.

JULIENE, B.; MCCLAIN, C. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease Juliane. **Biol Chem**, v. 23, n. 1, p. 1–27, 2010.

KARINCH, A. M.; MARTIN, J. H.; VARY, T. C. Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 1, 2008.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 2015.

LANOUE, K. F. et al. Role of specific aminotransferases in de novo glutamate synthesis and redox shuttling in the retina. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 5, p. 914–922, 2001.

LEDESMA, J. C.; BALIÑO, P.; ARAGON, C. M. G. Reduction in Central H₂O₂ Levels Prevents Voluntary Ethanol Intake in Mice: A Role for the Brain Catalase-H₂O₂ System in Alcohol Binge Drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 1, p. 60–67, 2014.

LOMAKO, J. et al. Glycogen synthesis in the astrocyte: From glycogenin to proglycogen to glycogen. **FASEB Journal**, v. 7, n. 14, p. 1386–1393, 1993.

LONG, J.A.; EVANS, A.M. On the attainment of sexual maturity and the character of the first estrous cycle in the rat. **Ana Rec**, v. 18, p. 244, 1920.

LOOMBA, R.; BETTENCOURT, R.; BARRETT-CONNOR, E. Synergistic association between alcohol intake and body mass index with serum alanine and aspartate aminotransferase levels in older adults: the Rancho Bernardo Study. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 30, n. 1, p.

1–18, 2009.

LOTFULLINA, N.; KHAZIPOV, R. Ethanol and the Developing Brain: Inhibition of Neuronal Activity and Neuroapoptosis. **Neuroscientist**, v. 24, n. 2, p. 130–141, 2018.

LOUREIRO, C. et al. Síndrome Alcoólica Fetal: falta de prevenção no período gestacional. p. 42–43, 1982.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 1951.

MAREŠ, V. et al. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research**, v. 136, n. 1–2, p. 75–80, 2005.

MARK MAYNARD, EMILY BARTON, CALEB ROBINSON, JESSICA WOODEN, L. L. Sex Differences in Hippocampal Damage, Cognitive Impairment, and Trophic Factor Expression in an Animal Model of an Alcohol Use Disorder. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

MÁRQUEZ, J. et al. Glutamate and Brain Glutaminases in Drug Addiction. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 3, p. 846–857, 2017.

MAY, P. A. et al. the Epidemiology of Fetal Alcohol Syndrome and. **Drug Alcohol Depend**, v. 88, n. 505, p. 259–271, 2008.

MAYER, S. et al. Acamprosate, MK-801, and ifenprodil inhibit neurotoxicity and calcium entry induced by ethanol withdrawal in organotypic slice cultures from neonatal rat hippocampus. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 26, n. 10, p. 1468–1478, 2002.

MCKENNA, M. C. The Glutamate-Glutamine Cycle Is Not Stoichiometric: Fates of Glutamate in Brain. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 3, p. 612–622, 2007.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine

and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MITCHELL, J. J. et al. A comparative study of ethanol, hypoglycemia, hypoxia and neurotrophic factor interactions with fetal rat hippocampal neurons: A multi-factor in vitro model for developmental ethanol effects. **Developmental Brain Research**, v. 105, n. 2, p. 241–250, 1998.

MONTOLIU, C. et al. Ethanol Increases Cytochrome P4502E1 and Induces Oxidative Stress in Astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 6, p. 2561–2570, 1995.

MÖYKKYNNEN, T.; KORPI, E. R. Acute Effects of Ethanol on Glutamate Receptors. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 111, n. 1, p. 4–13, 2012.

MUNEER, P. M. A. et al. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood–brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-L-carnitine. v. 46, n. 4, p. 564–574, 2011.

MYLLYNEN, P.; PASANEN, M.; PELKONEN, O. Human placenta: A human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. **Placenta**, v. 26, n. 5, p. 361–371, 2005.

NIEMELÄ, O. Biomarker-based approaches for assessing alcohol use disorders. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, 2016.

PACKER, L.; GLAZER, A. R. Oxygen radicals in biological systems: Preface. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1947, p. 121–126, 1990.

PATTEN, A. R.; BROCARD, P. S.; CHRISTIE, B. R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 760–769, 2013.

PERO, R. W.; ROUSH, G. C.; MARKOWITZ, M. M.; MILLER, D. G. Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. **Cancer Detect Prev**, v. 14, n. Department of Molecular

Ecogenetics, Wallenberg Laboratory, University of Lund, Sweden., p. 555–561, 1990.

PESSOA-PUREUR, R.; WAJNER, M. Cytoskeleton as a potential target in the neuropathology of maple syrup urine disease: Insight from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 5, p. 664–672, 2007.

PFEFFERBAUM, A. et al. Brain Gray and White Matter Volume Loss Accelerates with Aging in Chronic Alcoholics: A Quantitative MRI Study. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 16, n. 6, p. 1078–1089, 1992.

POHANKA, M. Toxicology and the biological role of methanol and Ethanol: Current view. **Biomedical Papers**, v. 160, n. 1, p. 54–63, 2016.

POPOVA, S. et al. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e290–e299, 2017.

PREEDY, V. R. **Neuroscience of Alcohol: Mechanisms and treatment**. London: Elsevier, 2019.

PUNTARULO, S. et al. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **BBA - General Subjects**, v. 1074, n. 2, p. 277–283, 1991.

PUSHPAKIRAN, G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C.V. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. **Pharmazie**, v. 59, n.11, p. 869-72, 2004.

RAJENDRAM, R.; PREEDY, V. R. Effect of alcohol consumption on the gut. **Digestive Diseases**, v. 23, n. 3–4, p. 214–221, 2006.

RAJPUT, P. et al. Alcohol aggravates stress-induced cognitive deficits and hippocampal neurotoxicity: Protective effect of melatonin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 457–466, 2017.

RASHEED, A.; HINES, R. N.; MCCARVER-MAY, D. G. Variation in induction of human placental CYP2E1: Possible role in susceptibility to fetal alcohol syndrome? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 396–400, 1997.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189–207, 2006.

REED, D. J. Glutathione: Toxicological Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 30, p. 603–31, 1990.

REYNOLDS, J. D.; BRIEN, J. F. Ethanol neurobehavioural teratogenesis and the role of L-glutamate in the fetal hippocampus. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1209–1223, 1995.

ROCCO, A. et al. Alcoholic disease: Liver and beyond. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14652–14659, 2014.

RUSSELL, M.; SKINNER, J. B. Early Measures of Maternal Alcohol Misuse as Predictors of Adverse Pregnancy Outcomes. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 12, n. 6, p. 824–830, 1988.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, 2017.

SAMPSON, P. D. et al. Prenatal alcohol exposure, birthweight, and measures of child size from birth to age 14 years. **American Journal of Public Health**, v. 84, n. 9, p. 1421–1428, 1994.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. p. 501–524, 1970.

SILVER, I.; ERECÍNSKA, M. Intracellular and Extracellular Changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. **Journal Of General Physiology**, v. 95, n. May, 1990.

SIRCAR, R. Ethanol alters N-methyl-d-Aspartate receptor regulation in the hippocampus of adolescent rats. **NeuroReport**, v. 28, n. 11, p. 625–629, 2017.

SMALL, S. A. et al. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. v. 27, n. 4, p. 585–601, 2011.

SOKOLOFF, L. Energetics of functional activation in neural tissues. **Neurochemical Research**, v. 24, p. 321–329, 1999.

SONNEWALD, U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - Where do all the carbons go? **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 4, p. 399–406, 2014.

STOBART, J. L.; ANDERSON, C. M. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. MAR, p. 1–21, 2013.

STOLER, J. M.; HOLMES, L. B. Under-Recognition of Prenatal Alcohol Effects in. **THE JOURNAL OF PEDIATRICS**, v. 135, p. 431–436, 1999.

STREISSGUTH, A. P.; BOOKSTEIN, F. L.; BARR, H. M. A dose–response study of the enduring effects of prenatal alcohol exposure: birth to 14 years. In: Spohr, H. L.; Steinhausen, H. C. (Eds); Koren G.; Nulman I.; Chudley A. E.; Looke C. Fetal alcohol spectrum disorder. **Canadian Medical Association Journal**, v. 169, n. 11, p. 1181-1185, 2003.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION. 2012. **Fetal alcohol spectrum disorders**. Disponível em: <http://fasdcenter.samhsa.gov/index.aspx>.

SULLIVAN, E. V; ROSENBLOOM, M. J.; PFEFFERBAUM, A. Alcoholic Men. **Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes**, v. 24, n. 5, 2000.

TATU, L.; VUILLIER, F. Structure and vascularization of the human hippocampus. **The**

Hippocampus in Clinical Neuroscience, v. 34, p. 18–25, 2014.

TURCATEL, E.; FUNCHAL, C.S.; GOMEZ, R. Behavioral changes and oxidative stress parameters by alcohol and tobacco in the central nervous system. **Revista Neurociências**, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

WEBER, J. T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 APR, n. April, p. 1–16, 2012.

WHITE, A. M.; MATTHEWS, D. B.; BEST, P. J. Ethanol, memory, and hippocampal function: A review of recent findings. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 88–93, 2000.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p. 263–355, 2001.

YANG, A. L. et al. Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 6, p. 649–656, 2008.

ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 1, p. 98–103, 2007.

ZHANG, H. et al. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 4, p. 463–471, 2005.

ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; IZUMI, Y. Acute and Chronic Effects of Ethanol on Learning-Related Synaptic Plasticity. **Alcohol**, v. 23, n. 1, p. 1–36, 2013.