

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALLAN LUÍS BARBOZA ATUM

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE
GENES RELACIONADOS À HIPERTROFIA CARDÍACA EM
CAMUNDONGOS C57BL/6**

São Paulo

2020

ALLAN LUÍS BARBOZA ATUM

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE
GENES RELACIONADOS À HIPERTROFIA CARDÍACA EM
CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina – Ciências da Saúde da
Universidade Nove de Julho, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Médicas.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

São Paulo

2020

Atum, Allan Luís Barboza.

Efeito da exposição pré-natal ao álcool na expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca em camundongos C57Bl/6. / Allan Luís Barboza Atum. 2020.

97 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior.

1. Exposição pré-natal ao álcool. 2. Expressão gênica. 3. Coração. 4. Transdução de sinal. 5. Prole.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616



São Paulo 30 de setembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **ALLAN LUIS BARBOZA ATUM**

Título da dissertação: **EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DISFUNÇÃO CARDIOVASCULAR EM CAMUNDONGOS C57BL/6.**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANÔNIO SILVA JÚNIOR

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA

***Dedico este trabalho ao meu
esposo, Nilton Tadeu, por toda a
paciência, apoio e compreensão
em todas as etapas deste
mestrado, sempre ouvindo
minhas explicações científicas
com brilho nos olhos e
sorrindo...***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliana e Salim, por me ensinarem a ser ético e a nunca desistir dos meus objetivos, bem como pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Elthon e Jean, pelo companheirismo e carinho, por toda a ajuda, principalmente em relação às fórmulas de Excel.

À minha cunhada e aos meus sobrinhos, pelo carinho: principalmente ao Lucas por, desde pequeno, roubar meu jaleco e falar com orgulho que seu tio é biólogo; e à Júlia por sempre cuidar da minha coleção de pedras e olhar com admiração todos os insetos que levava para eles.

Aos meus amigos, Daniela, Leandro, Stephanie, Camila, Juliana, Nathalya e Layana, pela paciência durante as minhas ausências em ocasiões especiais por conta do protocolo da pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, por todas as oportunidades de aprendizado durante as disciplinas.

À Luci Ramos por todos os conselhos, piadas e toda ajuda durante todo o mestrado.

À minha amiga Marlene, que, desde o primeiro dia de mestrado, torce, acompanha e sempre me ouve com atenção e carinho.

Ao professor Cleber Camacho, por responder prontamente todas as minhas dúvidas de bioestatística e pelas sugestões valiosas para este projeto.

À professora Maria Aparecida Dalboni, pelo cuidado e pelas sugestões em todo o processo de construção do projeto.

Ao professor Rodrigo Labat, que, mesmo enfermo, acompanhou-nos durante o módulo internacional e vibrou pelo prêmio que recebi.

A todas as secretárias do Programa de Pós-Graduação, Juliana, Camila e Daniela pois, sem elas, nada seria entregue ou organizado, e pela amizade.

Ao professor Humberto, pela ajuda em todo o processo de obtenção da bolsa de auxílio, pelas aulas e conversas científicas.

Aos colegas do grupo de pesquisa Érico, Danila, Eduardo, José Almir e Gabriel, especialmente à Profa. Dra. Regiane Feliciano pela ajuda nas etapas do projeto.

A todo o corpo docente do Programa de Mestrado em Medicina da Universidade Nove de Julho.

Ao professor João Bosco Pesquero, por permitir o uso de seu laboratório na Unifesp, e ao Caio Peres por toda a ajuda, treinamento e cuidado nas análises de PCR, mesmo durante o período crítico da pandemia.

A todas as técnicas de laboratório e, em especial, para a Dra. Nurya e à Vanessa, responsáveis pelo Biotério da Universidade Nove de Julho, por sua amizade e por sempre terem cuidado dos meus animais com carinho e dedicação.

Ao CAPES, pela bolsa-auxílio durante a maior parte do mestrado, bem como à Diretoria de Saúde III, pela oportunidade de lecionar a disciplina de genética no curso de Psicologia da Universidade Nove de Julho.

Com especial gratidão, às alunas de Iniciação Científica, Juliana, Nicole, Samara, Adriana, Laura, Daniela e Lariane, pois, sem vocês, nada disso teria acontecido. Obrigado pelo convívio e pela troca de conhecimentos.

A todas as forças do bem que nos cercam, protegem e guiam, e que tanto me ajudaram durante esse período, em todas as dificuldades e conquistas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor Dr. José Antônio Silva Junior, meu orientador, pelo exemplo de docência, de orientação, de compartilhamento de informações e conhecimento. Mesmo diante de momentos de incerteza e de prazos apertados, a sua parceria foi fundamental para o bom resultado obtido em todos os projetos desenvolvidos durante essa etapa. Que eu possa ter a honra de estender esse convívio durante a minha jornada como pesquisador.

***“No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade”
(Albert Einstein)”***

RESUMO

Efeito da exposição pré-natal ao álcool na expressão de genes relacionados à hipertrofia cardíaca em camundongos C57Bl/6.

O impacto potencial da exposição pré-natal ao álcool varia consideravelmente entre os indivíduos, podendo levar à alterações morfológicas e genéticas sistêmicas. Entretanto, muitas dessas alterações ocorrem à nível celular, podendo, ao longo da vida, predispor o indivíduo às doenças crônicas. O impacto no sistema cardiovascular pode resultar em alterações como hipertrofia cardíaca e defeitos valvares, bem como alterações na expressão de genes relacionados à homeostase cardíaca. Assim, utilizando camundongos isogênicos C57Bl/6 expostos ao álcool durante a gestação na proporção 10% (v/v) diluídos em água de consumo verificamos a expressão de genes diferencialmente expressos participantes das vias de transdução de sinal relacionadas à hipertrofia cardíaca em ventrículo esquerdo (LV), utilizando placas customizadas TaqMan® em equipamento de RT-qPCR. Além de alterações morfométricas como baixo peso ao nascimento, sobrepeso na idade adulta e leve hipertrofia do coração e VE, verificamos alterações na transcrição de 18 dos 20 genes analisados. Assim, em nosso modelo experimental, a exposição pré-natal ao álcool induziu alterações morfométricas e hipertrofia cardíaca, bem modulou a transcrição de genes relacionados a esta condição cardiovascular. Além disso, nossos dados sugerem que estas alterações são comparáveis às observadas em animais com disfunções cardíacas experimentais como o infarto do miocárdio.

Palavras-chave: Exposição pré-natal ao álcool, expressão gênica, coração, transdução de sinal, prole.

ABSTRACT

Effect of prenatal alcohol exposure on the expression of genes-related to cardiac hypertrophy in C57Bl/6 mice.

The potential impact of prenatal alcohol exposure varies considerably between individuals, which can lead to systemic morphological and genetic changes. However, many of these changes occur at the cellular level, and may, throughout life, predispose the individual to chronic diseases. The impact on the cardiovascular system can result in changes such as cardiac hypertrophy and valve defects, as well as changes in the expression of genes related to cardiac homeostasis. Thus, using isogenic C57Bl/6 mice exposed to alcohol during pregnancy at a ratio of 10% (v / v) diluted in drinking water, we verified the expression of differentially expressed genes participating in the signal transduction pathways related to cardiac hypertrophy in the left ventricle (LV), using customized TaqMan® plates in RT-qPCR equipment. In addition to morphometric changes such as low birth weight, overweight in adulthood and mild hypertrophy of the heart and LV, we verified changes in the transcription of 18 of the 20 genes analyzed. Thus, in our experimental model, prenatal alcohol exposure induced morphometric changes and cardiac hypertrophy, as well as modulated the transcription of genes related to this cardiovascular condition. In addition, our data suggest that these changes are comparable to those seen in animals with experimental cardiac dysfunctions such as myocardial infarction.

Keywords: Fetal alcohol exposure, gene expression, heart, signal transduction, offspring.

ÍNDICE

1.	Contextualização	19
1.1.	Consumo de álcool durante a gestação e o desenvolvimento de Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal	23
1.2.	Gestação Murina.....	26
1.3.	Alterações cardíacas e exposição pré-natal ao álcool	28
1.4.	Biomarcadores.....	31
1.5.	Justificativa e relevância	33
2.	Objetivos.....	34
2.1.	Geral	34
2.2.	Específicos.....	34
3.	Método.....	35
3.1.	Modelo animal e desenho do estudo	35
3.1.1.	Protocolo grupo Controle	36
3.1.2.	Protocolo grupo Etanol.....	37
3.2.	Ganho de peso gestacional	39
3.3.	Coleta dos materiais biológicos	39
3.3.1.	Análise do peso ventricular e cardíaco.....	40
3.3.2.	Expressão gênica – Biomarcadores.....	41
3.3.3.	Expressão gênica – Procedimentos – PCR “Array”	42
a.	Extração do DNA	42
b.	Tratamento do RNA total e Integridade das amostras	43
c.	Síntese de cDNA – Transcrição reversa.....	43
d.	Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR.....	44
3.3.	Análise estatística	45
4.	Resultados.....	46
4.1.	Dados morfométricos da prole	48
4.2.	Análise da Expressão gênica.....	53

4.2.1. VTS da Hipertrofia Cardíaca	54
5. Discussão	60
5.1. Exposição pré-natal ao álcool e alterações morfológicas na prole	61
5.2. Exposição pré-natal ao álcool e VTS da Hipertrofia Cardíaca	63
6. Considerações finais.....	72
7. Referências bibliográficas	73
8. Apêndice.....	89
9. Anexos	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 quantidade de nascimentos por categoria de anomalias no Brasil de 2008 – 2017.	23
Tabela 2. Cálculo de diluição para obtenção de 1L da solução de EtOH em relação a porcentagem desejada.	38
Tabela 3. Genes selecionados para análises moleculares da VTS de Hipertrofia (Custom TaqMan® Array Plates)	41
Tabela 4. Dados morfométricos das fêmeas progenitoras.....	46
Tabela 5. Quantificação de RNA extraído das amostras de tecidos cardíacos dos animais dos grupos Controle e P.A.E.....	53
Tabela 6. Expressão relativa mRNA, grupo P.A.E. em relação ao grupo Controle.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo total de álcool <i>per capita</i> (APC) por região WHO (mais de 15 anos; em litros de álcool puro), 2016. Adaptado [4].	19
Figura 2. Esquema das 3 vias oxidativas do metabolismo alcoólico.	21
Figura 3. Prevalência de FAS e FASD na população mundial por regiões administrativas WHO.....	25
Figura 4. Gestação murina versus humana.....	28
Figura 5. Protocolo grupo Controle.....	36
Figura 6. Protocolo grupo Exposição pré-natal ao álcool (P.A.E.).....	38
Figura 7. Protocolo de coleta e tratamento das amostras em ambos os grupos (arquivo pessoal).....	40
Figura 8. Ganho de peso gestacional total e diário nos grupos amostrais.	47
Figura 9. Flutuação de peso pré-gestacional nos grupos amostrais.	47
Figura 10. Curva de mortalidade/sobrevivência entre os grupos amostrais. ...	48
Figura 11. Pesos corporais ao nascimento e PN60 nos grupos amostrais.	49
Figura 12. Comprimento corporal (PN60) nos grupos amostrais.....	50
Figura 13. Relação Peso/ Comprimento (P/C) nos grupos amostrais.	50
Figura 14. Pesos absolutos do coração e ventrículo esquerdo (VE) nos grupos amostrais.....	51
Figura 15. Relação entre os pesos das estruturas cardíacas corrigida pelo comprimento da tíbia (mg/ mm) nos grupos amostrais.	52
Figura 16. Relação entre os pesos das estruturas cardíacas corrigida pelo comprimento da tíbia (mg/ mm) no grupo P.A.E.	52
Figura 17. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 1.....	55
Figura 18. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 2.....	56
Figura 19. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 3.....	57
Figura 20. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 4.....	58
Figura 21. Expressão dos genes no grupo P.A.E. em comparação ao grupo Controle.....	59

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

°C – grau(s) Celsius
μg – micrograma(s)
μL – microlitro(s)
μm – micrometro(s)
A260/A230 – Razão de absorbância ribonucleico
A260/A280 – Razão de absorbância proteica
Ace – Gene da enzima conversora de Angiotensina
Ace2 – Gene da enzima conversora de angiotensina 2
Acetil-CoA – Proteína Acetilcoenzima A
Acta2 - Actina do músculo liso alfa
ad libitum – à vontade
AD – Átrio direito
ADH/ ADH2 – Álcool desidrogenase 2
AdoMet – S-adenosilmetionina
AE – Átrio esquerdo
Agtr1a – Gene do receptor de angiotensina II tipo 1A
Ang II – Angiotensina II
APC – Álcool *per capita*
ALDH – Aldeído desidrogenase
ANP – Peptídeo natriurético atrial
AT1 – Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2 – Receptor de angiotensina II tipo 2
ATP – Trifosfato de Adenosina
Bax – Proteína X associada a bcl-2
BDs – *Birth Defects*/ Defeitos do nascimento
BNP – Peptídeo natriurético do tipo B ou cerebral
C57Bl/6 – Camundongo isogênico C57 *Black Six*
C₇H₅O₃NS – Imida o-sulfobenzóica/ Sacarina sódica
Cabin1 – Gene da proteína 1 de ligação à Calcineurina
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
Chp2 – Gene da proteína 2 semelhante à calcineurina B
CID10 – Classificação Internacional de Doenças 10
CNP – Peptídeo natriurético do tipo C
CO₂ – Dióxido de carbono
Col1a1 – Gene da cadeia α 1 do colágeno tipo I
Col3a1 – Gene da cadeia α 1 do colágeno tipo III
cPKC – Proteínas C quinases clássicas
Ct – *Cycle Thredshold*
CT – Coração total
CYP^{2E1} – Citocromo P450 isoforma IIE1
Cys – Aminoácido cisteína (Ácido (R) -2-amino-3-sulfanil-propanoico)

DASIS – Diretoria de Apoio Administrativo ao Sistema de Saúde do Brasil
DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DEPC – Dietilpirocarbonato
dL – decilitro(s)
DMA – Diacilglicerol
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNase – Desoxirribonuclease
DNP – Peptídeo natriurético *Dendroaspis*
dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
E-C – Acoplamento de contração por excitação
Edn1 – Gene da endotelina 1
EPM – Erro padrão da média
EROs – Espécies reativas de oxigênio
Et al. – *et alii*
EtOH – Álcool etílico/ Etanol
FAS – *Fetal Alcohol Syndrome*/ Síndrome Alcoólica Fetal
FASD – *Fetal Alcohol Spectrum Disorders* / Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal
g – grama(s)
g/ cm – grama(s) por centímetro
g/ dia – grama(s) por dia
GABA_A – Receptor do ácido gama-aminobutírico
Ggd – Ganho de peso gestacional diário
Ggt – Ganho de peso gestacional total
GH – *Human Growth Hormone*/ Hormônio do crescimento
H⁺ – Hidrogênio
H₂O₂ – Hidróxido de hidrogênio/ Água Oxigenada
h/dia – hora(s) por dia
HCl – Ácido clorídrico
Hcy – Aminoácido homocisteína (Ácido 2-amino-4-mercaptobutanoico)
I – Período de sensibilização
IC – Insuficiência cardíaca
i.g. – administração intragástrica
i.p. – administração intraperitoneal
i.v. – administração intravenosa
Igf-1 – Gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IM – Infarto do miocárdio
in útero – no útero
IOM – Instituto de Medicina dos Estados Unidos da América
L – litro(s)
Map3k2 – Gene da proteína quinase, quinase, quinase, 2 ativada por mitógeno
MAPK – Proteínas quinases ativas por mitógeno
MAT – Enzima metionina-adenosiltransferase
MEC – Matriz extracelular

MED – Média
MEOS – Sistema de enzimas microssomais oxidativas
Met – Aminoácido metionina (Ácido (S)-2-amino-4-(metilsulfanil)-butanoico)
 $MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio
MHC α – isoforma alfa da miosina
MHC β – isoforma beta da miosina
min – minuto(s)
miRNA – Micro ácido ribonucleico
ml – mililitro(s)
ml/ dia – mililitro(s) por dia
mg – miligrama(s)
mg/ mm – miligrama(s) por milímetro
MMP – Metaloproteinase(s) de matriz
Mmp9 – Gene da matriz metaloproteinase 9
 M_q – Mediana
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MS – Ministério da Saúde
Myh6 – Gene da cadeia pesada de miosina alfa
Myh7 – Gene da cadeia pesada de miosina beta
 NAD^+ – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina oxidada
NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida ou hidrogenada
 $NADP^+$ – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado
NCOP – Não classificados (as) em outras patologias
Nfatc3 – Gene do fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático, dependente de calcineurina 3
NF κ - β - Factor nuclear kappa B
ng – nanograma(s)
ng/ μ L – nanograma(s) por microlitro
nm – nanômetro(s)
NOX – NADPH oxidase
Nppa – Gene do peptídeo Natriurético A
Nppb – Gene do peptídeo Natriurético B
 O_2 – Oxigênio
OMICs – Expressão genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica
OMS – Organização Mundial de Saúde
P/C – peso dividido por comprimento corporal
P.A. – *pro analyse* (Para análise/ reagente com alto grau de pureza)
PA – pressão arterial
P.A.E. – Exposição pré-natal ao álcool
PAM – Pressão arterial média
PCG-1 α – coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PCR – Reação em cadeia da polimerase

pFAS – *partial Fetal Alcohol Syndrome*/ Síndrome Alcoólica Fetal parcial
PG – Período gestacional
pH – Potencial Hidrogeniônico
PKC – Proteína C quinase
PKC- α – Proteína C quinase alfa
PKC- β – Proteína C quinase beta
PKC β 1 – Proteína C quinase beta 1
PKC- γ – Proteína C quinase gamma
PN – Período pós-natal
Prkca – Gene da proteína quinase C alfa
Prkcb – Gene da proteína quinase C beta
Prkcg – Gene da proteína quinase C gamma
qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RCIU – Restrição de crescimento intrauterino
REL – Retículo endoplasmático liso
RNA – Ácido ribonucleico
RNase – Ribonuclease
ROX - Fluoróforo de referência passiva
rpm – Rotações por minuto
rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico
RTqPCR – Reação de transcriptase reversa por PCR em tempo real
Sac – Sacarina Sódica (Imida o-sulfobenzóica)
seg. – segundos
SIDS – Síndrome da morte súbita do lactente
SINASC – Sistema de Informação de Nascidos Vivos do Brasil
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
SOD-1 – Enzima superóxido dismutase
SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SSIV *Buffer* – solução tampão *SuperScript™ IV*
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil
Tgfb-1 – Gene do fator de crescimento transformador beta 1
Tris – *2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol*
Tris-HCl – Solução tampão
tRNA – Ácido ribonucleico transportador
u.a. – Unidades arbitrárias
UCP-2 – Proteína desacopladora 2
v/v – Relação de volume entre soluto e solvente
VB – Volume sanguíneo
VD – Ventrículo direito
VE – Ventrículo esquerdo
VTS – Via de Transdução de Sinais
xg – Força g (9,806 65 m/s²)
WHO – World Health Organization

1. Contextualização

O álcool etílico ou etanol (EtOH), é uma substância orgânica de fórmula química C_2H_6O (CH_3CH_2OH), obtida através do processo de fermentação de açúcares derivados de frutas ou sementes pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Possuindo densidade absoluta, numa pureza aproximada de 99,5% e temperatura de 20 °C e, em comparação à água, de 0,790 g, pode ser considerada a mais antiga droga recreativa utilizada pelo homem [1-3].

Dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2018 referentes ao ano de 2016, estimaram que 43% da população mundial com idade igual ou acima de 15 anos tenham consumido álcool nos últimos 12 meses (consumidores ou bebedores atuais), totalizando um consumo médio *per capita* de 6,4 L de álcool puro (**Figura 1**). No Brasil, o consumo *per capita* foi de 7,8 L e representou 40% da população, ainda que abaixo da média americana (8 L), superou a média global [4,5]. Além disso, segundo DATASUS, houve aumento no uso abusivo de álcool por mulheres entre os anos de 2006 e 2018, subindo de 7,7% para 11% [6]. O uso prolongado (crônico) ou episódico (agudo) de álcool afeta diversos sistemas corpóreos, contribuindo para o desenvolvimento de patologias graves como, doença hepática, cardiomiopatias e pancreatite [7], evidenciando um grave problema de saúde pública.

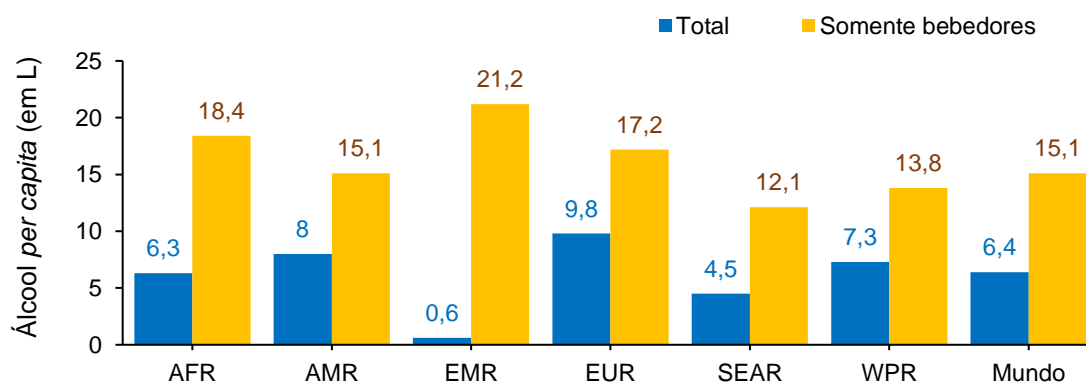


Figura 1. Consumo total de álcool *per capita* (APC) por região WHO (mais de 15 anos; em litros de álcool puro), 2016. Adaptado [4].
AFR – África; AMR – Américas; EMR – Mediterrâneo oriental; EUR – Europa; SEAR – Sudeste asiático; WPR – Pacífico ocidental.

Deve-se levar em consideração que os efeitos da exposição ao álcool ocorrem diferentemente em cada indivíduo, por serem dependentes da interação com fatores ambientais e genéticos, principalmente quando estão relacionados à gestante [8-10]. Além disso, é importante considerar que o sistema digestivo humano é capaz de produzir diariamente cerca de 3 g de etanol pela fermentação e, estudos recentes relacionam essa produção ao metabolismo de gorduras e açúcares pelas bactérias da flora intestinal [3].

Como o etanol é uma molécula hidrossolúvel e lipossolúvel que apresenta baixo peso molecular, possui absorção facilitada no estômago e intestino delgado. O estômago, é responsável pela absorção rápida de até 20% do volume ingerido, exceto na presença de alimentos, que pode reduzir esta absorção [3,11,12]. Já o intestino delgado pode absorver, de forma imediata e completa, independente da presença ou ausência de alimentos, até 80% do volume ingerido de etanol, fazendo deste o principal órgão de absorção do álcool. Após sua absorção, cerca de 90% do álcool vai para o fígado através da circulação, onde será metabolizado, podendo ocorrer por duas vias, oxidativa e não oxidativa (pouco ativada), o restante é eliminado pelos pulmões (o que permite a realização de testes de alcoolemia - bafômetro), pelo suor e pela urina [2,13,14].

Na via oxidativa (**Figura 2**), principal via desse metabolismo, o álcool é oxidado em acetaldeído pela ação das Álcool Desidrogenases 2 (ADH) e consumo da forma oxidada do dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD^+), via fosforilação oxidativa [2,7,15]. Em altas concentrações de álcool no organismo, ou quando o consumo é crônico, essas enzimas (ADH) não são capazes de metabolizá-lo sozinhas, fazendo com que sejam ativadas duas vias alternativas. A primeira é o sistema de enzimas microsossomais oxidativas (MEOS) no retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos, que ativando principalmente o citocromo P450 IIE1 ($\text{CYP}^{2\text{E}1}$) converte o EtOH em acetaldeído utilizando moléculas de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado (NADPH) e O_2 com gasto de ATP (**Figura 2**) [2,12,16]. Outra via de metabolização é via das catalases nos peroxissomos, efetuando a conversão do álcool em acetaldeído utilizando moléculas de H_2O_2 endógenas [17].

Assim, o acetaldeído é convertido em acetato pela ação das aldeído desidrogenases (ALDH), nas mitocôndrias, permitindo a sua conversão em acetil-coenzima A (Acetil-CoA) por enzimas como a Acil-CoA sintetase, sendo enviado para diversas partes do corpo pela circulação, podendo ser utilizado como combustível pelas células ou como base para moléculas funcionais ao participar do ciclo de Krebs, resultando em dióxido de carbono (CO_2) e água [2,12].

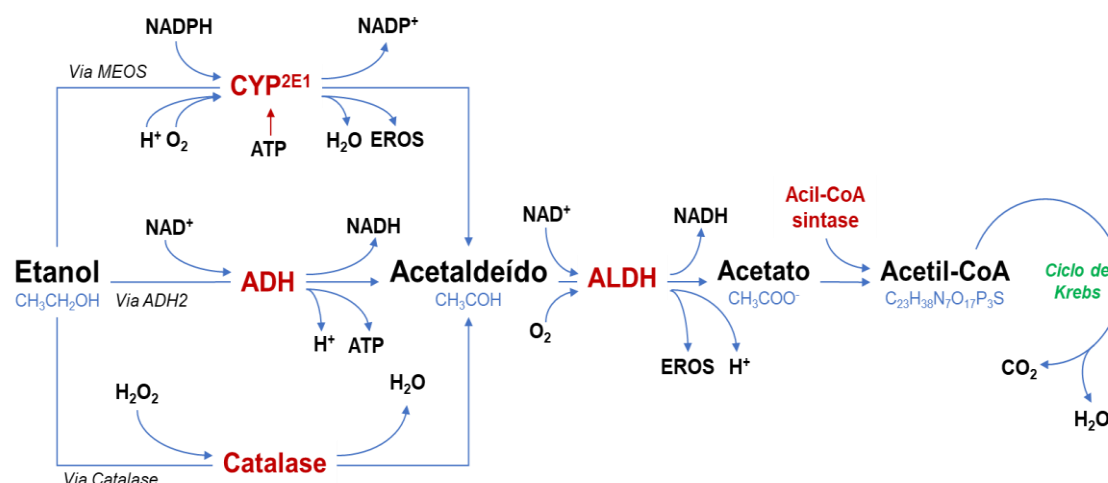


Figura 2. Esquema das 3 vias oxidativas do metabolismo alcoólico.

Via principal (ADH2) e as vias complementares ativadas pelo consumo crônico ou excessivo de etanol (via MEOS e catalase). MEOS – Sistema de enzimas microsossomais oxidativas; NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hydrogenado; NADP⁺ – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina; CYP2E1 – citocromo P450 isoforma IIE1; ATP – tri-fosfato de adenosina; EROS – Espécies reativas de oxigênio; ADH – álcool desidrogenase; NAD⁺ - dinucleotídeo de nicotinamida-adenina; NADH - dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hydrogenado; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; H₂O – hidróxido de hidrogênio; Acetil-CoA – Acetil coenzima A; H⁺ – hídon (cátion de hidrogênio); O₂ – Oxigênio; CO₂ – dióxido de carbono. (arquivo pessoal).

Qualquer uma dessas vias pode impedir o metabolismo de ácidos graxos e a síntese de proteínas, além de aumentar a peroxidação lipídica e a formação de EROs [2,12,16,17]. Outro aspecto a se considerar é que mulheres possuem uma produção menor de ALDH no estômago e no fígado, o que facilita o acúmulo de acetaldeído no organismo e aumenta o risco de comorbidades relacionadas ao consumo de álcool, principalmente durante a gestação, dado como o processo fisiológico mais importante do desenvolvimento humano [18-21]. No período embrionário, por exemplo, irão ocorrer eventos essenciais para este processo, pois as células podem sofrer modificações na forma, tamanho, posição, número e adesividade e, qualquer perturbação ocorrida durante essa

etapa (morfogênese), poderá induzir seu comportamento anormal (dismorfogênese), modificando o desenvolvimento fetal [19,22-24].

Deve-se considerar também que não é fácil padronizar a magnitude da exposição pré-natal ao álcool (P.A.E.), seu poder de interação ou doses seguras, por serem dependentes de fatores como tempo, nível de exposição e estado nutricional materno [8-10,23-26]. Além disso, cerca de 2% do EtOH consumido pela mãe durante o período de amamentação é transferido ao filho, percentual suficiente para prejudicar o desenvolvimento neuromotor, o sono e o aprendizado [27-31], fazendo deste, o principal agente teratogênico causador de defeitos congênitos evitáveis [10,32]. O álcool pode favorecer alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais, muitas vezes irreversíveis [32-34], por meio de morte celular, possivelmente pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a habilidade das células fetais de se protegerem com antioxidantes endógenos [10,22,27,35,36].

Outro aspecto importante é que outros estudos indicam que gestantes em condições sociais desfavoráveis são mais propensas ao consumo de substâncias teratogênicas, como drogas e álcool [20,21,37,38] e, mulheres com mais de 30 anos, possuem um risco maior de desenvolverem problemas gestacionais e fetais ao consumir álcool durante a gestação [39], aumentando ainda mais o risco de diversos tipos de defeitos do nascimento (BDs) [4,6,40,41].

Relatada como uma das principais causas de óbitos durante as primeiras quatro semanas de vida em recém-nascidos no mundo, os BDs totalizam cerca de 303 mil casos anuais [4,6,40,41]. No Brasil, são considerados como a segunda maior causa de mortalidade infantil (11,2%), e representam 37% de todas as internações pediátricas [4,6,42-44]. Além disso, estudos recentes mostraram que as anomalias cardíacas ou do sistema circulatório foram as principais responsáveis por tais óbitos no Brasil [43,45], apresentando, segundo o DATASUS [44] 19.386 casos, no período de 2008 a 2017 (**Tabela 1**).

Contudo, é possível estimar que uma alta parcela desses casos, mesmo que não relatados, podem estar relacionadas ao consumo de álcool. Ainda assim, o consumo considerado “baixo a moderado” entre gestantes aumenta

consideravelmente a cada ano, sendo a estimativa mundial da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano de 2017 de 9,8% das gestantes [4,46] consumindo álcool. No Brasil, diversos estudos recentes tentaram mensurar esse consumo, apresentando estimativas que variam de 10 a 40% das gestantes participantes [27,47-51].

Tabela 1 quantidade de nascimentos por categoria de anomalias no Brasil de 2008 – 2017.

<i>Categoria de anomalia</i>	<i>Nascimentos</i>		
	2008-2012	2013-2017	2008-2017
Espinha bífida	2.568	3.265	5.833
Outras malformações congênicas do sistema nervoso	9.748	13.592	23.340
Malformações congênicas do aparelho circulatório	7.261	12.125	19.386
Fenda labial e fenda palatina	7.364	7.780	15.144
Ausência, atresia e estenose do intestino delgado	220	258	478
Outras malformações congênicas aparelho digestivo	4.571	5.238	9.809
Testículo não-descido	1.459	2.112	3.571
Outras malformações do aparelho geniturinário	8.642	9.325	17.967
Deformidades congênicas do quadril	508	811	1.319
Deformidades congênicas dos pés	14.415	13.516	27.931
Outr. Malform. e deform. congênit. aparelho osteomusc.	30.072	31.637	61.709
Outras malformações congênicas	13.561	15.932	29.493
Anomalias cromossômicas NCOP	5.564	4.990	10.554
Hemangioma e linfangioma	507	472	979
Sem anomalia congênita/não informado	1.407	190	1.597
TOTAL	107.879	12.1243	229.122

Fonte: [44] MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC 10/2019. NCOP – Não classificados (as) em outras patologia – Classificação CID10.

Entretanto, torna-se consenso que tais estimativas podem ser maiores do que a realidade, devido ao fato das gestantes apresentarem dificuldades em relatar com exatidão o uso, que pode estar relacionado ao consumo de outras drogas ou doenças psiquiátricas ou, simplesmente, pelo estigma social [4,6,46,50,51-53].

1.1. Consumo de álcool durante a gestação e o desenvolvimento de Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal

Dentre as alterações causadas pela exposição pré-natal ao álcool (P.A.E.), como a síndrome de abstinência neonatal, epilepsia, autismo, entre outras [20,50,55-57], pode-se concluir que os Transtornos do Espectro Alcoólico

Fetal (FASD) sejam os mais preocupantes para a saúde pública mundial, pois quando não fatais (abortos espontâneos e Síndrome da morte súbita do lactente - SIDS), demandam cuidados médicos por toda a vida do indivíduo [10,35,39,55,56,58].

Estas alterações foram relatadas pela primeira vez em 1834, em estudo que relacionava o álcool às deformações e distúrbios psicológicos apresentados por filhos de mulheres alcoólatras [59]. Em 1900, outro estudo evidenciou aumento de abortos e de natimortos em gestantes que beberam álcool [60,61].

Porém, apenas em 1968, na Romênia, ocorreu o primeiro estudo científico relacionando o consumo do etanol a essas alterações, por meio da observação de porcos e galinhas expostas ao etanol na gestação [60,61]. Em 1973, Jones & Smith [60], publicaram um relatório descrevendo alterações morfológicas através da observação de dois recém-nascidos e um bebê de 7 meses de vida, denominando-as como “Síndrome Alcoólica Fetal” (FAS).

Mesmo com o avanço das pesquisas e dos modelos experimentais, essas alterações somente foram melhor estudadas, categorizadas e denominadas como Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (FASD - *Fetal Alcohol Spectrum Disorders*) no ano de 1996 pelo Instituto de Medicina (IOM), com variações de leves a graves e classificados em: *Fetal Alcohol Syndrome* (FAS), considerada como a forma mais grave, e *partial Fetal Alcohol Syndrome* (pFAS) [10].

Estudos apontam que sua prevalência varia de 0,5 a 7,73 casos por 1.000 nascidos vivos numa população normal (**Figura 3**), podendo chegar a até 9,8 em grupos de risco [4,57,62-65]. Além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) a prevalência de FASDs (incluindo FAS) é maior nas divisões regionais Europa (160,8) e Américas (71,3) a cada 10.000 habitantes (**Figura 3**) [4]. No Brasil, correspondem ao surgimento de 1.500 a 3.000 novos casos anuais ou a ocorrência de 1 a cada 1.500 nascimentos [6,27,36,66], estimativas que ultrapassam outros BDs como Síndrome de Down e espinha bífida (**Tabela 1**) [44,67].

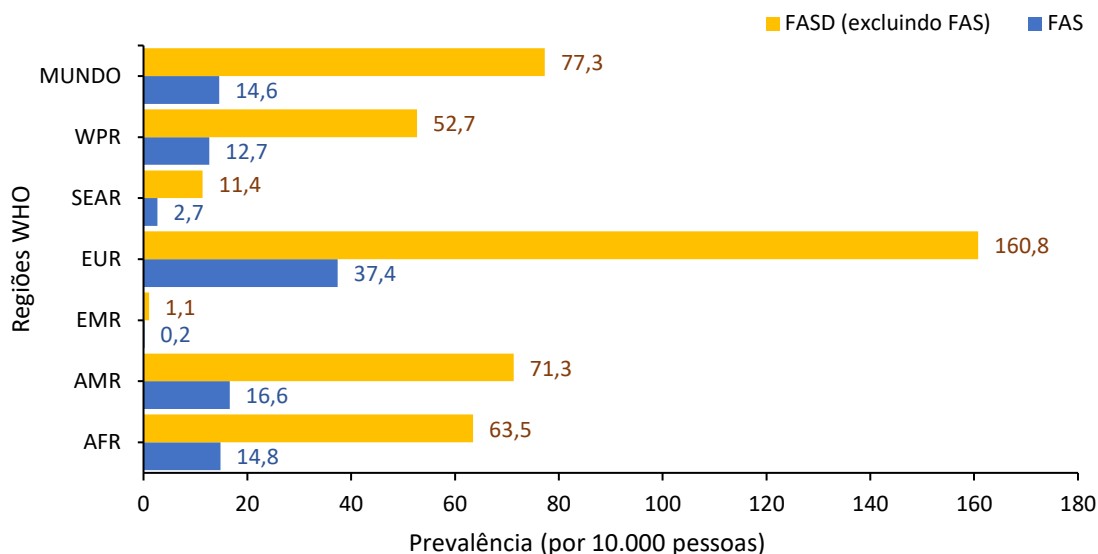


Figura 3. Prevalência de FAS e FASD na população mundial por regiões administrativas WHO. FAS – Síndrome Alcoólica Fetal; FASD - Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal; AFR – África; AMR – Américas; EMR – Mediterrâneo oriental; EUR – Europa; SEAR – Sudeste asiático; WPR – Pacífico ocidental. (Adaptado) [4].

As alterações físicas (ptose palpebral, hemiface achatada, hirsutismo, lábio superior fino, restrição de crescimento intrauterino - RCIU, baixo peso ao nascer, distúrbios de crescimento e peso) e comportamentais (dificuldade de controle de impulsos, agressividade, dificuldade de memória e julgamento, de raciocínio e linguagem) decorrentes da FASD, constituem seu diagnóstico e, já foram amplamente identificadas pela literatura [22,33-36,54-57,60,61,68-72].

Além dessas, é comum ocorrer microcefalia, agenesia do corpo caloso, anomalias renais e defeitos cardíacos. No entanto, os mecanismos genéticos e epigenéticos específicos por trás das anormalidades e, os mecanismos que levam o organismo ao aborto espontâneo desses fetos, mediados pelo álcool permanecem desconhecidos [9,23,24,34,72-76].

Contudo, a maioria dos indivíduos afetados pela P.A.E. não apresentam dismorfologias características da FASD, apresentando somente alterações celulares ou relacionadas à produção de substâncias endógenas, exigindo para diagnóstico a confirmação do consumo materno na gravidez, assim constituindo um desafio ao diagnóstico da FASD [32,36,64,77-80].

1.2. Gestação Murina

Diversos modelos animais podem ser utilizados para o estudo da exposição fetal ao álcool como, drosófilas, sapos, vermes e peixes [81]. O Zebrafish, por exemplo, possui sua “gestação” fora do organismo materno, com desenvolvimento larval que permite a observação das mudanças ocasionadas pela exposição ao álcool devido a sua menor opacidade corporal [57,82]. Contudo, com a importância da amamentação nessa exposição, os modelos mamíferos são mais amplamente utilizados, principalmente os roedores.

Entretanto, nem todos os roedores consomem álcool espontaneamente, fazendo do camundongo isogênico C57Bl/6 o modelo mais indicado para esses estudos, por ser mais suscetível ao consumo de álcool, principalmente quando administrado com a adição de sacarina, tornando-o mais palatável [10,73,83]. Deve-se considerar também, que a utilização de camundongos para esse modelo é uma alternativa viável, pela facilidade de manuseio, baixo custo e disponibilidade de dados científicos e reagentes [7].

Outra particularidade importante é que as camundongos fêmeas atingem sua maturidade sexual de 40 a 80 dias após seu nascimento e, caso haja fecundação, o corpo lúteo se desenvolve (metaestro) para o processo de gestação, que varia de 19 a 21 dias. Caso não haja fecundação, ao contrário de muitas espécies de mamíferos, o corpo lúteo não será expelido, mas será regenerado (diestro) para o próximo ciclo reprodutivo [84-86] permitindo a obtenção de proles com maior facilidade. Entretanto, esse ciclo pode ser afetado pelas condições de manejo do animal, ocorrendo o anestro (ausência de ciclo estral), quando estas são alojadas em grupos maiores que 3 animais por gaiola ou em períodos de luz superiores a 12 h/dia [84,86].

Após o início da gestação (5  dia), ocorre a implantação dos embriões no endométrio, devido a formação de células deciduais e do 6  ao 8  dias essa implantação se estende para a região mesometrial do útero, ocorrendo remodelamento da matriz extracelular (MEC) do endométrio e vários processos denominados decidualização, que permitirão ao útero, através da modificação de células fibrosas, estocar energia para o desenvolvimento do zigoto. Nesse

período também são formadas duas estruturas, a decídua antimesometrial, que será involuída do 9º ao 14º e a decídua mesometrial, região materna da placenta que permanecerá até o final da gestação e terá como funções principais, o suporte estrutural e nutricional, funcionar como glândula endócrina provisória, fornecendo hormônios e fatores de crescimento e modular o sistema imune materno, sendo construída do 6º ao 8º dia de gestação [87,88].

Esses eventos permitirão a construção da placenta, que em camundongos é hemocorial, como em humanos, e ocorre pela modificação de células do blastócito do embrião e da decídua mesometrial, estando completa no 13º dia de gestação. Após o processo de implantação inicia-se o período embrionário que será completado somente no 10º dia após o nascimento dos filhotes. Esse tipo de processo gestacional, mesmo que em menor tempo, pode ser comparado ao da gestação humana [10,36,54,81] permitindo mensurar o efeito da P.A.E. em humanos (**Figura 4**).

O primeiro trimestre humano equivale no camundongo ao período gestacional ocorrente nos dias 0 a 10. Inicia no momento da concepção e inclui o período pré-implantação, período de implantação, gastrulação e o início da neurulação [84-86], como descritos acima e é nesse momento, por exemplo, que ocorre a formação do coração, tanto em humanos (a partir do 18º dia), como em camundongos (a partir do 6º dia) [70].

O segundo trimestre humano equivale aos dias gestacionais 11 a 20, iniciando-se durante a neurulação, incluindo a organogênese e terminando no nascimento, que ocorre entre os dias 19 a 21 na gestação de camundongos. Já o terceiro trimestre, é considerado o período correspondente do nascimento ao 10º dia (meses 7 a 9 em humanos) e inclui eventos como, o amadurecimento dos pulmões [10,81].

Esse potencial de comparação permitiu a construção de estudos, que classificaram, muitas vezes em horas, o momento da formação de determinada estrutura, facilitando a criação de protocolos que estudam alterações específicas nos fetos ou em um órgão isolado, como coração, rins, fígado e cérebro durante

sua formação, bem como as causadas pela ingestão de álcool nesse período (Figura 4).

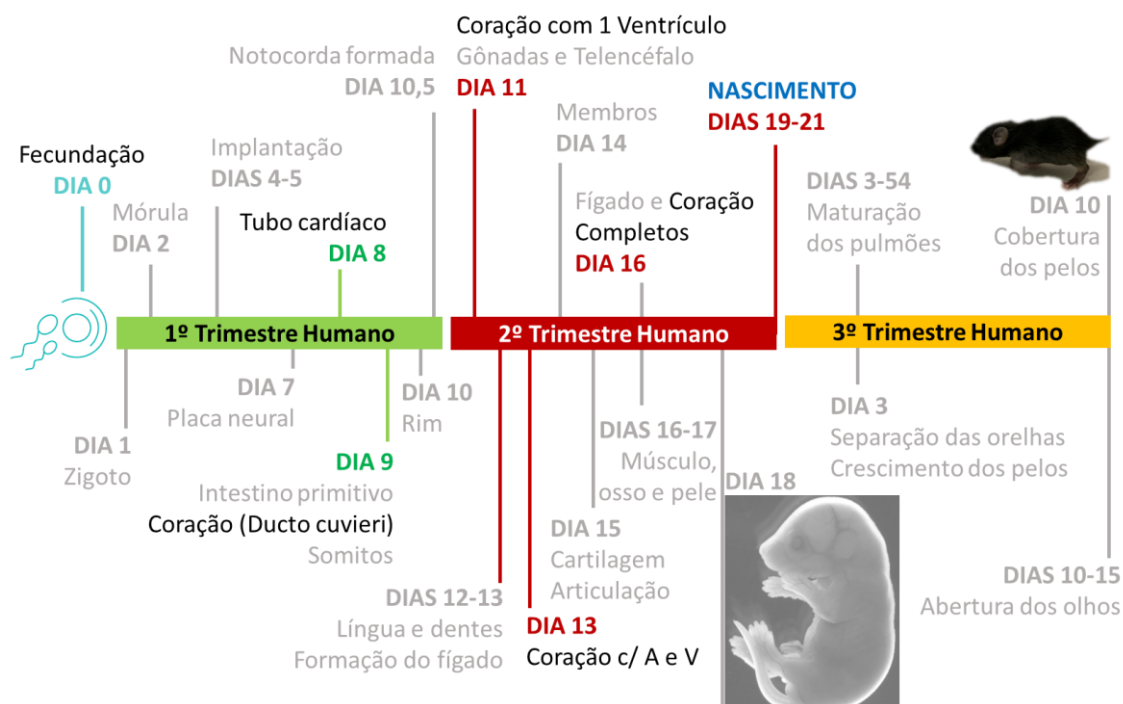


Figura 4. Gestação murina *versus* humana.

Linha do tempo evidenciando alguns dos eventos embrionários na gestação murina relacionando-os com a gestação humana a partir das informações encontradas nas literaturas. [7,9,10,17,22-24,29,31-34,38,47,52,56,60,61,68,70,73-77,81,85,89,90-101] (Arquivo pessoal).

1.3. Alterações cardíacas e exposição pré-natal ao álcool

As alterações cardíacas mediadas pela exposição pré-natal ao álcool podem ser divididas em diretas, causadas na estrutura e formação das células cardíacas (cardiomiócitos) e indiretas, relacionadas aos mecanismos e substâncias que atuam no funcionamento do sistema cardiovascular.

As cardiopatias congênitas, por exemplo, ocorrem em 50% dos indivíduos nascidos com FAS e em 38% dos nascidos com FASD, variando entre defeitos do septo atrial ou ventricular, malformação aórtica e valvares, baixo peso cardíaco e atrofia [4,70,92,102], que contribuem para quadros severos durante a vida do indivíduo, inclusive levando-o a óbito. Outros dados sugerem que 80% das crianças nascidas com FASD não apresentam sintomas físicos aparentes, dificultando o diagnóstico de cardiopatias sutis [103].

O álcool pode interferir no processo de acoplamento de contração por excitação (E-C), agindo nos níveis de cálcio no citosol das células contráteis,

além de reduzir sua sensibilidade ao cátion [7]. A falha nesse mecanismo pode levar o coração a episódios de hipóxia e isquemia, resultando em defeitos cardíacos e abortos em fetos. Isso se repete na cardiopatia alcoólica (cardiomiopatia dilatada), uma doença degenerativa do miocárdio caracterizada pelo débito cardíaco deprimido, ou seja, a capacidade reduzida de bombeamento sanguíneo ocasionado pela redução na contração/dilatação das câmaras cardíacas [77].

Indiretamente o álcool pode agir em moléculas que modulam a função cardíaca, alterando sua composição, como no caso da epinefrina, dopamina e noradrenalina. No miocárdio é sabido que o álcool causa diminuição na síntese da proteína miofibrilar, impedindo sua função normal. Em ratos foi verificado diminuição na quantidade de miócitos e aumento do tamanho do ventrículo esquerdo [7]. Filhotes de camundongos expostos ao álcool durante a gestação apresentaram paredes ventriculares mais finas, defeitos valvares [97,99], além de pressão arterial elevada, resultante de uma função renal e vascular aumentadas [99-101,104].

Em outro estudo, Yuan *et al.* [105] mostraram que ocorre redução na expressão das proteínas SOD-1, UCP-2 e PCG-1 α , importantes para a funcionalidade dos cardiomiócitos, após exposição pré-natal ao álcool em camundongos quando submetidos à dieta hiperlipídica, permitindo inferir que a exposição gestacional ao álcool promove um ambiente rico em estresse oxidativo no coração desde seu desenvolvimento. Esse ambiente pode modificar o desenvolvimento do coração de outras formas.

Os fibroblastos, por exemplo, são sensíveis a estímulos nocivos [106] e são responsáveis pela produção MEC cardíaca, que está envolvida na fixação e organização dos cardiomiócitos [107-109] e, também, no controle da proliferação, migração e diferenciação celular [110]. Ao receber um estímulo nocivo, o fibroblasto modifica os componentes da MEC, como colágenos e fibronectina, que regulam o desenvolvimento dos cardiomiócitos. Estes por sua vez, se diferenciam em miofibroblastos, expressando actina do músculo liso α (Acta2) e aumentando a secreção de colágeno [111].

Ninh *et al.* [92], utilizando cultura de cardiomiócitos advindos de corações e os corações isolados de camundongos expostos ao álcool no período gestacional (6,75 a 7,25 dias), identificaram nesses cardiomiócitos a diminuição da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de Col1a1 e aumento do mRNA de Col3a1, bem como a diminuição da expressão proteica de Col1a1 e aumento de Col3a1 no tecido cardíaco.

Prioste *et al.* [112] verificaram que humano adultos expostos ao EtOH (aguardente de cana-de-açúcar) apresentaram alterações epigenéticas no ciclo metionina-homocisteína, por reduzir a absorção de folato devido à carência de vitamina B6, componente chave nesse ciclo. A metionina (Met) é um aminoácido essencial, convertida no organismo para S-adenosilmetionina (AdoMet) via metionina-adenosiltransferase (MAT), posteriormente hidrolisada em homocisteína (Hcy) e adenosina [119], ciclo fundamental na função celular normal, principalmente na síntese de proteínas [113-116].

Sprince *et al.* [117] demonstraram que a cisteína (Cys) diminui os efeitos da exposição de álcool em ratos, principalmente ao fígado, participando da cadeia do acetaldeído. Porém, quando há desequilíbrio na cadeia metionina-homocisteína, o aumento de homocisteína no organismo (hiper-homocisteinemia), se torna fator de risco para patologias cardiovasculares como, aterosclerose, derrame, trombose e lesões vasoclusivas, culminando em obstrução e rompimento dos vasos e consequente isquemia [115,118-120].

Entretanto, os estudos relacionados à FASD e doenças cardíacas se restringem ao período de desenvolvimento do coração e pouco se sabe como este coração responderia a uma cardiopatia na vida adulta. É sabido que o desenvolvimento do coração inicia entre o sexto e sétimo dia de gestação com a diferenciação e migração de células progenitoras e, que a exposição ao álcool nesse período é crucial para as modificações genéticas e estruturais [92].

Turcotte *et al.*, em 2002 verificaram após exposição pré-natal crônica ao álcool no período gestacional (6,36% v/v) elevação na pressão arterial média (PAM) e diminuição do relaxamento dependente do endotélio aórtico na prole de ratos às 25 semanas de idade [104]. Um estudo semelhante (6% v/v álcool)

mostrou evidências de hipertrofia ventricular esquerda e fibrose cardíaca em filhotes de ratos de ambos os sexos aos 8 meses de idade [121].

Walton *et al.* [122] relataram que a exposição baixo-crônica ao EtOH durante a gravidez está associada à pressão arterial reduzida e a uma resposta pressora atenuada ao estresse em fêmeas, mas não em machos, após 12 meses de vida (equivalente a meia idade humana) em ratos *Sprague-Dawley*, sugerindo um possível dimorfismo sexual e efeitos duradouros na saúde cardiovascular mediados pelo álcool.

1.4. Biomarcadores

O genoma é o armazenamento das informações biológicas de um indivíduo, mas sozinho é incapaz de liberar essas informações para a célula. Para que isso ocorra, é requerida a atividade coordenada de enzimas e outras proteínas, que participam de uma rede de complexas reações bioquímicas denominadas expressão do genoma. Com isso, surge o termo transcriptoma, para designar o conjunto de moléculas de RNA derivadas desses genes codificadores de proteínas, que permitirão levar essa informação a célula em um determinado momento, direcionando o proteoma, produto final da expressão genômica. Esse processo permitirá especificar as reações bioquímicas que cada célula será capaz de realizar [123-125].

Inicialmente, esse termo compreendia somente ao conjunto de moléculas de RNA, denominadas RNAs mensageiros (mRNAs), sintetizadas a partir do DNA desses genes e que participam como codificadores na síntese de proteínas. Após traduzidos esses ácidos ribonucleicos são degradados nos últimos estágios da expressão do genoma e correspondem a menos de 4% do RNA total de uma célula [124]. Com o avanço do entendimento desses processos, verificou-se a participação de outros conjuntos de RNAs não codificantes, como os transportadores (tRNAs) e os ribossômicos (rRNAs) [125-127].

Usando esses achados como ponto de partida, a ciência procura entender as estruturas moleculares das proteínas, as interações entre elas e com as demais moléculas biológicas (carboidratos, lipídios, DNA, etc.). Com esse

esforço, surge a busca por biomarcadores que auxiliem os pesquisadores a identificar processos deficientes ou incomuns dentro de uma via metabólica, gerando informações em forma de dados computacionais e demandando a constante melhoria das tecnologias e da informática [128,129].

Os biomarcadores ou marcadores biológicos são denominados como, características que podem ser medidas experimentalmente permitindo indicar a ocorrência de determinada função normal ou patológica em um organismo ou resultado de uma intervenção terapêutica [130]. Sua classificação já demonstra seu potencial para estimar estados de doença, compreender alterações ou mau funcionamento nos processos fisiológicos orientando pesquisas que visam o desenvolvimento de terapias, mais eficazes, com menor efeito colateral e não-invasivas. Com isso, a procura por novos biomarcadores, com o auxílio de diferentes tipos de dados “OMICS” (Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica) se tornou o principal objetivo das pesquisas translacionais [130].

Atingir esse objetivo somente é possível através da comparação de estados fisiológicos ou alterações ocasionadas por doenças [131], verificando diferenças que se refletem na atividade diferencial molecular do um gene ou na expressão de uma determinada proteína, bem como nos perfis metabólicos e seus padrões de sinalização. A partir disso, as espécies moleculares (genes, proteínas, SNPs, miRNAs etc.), que representem as mudanças mais significativas observadas podem ser definidas como "marcadores" potenciais de doença [131].

Esse processo gera uma grande quantidade de dados computacionais como, listas, equações e gráficos, necessitando de aplicações que permitam a integração preditiva da informação ou seja, a construção de modelos preditivos de doença ou de resposta terapêutica utilizando os dados quantitativos obtidos de diferentes fontes de dados, fazendo da bioinformática uma importante aliada [131,132].

Essas novas fontes de dados advindas das abordagens “omics” como, variação genética e expressão de mRNA, permitem a descoberta de biomarcadores cardiovasculares de formas menos sistemáticas e tendenciosas,

por incluir uma infinidade de assinaturas diagnósticas e/ou prognósticas usando dados de expressão gênica em larga escala para classificação de pacientes e de respostas terapêuticas [132].

1.5. Justificativa e relevância

A doença cardiovascular é a principal causa de óbito e incapacidade em todo o mundo. No entanto, muitos dos mecanismos etiológicos subjacentes permanecem pouco compreendidos. Vários estudos recentes demonstraram que grande parte das doenças cardiovasculares podem ter origem no início da vida, como resultado de adaptações feitas pelo feto em desenvolvimento em resposta a perturbações no útero [121,133].

A exposição prolongada a altas doses de álcool *in útero* pode ocasionar enrijecimento vascular [25] e alterações renais [77,134] além de perturbar o desenvolvimento do coração, levando a defeitos cardíacos congênitos [70,92,97,110,135]. Como o rim e a vasculatura em desenvolvimento, fundamentais na regulação da pressão arterial ao longo da vida, parecem particularmente suscetíveis a insultos *in útero* [92,142-144], a exposição pré-natal ao álcool, poderia elevar o risco de disfunção cardiovascular e hipertrofia na fase adulta.

Entretanto, estudos sobre o impacto de uma exposição baixo-moderada no sistema cardiovascular permanecem escassos, principalmente sobre os efeitos dessa exposição à nível celular e molecular, fazendo dos biomarcadores um aliado para o entendimento destes mecanismos.

Assim, a partir da análise da expressão de genes pertencentes às vias de transdução de sinais (VTS) relacionada à hipertrofia cardíaca, pretendeu-se verificar se uma exposição pré-natal, considerada baixa-moderada, seria suficiente para modificar essa expressão e auxiliar no entendimento das comorbidades cardíacas mediadas pela P.A.E.

2. Objetivos

2.1. Geral

Analisar o efeito da exposição pré-natal ao álcool na expressão de genes de biomarcadores relacionados à hipertrofia cardíaca em camundongos C57Bl/6.

2.2. Específicos

Verificar o peso do coração e do ventrículo esquerdo dos animais após exposição pré-natal ao álcool;

Verificar a expressão miocárdica de genes relacionados à hipertrofia cardíaca após exposição pré-natal ao álcool;

3. Método

3.1. Modelo animal e desenho do estudo

Para a obtenção da prole, objeto de estudo deste projeto, foram utilizados 20 camundongos isogênicos (15 fêmeas e 5 machos) da linhagem C57Bl/6. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa foram utilizados 10 camundongos fêmeas com 49 dias de vida e 18 (± 3) gramas e 3 machos com mesma idade e pesos de 20 (± 2) gramas. Na segunda etapa foram utilizados 5 camundongos fêmeas com 88 dias de vida e peso de 20 (± 2) gramas e 2 machos com mesma idade e peso de 23 (± 3) gramas.

Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Nove de Julho, Campus Vergueiro, e foram mantidos em mesmo local, confinados em caixas plásticas apropriadas com maravalha, ciclo de luz (ciclo claro/ escuro de 12h/12h) e temperatura (21 ± 2 °C) e umidade controlados, bem como alimentação e água *ad libitum* [73,90]. Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 8ª Ed., 2011)” contando com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/ UNINOVE) sob número CEUA nº 9355120319 (ID 000115) de 19/03/2019.

As fêmeas foram randomizadas em dois grupos: grupo Controle – CT (n = 4) e grupo de Exposição pré-natal ao álcool – P.A.E. (n = 11), enquanto os machos foram utilizados apenas como reprodutores, não se permitindo cruzamentos consanguíneos e, principalmente, cruzamentos entre machos utilizados no grupo controle com fêmeas do grupo P.A.E. e machos P.A.E. com fêmeas Controle. [136].

Os progenitores não foram utilizados para as demais análises, sendo eutanasiados após o desmame dos filhotes (PN30), por excesso de anestésicos, ou seja, doses 3 vezes maiores que a usada para anestesia (cetamina 300 mg/kg e xilazina 90 mg/kg). O descarte das carcaças foi realizado em sacos plásticos apropriados, armazenados em *freezer* e, posteriormente, encaminhados à empresa especializada [137].

3.1.1. Protocolo grupo Controle

As fêmeas do grupo Controle ($n = 4$), foram acondicionadas unitariamente em caixas plásticas com maravalha e com livre acesso à ração e água e tiveram seus pesos e consumos de água aferidos diariamente até o final do protocolo (PN30).

Antes do acasalamento deu-se o período de sensibilização, totalizando 15 dias (I1 a I15). Nesse intervalo, dos dias I1 a I7, cada fêmea teve acesso a 250 ml de água, trocados a cada dois dias. Do dia I8 a I15 houve a troca da água por solução composta de 250 ml de solução H₂O + 0,1% de sacarina sódica – P.A. (Sac) ($C_7H_5O_3NS \cdot 2H_2O$) (PolyStar, São Paulo, Lote: 18071801), novamente com troca realizada a cada dois dias (**Figura 5**).

Após o período de sensibilização, o macho foi colocado junto a fêmea para o período de cópula. Com a confirmação da gestação, por meio de análise de tampão vaginal, o macho foi retirado e iniciou-se a contagem do período de gestação. Durante o acasalamento, todo o período de gestação (PG1 a PG19-PG21) e até o 10º dia após o nascimento da prole (PN1 – PN10) cada fêmea recebeu a solução composta de 250 ml de H₂O + 0,1% de sacarina sódica. Do PN11 ao desmame (PN30), as fêmeas voltaram a receber somente água filtrada (**Figura 5**). Durante o acasalamento, o consumo da fêmea foi monitorado através da equação (“consumo total” - “média de consumo do macho durante os 15 dias”).

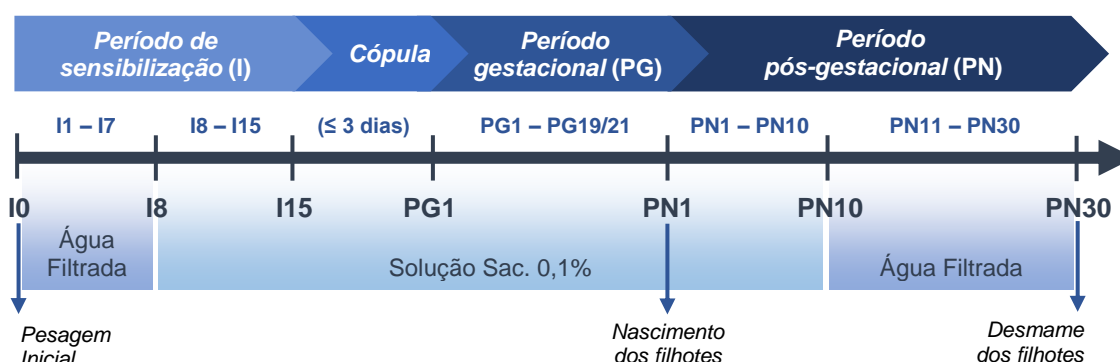


Figura 5. Protocolo grupo Controle.

I – período introdutório; PG – Período gestacional; PN – Período pós-gestacional. Observa-se a linha do tempo evidenciando o tipo de solução disponibilizada em cada etapa do protocolo. (arquivo pessoal).

A escolha pela sacarina sódica como edulcorante deu-se pela comprovação de que sua adição aumenta o consumo de água em roedores e, também, ao fato de que menos de 12% da quantidade ingerida é metabolizada pelo organismo sendo, o restante, excretada inalterada pela urina [10,73,83,138].

Além disso, não existem indícios de que a sacarina seja teratogênica em animais, permitindo evitar qualquer alteração nos marcadores analisados pela adição e consumo dessa substância [139,140]. Registre-se que a troca da solução a cada 2 dias deu-se para evitar o amargor decorrente da degradação da sacarina.

3.1.2. Protocolo grupo Etanol

De forma semelhante ao protocolo do grupo controle, as fêmeas do grupo Exposição pré-natal ao álcool – P.A.E. (n = 11) foram acondicionadas em caixas individuais e tiveram seus pesos e consumos mensurados diariamente durante todo o protocolo. A solução alcoólica utilizada neste grupo respeitou a seguinte equação: $H_2O + (X\% EtOH) + 0,1\% Sac. = 250\text{ ml}$, com concentração alcoólica aumentando gradualmente até a proporção final de 10% da solução total (2%, 5% e 10%) [90].

O processo de sensibilização (I1 a I15) ocorreu diferentemente do descrito no grupo Controle. Nos primeiros 4 dias (I1 a I4), cada fêmea recebeu 250 ml da solução de sacarina (250 ml H_2O + 0,1% Sac) com troca a cada dois dias. Em seguida foi iniciada a etapa de sensibilização alcoólica, aumentando-se gradualmente a porcentagem alcoólica da solução de sacarina.

Nos 2 dias seguintes, I5 e I6, cada fêmea recebeu 250 ml de solução a 2% de EtOH, nos dias I7 e I8, 250 ml de solução a 5% de EtOH e após esse período, sete dias (I9 a I15) de solução a 10% EtOH, preparadas no volume de 1000 ml com adição de 0,1% de Sac [90], de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2. Cálculo de diluição para obtenção de 1L da solução de EtOH em relação a porcentagem desejada.

Concentração Inicial (%)	Concentração final (%)	Volume de soluto (ml)	Volume de Solvente (ml)	Volume Final (ml)
99,5	2	20,1005	979,8995	1000
99,5	5	50,2513	949,7487	1000
99,5	10	100,5025	899,4975	1000

Observações: utilização de álcool etílico 99,5% (P.A.). 0,1% de sacarina sódica correspondeu a adição de 1g no volume final da solução, não sendo considerado para cálculo de diluição.

Após finalização do protocolo de sensibilização (solução de EtOH a 10%), o macho foi acondicionado com a fêmea para acasalamento, e retirado após a confirmação da gestação. Durante o período de cópula ambos compartilharam a solução alcoólica à 10% EtOH e o consumo da fêmea foi monitorado por meio da equação descrita no grupo Controle.

Do período Gestacional (PG1 – PG19/21) até o 10º dia após o nascimento da prole (PN10) cada fêmea recebeu a solução alcoólica na concentração 10% EtOH com troca realizada a cada dois dias.

A partir do dia PN11, iniciou-se o protocolo de dessensibilização alcoólica. Nesse dia, foi disponibilizado para cada fêmea 250 ml de solução a 5% de EtOH, no dia PN13, houve redução para solução a 2% de EtOH e, do dia PN15 a PN21, receberam a solução sacarina (H₂O + 0,1% Sac.), sempre com troca a cada dois dias. Finalmente, do dia PN22 até o desmame (PN30) as fêmeas receberam somente água filtrada [73,90].

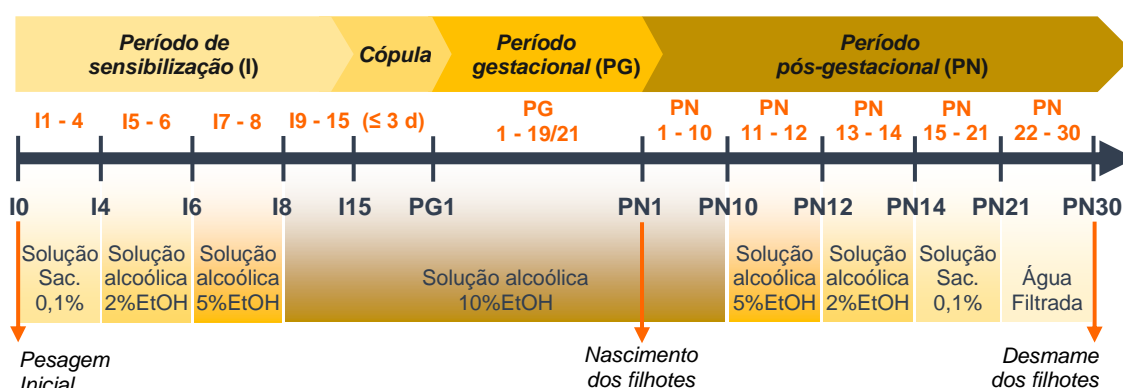


Figura 6. Protocolo grupo Exposição pré-natal ao álcool (P.A.E.).

I – período introdutório; PG – Período gestacional; PN – Período pós-gestacional. Observa-se a linha do tempo evidenciando o tipo de solução disponibilizada em cada etapa do protocolo. (arquivo pessoal)

O modelo de administração de álcool por meio de água potável ao invés da canulação ou injeção gástrica oferece diversas vantagens, como redução de estresse para gestantes e filhotes [9,73,83]. Além disso, a adoção do protocolo de sensibilização evita a ocorrência do consumo excessivo e consequente desnutrição materna, devido a inserção direta da solução e permite a construção da média de consumo diário de cada fêmea [90].

Após o parto da prole, o processo de dessensibilização alcoólica, obtida através da diminuição gradual nas concentrações de etanol na solução de sacarina evita a exibição de sinais de abstinência de etanol na mãe e elimina a necessidade de criação cruzada dos filhotes [90].

3.2. Ganho de peso gestacional

Para determinar se houve ganho de peso gestacional pelo consumo pré-natal de álcool e se este estaria relacionado à alguma alteração do desenvolvimento da prole, efetuamos o acompanhamento diário de peso nas fêmeas progenitoras desde o período de sensibilização. Caso a adição de etanol a dieta líquida refletisse em alguma alteração de peso durante o período pré-gestacional, quaisquer flutuações durante o período gestacional seriam desconsideradas.

O ganho de peso gestacional foi observado através da aferição diária do peso em cada fêmea e foi dividido em ganho de peso gestacional total (Ggt) e ganho de peso gestacional diário (Ggd), respeitando as seguintes equações:

$$\text{Ggt: } \text{Peso gestacional final} - \text{Peso gestacional inicial} = X \text{ g}$$

$$\text{Ggd: } \frac{\text{Peso gestacional final} - \text{Peso gestacional inicial}}{X \text{ Dias de gestação}} = X \text{ g/ dia}$$

3.3. Coleta dos materiais biológicos

Após o desmame, os filhotes foram acondicionados em caixas, separados por gênero, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*. Trinta dias após o desmame (PN60), os filhotes de ambos os grupos foram anestesiados com Isoflurano por inalação (<20 seg.) e decapitados [58] (**Figura 7**). Esse método de eutanásia se fez necessário em função das demais técnicas

induzirem aumento de estresse oxidativo pela ação de anestésicos administrados por vias, intravenosa (i.v.), intragástrica (i.g.) ou intraperitoneal (i.p.), por exemplo [141-143].

Os corações excisados foram brevemente lavados em solução fisiológica, para retirada do excesso de sangue, e pesados. Em seguida, o ventrículo direito (VD) e os átrios esquerdo (AE) e direito (AD), foram extraídos e descartados. Prontamente, cada ventrículo esquerdo (VE) foi acondicionado em frasco tipo *Eppendorf* de 1,5 ml, pesado novamente e imerso em nitrogênio líquido, para congelamento e, armazenados a -80 °C até o momento das análises (**Figura 7**).

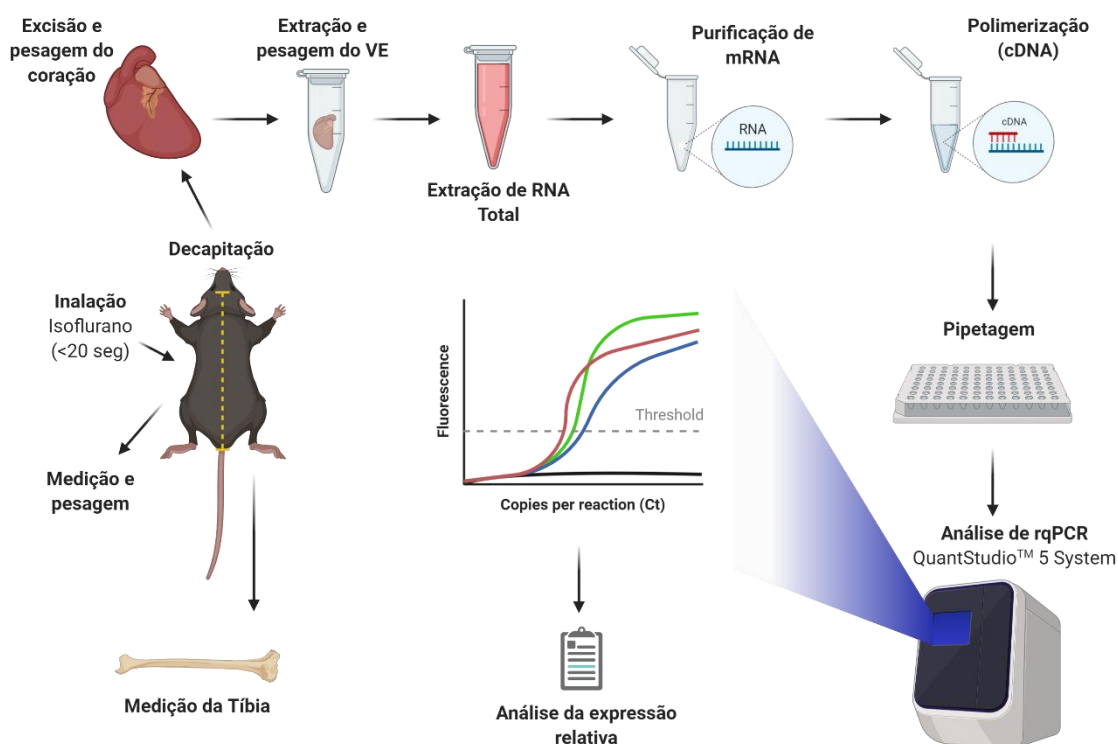


Figura 7. Protocolo de coleta e tratamento das amostras em ambos os grupos (arquivo pessoal).

3.3.1. Análise do peso ventricular e cardíaco

Os pesos ventricular e cardíaco foram calculados pelo coeficiente entre o peso do tecido e comprimento da tibia (CT/Tíbia e VE/Tíbia). Após a retirada das amostras de VE, as carcaças foram identificadas e separadas. Em seguida, a tibia esquerda de cada animal foi exposta e seu tamanho aferido com o paquímetro, tomando como referência o maléolo e o côndilo mediais (**Figura 7**).

Em seguida, foi calculada a relação entre o peso do coração e do ventrículo esquerdo, em miligramas, e o comprimento da tíbia esquerda, em milímetros. Os resultados foram divididos por sexo, dada a diferença entre as estruturas corporais de machos e fêmeas. Este método torna-se eficaz pois, as flutuações no peso corporal que ocorrem com o envelhecimento, o tornam uma referência não confiável para normalizar o peso do coração e do ventrículo [144].

3.2.2. Expressão gênica – Biomarcadores

Um total de 20 genes, previamente selecionados de acordo com sua participação nas vias de transdução de sinais (VTS) relacionadas à hipertrofia cardíaca, em trabalho de nosso grupo de pesquisa [145], foram utilizados como referência (**Tabela 3**).

Tabela 3. Genes selecionados para análises moleculares da VTS de Hipertrofia (Custom TaqMan® Array Plates)

Nº	Código	Nome do Gene
g1	Ace	Enzima conversora de Angiotensina
g2	Ace2	Enzima conversora de Angiotensina 2
g3	Agtr1a	Receptor de Angiotensina II tipo 1a
g4	Cabin1	Proteína 1 de ligação à Calcineurina
g5	Chp2	Proteína 2 semelhante à Calcineurina B
g6	Col1a1	Cadeia α 1 do colágeno tipo I
g7	Col3a1	Cadeia α 1 do colágeno tipo III
g8	Edn-1	Endotelina 1
g9	Igf-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
g10	Map3k2	Proteína Quinase, Quinase, Quinase, 2 ativada por Mitogênio
g11	Mmp9	Matriz Metaloproteinase 9
g12	Myh6	Cadeia pesada de miosina α
g13	Myh7	Cadeia pesada de miosina β
g14	Nfatc3	Fator nuclear de células T, citoplasmático, dependente de Calcineurina 3
g15	Nppa	Peptídeo Natriurético A
g16	Nppb	Peptídeo Natriurético B
g17	Prkca	Proteína Quinase C α
g18	Prkcb	Proteína Quinase C β
g19	Prkcg	Proteína Quinase C γ
g20	Tgfb-1	Fator de crescimento transformador beta 1

3.2.3. Expressão gênica – Procedimentos – PCR “Array”

Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real combinada com “array”, que permite quantificar a expressão de múltiplos genes simultaneamente (*Custom TaqMan® Array Plates – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*). Ao se comparar tal técnica com o PCR em tempo real (qPCR) convencional, verifica-se a possibilidade de determinação simultânea, em larga escala, da expressão gênica, diminuindo o custo do estudo e o tempo com a experimentação, permitindo também, a customização das placas de acordo com os genes selecionados pelo pesquisador.

a. Extração do DNA

As amostras de ventrículo esquerdo (VE) de ambos os grupos, pesando 95,46 mg ($\pm 0,78$), foram homogeneizadas em 1 ml de Trizol[®] Reagent (*Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*) à 15 °C e incubados por 5 min. em temperatura ambiente para a dissociação completa dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio refrigerado aos homogenatos, agitados em vórtex por 15 seg. e incubados em temperatura ambiente por 10 min. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 min. (12000 xg a 4 °C).

A fase aquosa resultante de cada amostra foi retirada e transferida para tubos *Eppendorf* de 1,5 ml estéril, adicionados 500 µL de isopropanol refrigerado, para a precipitação do RNA, mantidas em temperatura ambiente por 10 min, e novamente centrifugadas (12000 xg/ 4 °C/ 10 min.). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de RNA lavados com 1 ml de etanol 75% refrigerado (preparado com água tratada com Dietilpirocabonato – DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (7500 xg/ 4 °C/ 5 min.) e o sobrenadante descartado. Por fim, os *pellets* secaram ao ar livre, foram ressuspensos com 15 µL de água *DNase I/ RNase Free – (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)* e armazenados a -80 °C até a realização da Transcrição Reversa.

b. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras

As quantificações de RNA total foram obtidas utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop ND-2000* (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*), sendo que 1U A260 corresponde a 40 µg de RNA/ mL. Foram utilizadas apenas amostras livres de contaminantes ($A_{260}/A_{230} \sim 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1 µg de RNA total (8 µL) foi incubado com 1 unidade (1 µL) de *DNase I/RNase Free* – (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), na presença 1 µL de solução composta de 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM $MgCl_2$ por 15 min. a 37 °C, seguido de incubação a 65 °C durante 10 minutos para inativação da DNase I.

Após o tratamento acima descrito, as amostras foram normalizadas para 2.000 ng/ µL, utilizando-se como solvente *DNase I/RNase Free* – (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), e armazenadas a -20 °C até o início da reação de transcrição reversa (RTqPCR), para síntese do cDNA.

c. Síntese de cDNA – Transcrição reversa

Nesse processo foi utilizado o Kit *SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Inicialmente, 10 µL de RNA de cada amostra foi transferido para *Eppendorf* de 100 µL e adicionada a esta 3 µL de solução contendo, 1 µL de 50 µM *Oligo d(T)₂₀ Primer*, 1 µL 10 mM *dNTP mix* e 1 µL de *DNase I/ RNase Free* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*).

Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador por 5 min a 65 °C, incubadas em gelo por 1 minuto e, adicionados 7 µL de solução contendo, 1 µL de *Ribonuclease Inhibitor*, 1 µL de *SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (200 U/ µL), 1 µL 100 mM DTT e 4 µL de 5x *SSIV Buffer* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*).

A solução resultante foi submetida a dois ciclos de incubação: 10 minutos a 55° C e 10 min 80°C. adicionado 1 µL de *E. coli* RNase H (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) e novamente incubada por 20 minutos a 37 °C, para a remoção do RNA residual. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20 °C até a realização da qPCR.

d. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR

A amplificação e aquisição dos dados foi realizada com a sonda *TaqMan* em equipamento *Quantstudio™ 5 System* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*) como descrito previamente. Nesse processo de excitação a captação de fluorescência é realizada em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das sequências dos genes de interesse [146].

Para a reação de qPCR foi efetuado o seguinte protocolo: em 15 µL de cDNA, foram adicionados 250 µL de Solução *Taqman® Universal Fast Master Mix 2X* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*) e 235 µL de água *DNase I/ RNase Free* – (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) por amostra, permitindo o volume de 10 µL de reação em cada poço da placa com 96 poços. As amostras foram aplicadas em duplicata e incubadas a 95 °C por 20 seg., e passaram por 40 ciclos térmicos a 95 °C por 3 seg. e 60 °C por 30 seg.

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de Ct, se referiu ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atingisse o limiar de detecção.

Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pela expressão do gene *housekeeping* subunidade 18S do RNA ribossomal, cuja expressão mostrou-se inalterada nas condições experimentais. O “software” *QuantStudio™ Design & Analysis* versão 1.3.1 (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*) foi utilizado para o processamento dos dados.

Os valores de ΔCt das amostras foram determinados pela subtração do valor de Ct médio do mRNA do gene alvo a partir do valor médio de Ct do gene *housekeeping*. O parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para representar os dados de expressão relativos.

3.3. Análise estatística

Os dados morfométricos das fêmeas e da prole e resultantes das análises de expressão gênica, foram tabulados e classificados. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando a aplicação *IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0.* (Armonk, NY: IBM Corp., 2017). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade e variâncias de erro.

As medidas morfométricas das fêmeas (Consumo médio, ganho de peso gestacional e número de filhotes) e da prole (peso, comprimento, peso do coração, peso do ventrículo esquerdo e relações CT/Tíbia – VE/ Tíbia), foram representadas, quando paramétricas por média \pm erro padrão da média (EPM) e, quando não, por Mediana (M_q) e intervalos interquartis 25-75%.

Para comparação entre grupos foi realizado o Teste t de *Student* para amostras independentes e, quando necessário, Teste de *Mann-Whitney* (U), sendo considerado em ambos os testes a significância $p \leq 0,05$. A curva de sobrevivência/ mortalidade foi obtida através do teste de Mantel-Cox e representada graficamente.

Para a comparação da expressão dos genes entre o grupo Controle e grupo P.A.E. foi realizado Teste t de *Student* para amostras independentes e, quando necessário, complementado com o teste de correção de *Welch*. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo e os resultados são expressos como média (MED) \pm erro padrão da média (EPM). Todos os gráficos foram confeccionados utilizando a aplicação *GraphPad Prism versão 8.0.1 for Windows, GraphPad Software* (San Diego, CA. USA).

4. Resultados

Na comparação entre a média de consumo diário (ml/ dia) das fêmeas progenitoras do grupo P.A.E. ($9,74 \pm 0,33$ ml/ dia) e do grupo Controle ($10,63 \pm 0,13$ ml/ dia), não observamos diferença significativa ($p = 0,121$). O consumo de álcool nas fêmeas P.A.E. possibilitou atingir concentrações médias de álcool no sangue de aproximadamente 1,5 mg/ dL.

Nas análises efetuadas não foram encontradas diferenças significativas em relação ao número filhotes, tamanho médio das ninhadas, quantidade de óbitos por ninhadas e óbito total, quando comparado o grupo P.A.E. com o grupo Controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Dados morfométricos das fêmeas progenitoras.

	Grupo		Valor p
	Controle	P.A.E.	
<i>Dados maternos</i>			
Consumo diário (ml/dia)	$10,63 \pm 0,13$	$9,74 \pm 0,33$	0,121
Número de ninhadas	10	16	
Número de filhotes	78	113	
Tamanho médio da ninhada	$7,8 \pm 0,25$	$7,1 \pm 0,46$	0,245
Óbito total	24	61	
Óbito por ninhada	$2,4 \pm 0,64$	$3,8 \pm 0,80$	0,223

(MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes.

Em relação ao ganho de peso gestacional, foram efetuadas duas medições, ganho de peso gestacional total (Ggt) e diário (Ggd). Foi possível verificar que as fêmeas do grupo P.A.E. apresentaram Ggd significativamente menor ($0,70 \pm 0,02$ g/ dia; $p = 0,0005$) quando comparadas ao grupo Controle ($0,83 \pm 0,02$ g/ dia) (**Figura 8 A**). Estes dados foram totalizados e contabilizados ao Ggt quando comparados o grupo P.A.E. ($14,0 \pm 0,5$ g; $p = 0,012$) e Controle ($16,1 \pm 0,4$ g) (**Figura 8 B**).

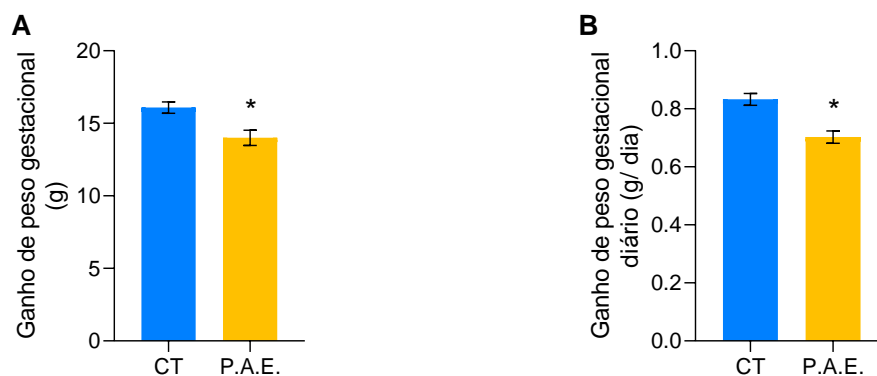


Figura 8. Ganho de peso gestacional total e diário nos grupos amostrais.

A. Ganho de peso gestacional total (Ggt) em gramas (g); **B.** Ganho de peso gestacional diário (Ggd) em gramas por dia (g/ dia). Observa-se redução significativa no grupo P.A.E., em relação ao grupo Controle em ambos os critérios analisados. (MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes.

Em contrapartida, não observamos diferenças no ganho de peso pré-gestacional (I) nas fêmeas P.A.E. ($p = 0,086$) quando comparadas ao grupo controle (**Figura 9**).

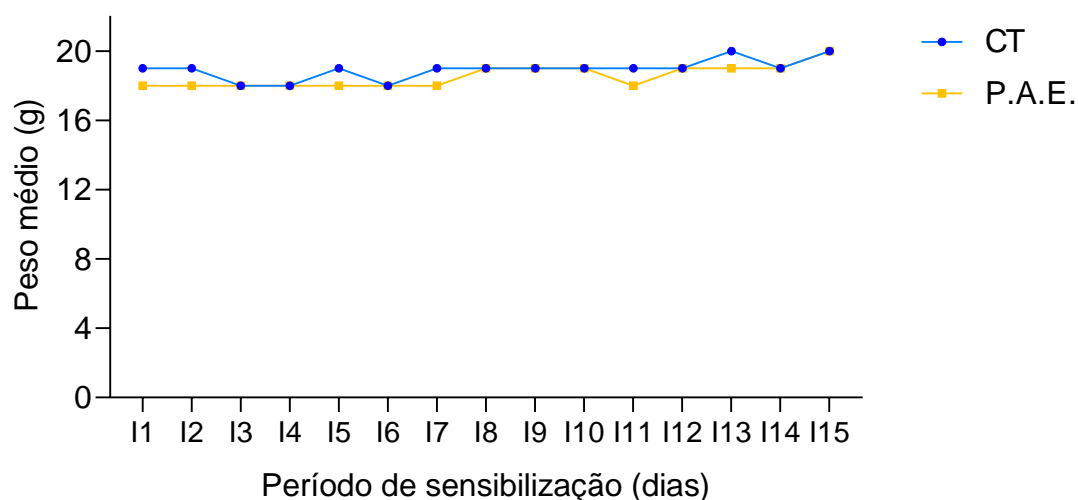


Figura 9. Flutuação de peso pré-gestacional nos grupos amostrais.

(MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes.

Como observamos na curva de sobrevivência/mortalidade, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais após teste de Mantel-Cox ($p = 0,1723$) (**Figura 10**).

O número total de filhotes utilizados neste projeto foi de 91 animais sendo 48 no grupo P.A.E. (24 fêmeas e 24 machos) e 43 no grupo Controle (16 fêmeas e 27 machos).

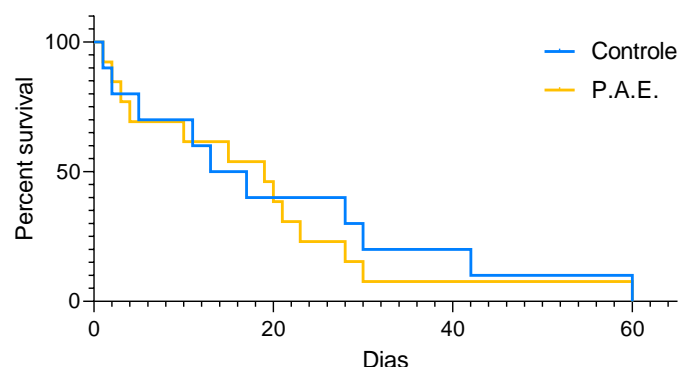


Figura 10. Curva de mortalidade/sobrevivência entre os grupos amostrais. Não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e P.A.E. Obtido através do teste de Mantel-Cox. * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle.

4.1. Dados morfométricos da prole

Em relação aos pesos corporais foram realizadas pesagens em dois tempos, PN2 e PN60. Em comparação entre o peso ao nascimento (PN2) do grupo P.A.E. ($1,13 \text{ mg} \pm 0,05$) com o grupo Controle ($1,29 \text{ mg} \pm 0,04$), observamos diferença significativa entre os pesos ($p = 0,03$, **Figura 11 A**). Entretanto, não foram encontradas diferenças relevantes na comparação (PN60) nos animais do grupo P.A.E., de ambos os sexos (Fêmeas – $15,53 \text{ mg} \pm 0,21$; Machos – $19,83 \text{ mg} \pm 0,42$), quando comparados ao grupo Controle (Fêmeas – $15,20 \text{ mg} \pm 0,31$; Machos – $20,43 \text{ mg} \pm 0,30$) (**Figura 11 B e C**).

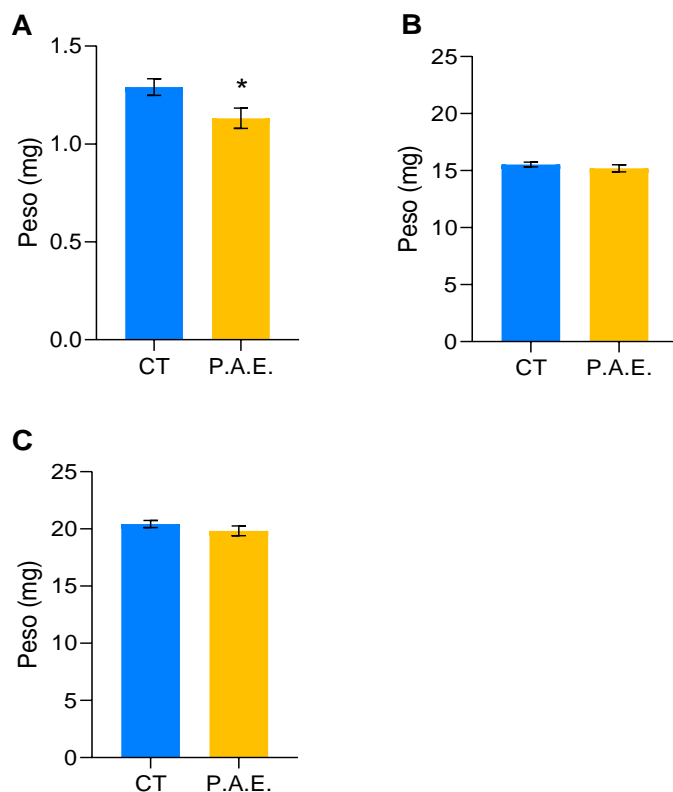


Figura 11. Pesos corporais ao nascimento e PN60 nos grupos amostrais. Valores em miligramas (mg). **A.** Peso ao nascimento (PN2); **B.** Peso corporal (PN60) – Fêmeas; **C.** Peso corporal (PN60) – Machos; Observamos diminuição significativa no grupo P.A.E. em PN2, em comparação com o grupo Controle. Não se observa diferença em PN60 em ambos os sexos, quando comparados ao grupo controle. (MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes.

Em relação ao tamanho dos animais, foram comparados os comprimentos a partir da coroa craniana até a base da cauda em PN60. Interessantemente, o grupo P.A.E. apresentou diminuição no comprimento das fêmeas 7,03 cm (6,48-7,19; $p < 0,0001$) e aumento nos machos 7,89 cm (7,38-8,37; $p = 0,022$) quando comparados com os animais do grupo Controle de mesmo sexo; Fêmeas – 7,89 cm (7,40-8,35); Machos – 7,45 cm (6,52-8,11) (**Figura 12 A e B**).

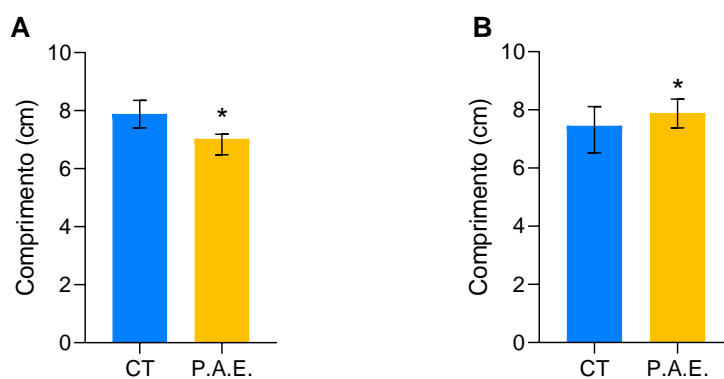


Figura 12. Comprimento corporal (PN60) nos grupos amostrais.

Valores expressos em centímetros (cm); **A.** Comprimento PN60 – Fêmeas; **B.** Comprimento PN60 – Machos. Constata-se diminuição no comprimento nas fêmeas do grupo P.A.E. e aumento nos machos, estatisticamente significativo quando comparado com o grupo Controle. (Md, I.Q 25-75%). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste de *Mann-Whitney* (U).

A partir desse achado foi calculada a relação entre o peso corporal e o comprimento do animal e foi observado que fêmeas do grupo P.A.E. apresentam aumento expressivo da relação P/C ($0,36 \text{ g/cm} \pm 0,01$; $p = 0,003$) quando comparadas com o grupo Controle ($0,30 \text{ g/cm} \pm 0,01$) (**Figura 13 A**). Da mesma maneira, os machos do grupo P.A.E. apresentaram aumento expressivo da relação P/C ($0,44 \text{ g/cm} \pm 0,01$; $p = 0,0009$) quando comparados aos machos do grupo Controle ($0,37 \text{ g/cm} \pm 0,01$) (**Figura 13 B**).

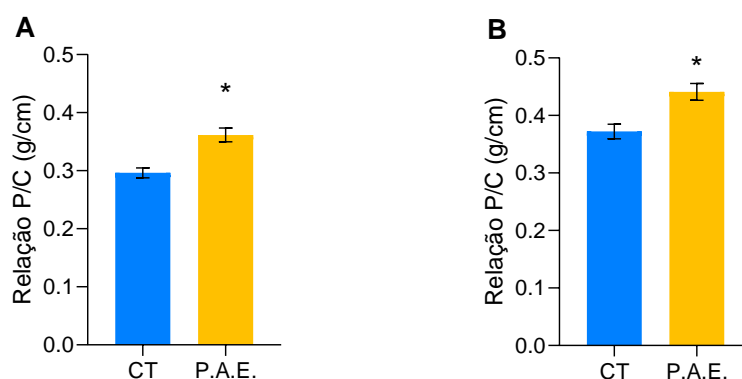


Figura 13. Relação Peso/ Comprimento (P/C) nos grupos amostrais.

Valores expressos em gramas por centímetro (g/ cm). **A.** Relação Peso/ Comprimento – Fêmeas; **B.** Relação Peso/ Comprimento – Machos. Observa-se aumento relevante em ambos os sexos no grupo P.A.E. em relação ao grupo Controle. (MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste *t* para amostras independentes.

Os pesos absolutos do coração e do ventrículo esquerdo de ambos os grupos foram mensurados para verificar o efeito da exposição pré-natal ao álcool nessas estruturas. Os animais do grupo P.A.E. apresentaram diferenças tanto no peso total do coração, quando do ventrículo esquerdo ($p < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo Controle de mesmo sexo. O peso total do coração foi de 137 mg (128,5-139,5) nas fêmeas e 139,5 mg (136-148) nos machos, no grupo P.A.E. e 123 mg (122-125,5) e 134 mg (128-137), no grupo Controle, respectivamente (**Figura 14 A e B**). De maneira semelhante, o peso absoluto do VE, no grupo P.A.E., foi de 99,5 mg (96-108) nas fêmeas e 99,5 mg (96-108) nos machos. No grupo Controle, o peso foi de 86 mg (85-88,5) nas fêmeas e de 96 mg (90-99) nos machos (**Figura 14 C e D**).

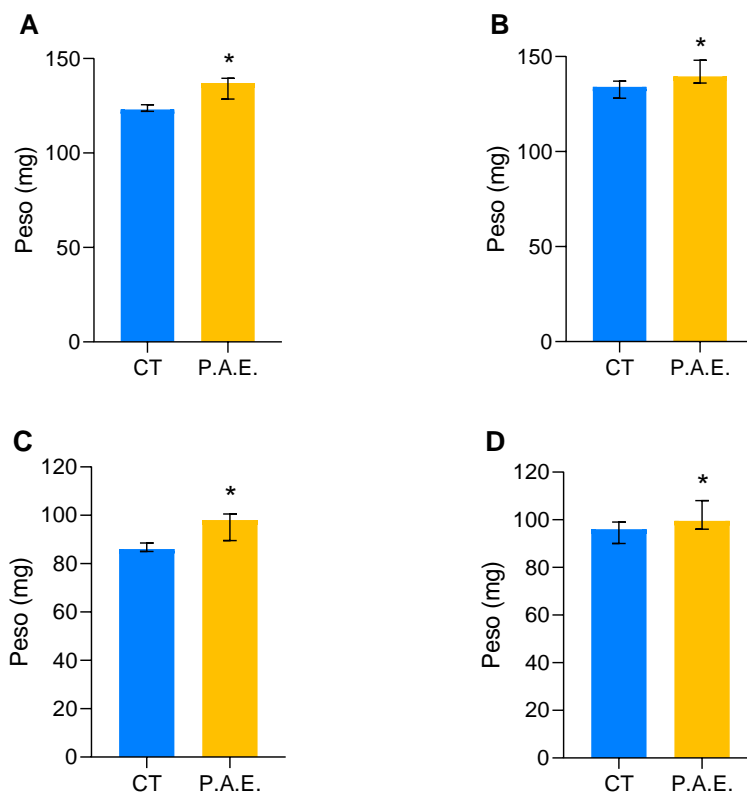


Figura 14. Pesos absolutos do coração e ventrículo esquerdo (VE) nos grupos amostrais. Valores em miligramas (mg). **A.** Peso total do coração – Fêmeas; **B.** Peso total do coração – Machos; **C.** Peso do VE – Fêmeas; **D.** Peso do VE – Machos. Observa-se aumento estatisticamente relevante no grupo P.A.E. em todos os parâmetros observados, em comparação com o grupo Controle. (Md, I.Q. 25%-75%). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste de *Mann-Whitney* (U).

Ao utilizar a correlação de peso do coração e ventricular com a tíbia (CT/ Tíbia e VE/ Tíbia), os animais expostos ao álcool durante o período gestacional (grupo P.A.E.) apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois parâmetros analisados. A relação Coração Total/ Tíbia nesse grupo foi de 1,04 mg/ mm (0,98-1,06) nas fêmeas e 1,05 mg/ mm (1,02-1,11) nos machos, quando comparados aos animais do grupo Controle de mesmo sexo, 0,77 mg/ mm (0,76-0,78) e 0,83 mg/ mm (0,79-0,84), respectivamente (**Figura 15 A e C**, nessa ordem). A relação VE/ Tíbia seguiu a mesma tendência, apresentando, no grupo P.A.E., valores de 0,74 mg/ mm (0,68-0,76) nas fêmeas e de 0,75 mg/ mm (0,72-0,81) nos machos quando comparados aos animais do grupo Controle de mesmo sexo, 0,54 mg/ mm (0,53-0,55) e 0,60 mg/ mm (0,55-0,61), nessa ordem (**Figura 15 B e D**, respectivamente).

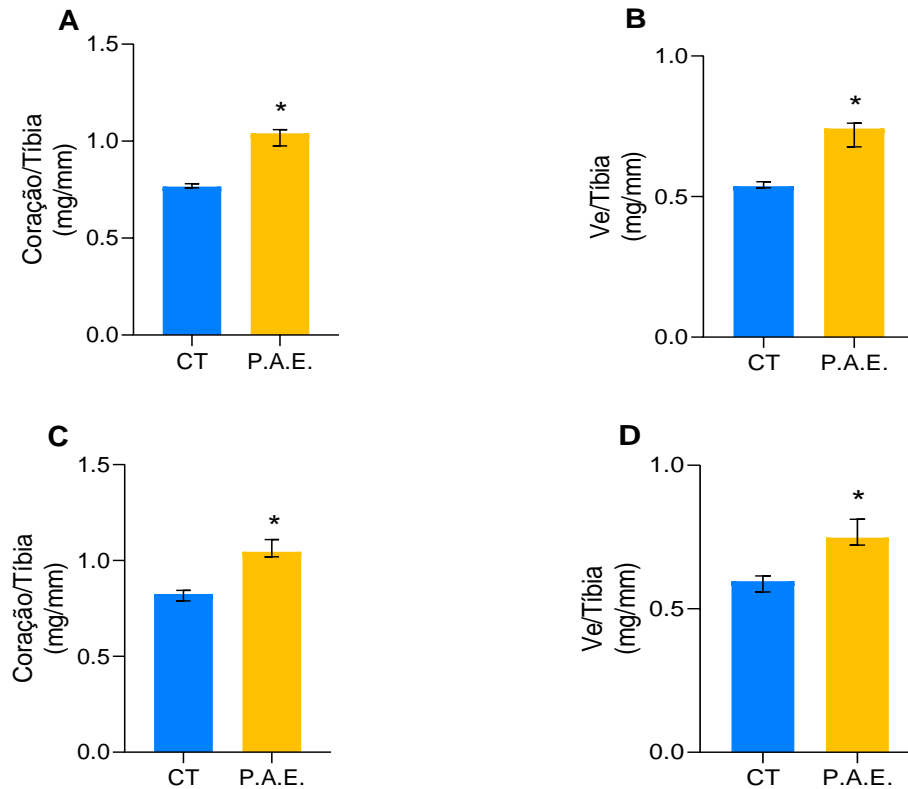


Figura 15. Relação entre os pesos das estruturas cardíacas corrigida pelo comprimento da tíbia (mg/ mm) nos grupos amostrais.

A. Relação Coração Total/ Tíbia – Fêmeas; **B.** Relação Ventrículo esquerdo/ Tíbia – Fêmeas; **C.** Relação Coração Total/ Tíbia – Machos; **D.** Relação Ventrículo esquerdo/ Tíbia – Machos. Constata-se aumento estatisticamente significativo no grupo P.A.E. em todos os parâmetros observados, em comparação com o grupo Controle. ($M_d - 25\% - 75\%$). * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste de *Mann-Whitney* (U).

Ao compararmos esses índices intragrupo, foi observado que machos P.A.E. apresentaram maior relação coração/ tíbia ($p = 0,029$) e VE/ tíbia ($p = 0,024$), quando comparados às fêmeas de mesmo grupo (**Figura 16 A e B**, respectivamente).

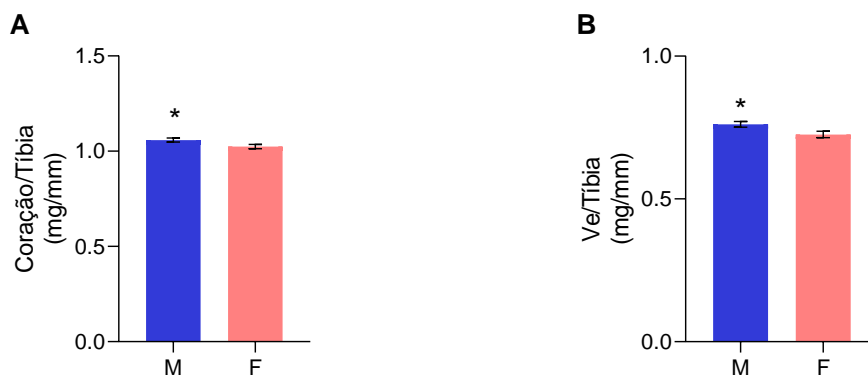


Figura 16. Relação entre os pesos das estruturas cardíacas corrigida pelo comprimento da tíbia (mg/ mm) no grupo P.A.E.

Observa-se maior relação em ambas as estruturas em machos P.A.E quando comparados a fêmeas de mesmo grupo (MED \pm EPM). * $p \leq 0,05$ versus fêmeas P.A.E., determinado por Teste t para amostras independentes.

4.2. Análise da Expressão gênica

Após a extração de RNA a partir de amostras do ventrículo esquerdo, estes foram quantificados por espectrofotometria e foram escolhidas 20 amostras, de acordo com sua concentração em mRNA (ng/ μ L) e pureza, conforme descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5. Quantificação de RNA extraído das amostras de tecidos cardíacos dos animais dos grupos Controle e P.A.E.

Grupo	Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Pureza 260/280 nm
CONTROLE	CT2H1	4284,10	2,08
	CT2H7	2904,00	2,06
	CT2H8	736,70	1,95
	CT2H11	1144,90	2,04
	CT3H4	1199,70	2,03
	CT3H6	4129,90	2,06
	CT3H11	4979,90	2,07
	CT4H6	504,40	1,93
	CT4H7	2370,50	2,08
	CT4H12	898,50	2,03
P.A.E.	ET1H2	2187,90	2,03
	ET1H6	1808,90	2,03
	ET4H1	4799,90	2,08
	ET5H1	1731,10	2,06
	ET5H4	1681,10	2,02
	ET5H9	4090,00	2,06
	ET6H4	1880,30	2,06
	ET6H5	4428,40	2,00
	ET11H3	1047,80	1,99

O efeito da exposição pré-natal ao álcool na transcrição dos genes foi analisado utilizando PCR em tempo real. Os resultados da expressão gênica dos grupos experimentais foram dados pelo número de vezes (*fold change*) que apresentaram expressão aumentada (*up regulated*) ou diminuída (*down regulated*) quando comparados ao grupo Controle. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Expressão relativa mRNA, grupo P.A.E. em relação ao grupo Controle.

Grupo Controle	Grupo P.A.E.
----------------	--------------

Gene	n	Expressão	n	Expressão	p value
Ace	10	1,00	10	0,45 ± 0,00*	<0,001
Ace2	10	1,00	10	0,22 ± 0,02*	<0,001
Agtr1a	10	1,00	9	0,21 ± 0,02*	<0,001
Cabin1	10	1,00	10	2,64 ± 0,17*	<0,001
Chp2	10	1,00	10	0,23 ± 0,05*	<0,001
Col1a1	10	1,00	10	2,70 ± 0,11*	<0,001
Col3a1	10	1,00	10	1,08 ± 0,07	0,369
Edn1	10	1,00	10	0,97 ± 0,01	0,511
Igf1	10	1,00	10	2,22 ± 0,07*	<0,001
Map3k2	10	1,00	10	1,79 ± 0,04*	<0,001
Mmp9	10	1,00	10	3,84 ± 0,21*	0,028
Myh6	10	1,00	10	0,32 ± 0,00*	<0,001
Myh7	10	1,00	10	2,26 ± 0,12*	<0,001
Nfatc3	10	1,00	10	2,60 ± 0,05*	<0,001
Nppa	10	1,00	10	3,60 ± 0,28*	<0,001
Nppb	10	1,00	10	4,21 ± 0,16*	<0,001
Prkca	10	1,00	10	3,83 ± 0,19*	<0,001
Prkcb	10	1,00	10	4,14 ± 0,23*	<0,001
Prkcg	10	1,00	10	2,33 ± 0,09*	<0,001
Tgfb1	10	1,00	10	3,84 ± 0,21*	<0,001

* $p \leq 0,05$ versus grupo Controle. Os valores de p foram determinados por Teste t para amostras independentes com correção de *Welch*, quando necessário. $n = 20$, sendo 5 machos e 5 fêmeas por grupo amostral.

A seguir, apresentamos os dados referentes à expressão de RNA mensageiro dos genes pertencentes à via de transdução de sinais relacionada à hipertrofia cardíaca.

4.2.1. VTS da Hipertrofia Cardíaca

Nesta via foram analisadas a expressão relativa de 20 genes (Ace, Ace2, Agtr1a, Cabin1, Chp2, Col1a1, Col3a1, Edn1, Igf1, Map3k2, Mmp9, Myh6, Myh7, Nfatc3, Nppa, Nppb, Prkca, Prkcb, Prkcg e Tgfb1).

O gene da endotelina 1 (Edn1) apresentou expressão inalterada entre os grupos experimentais (**Figura 17 A**). A expressão de RNAm dos genes da enzima conversora de angiotensina (Ace) e enzima conversora de angiotensina II (Ace2) apresentaram, no grupo P.A.E., redução de 55,50% e 78,97%, respectivamente, quando comparado ao Controle (**Figura 17 B e C**). Os genes do receptor de angiotensina II tipo 1A (Agtr1a), proteína 2 semelhante à Calcineurina B (Chp2) e cadeia pesada de miosina α (Myh6), apresentaram

reduções de expressão gênica de 79,44%, 79,68%, 68,48%, nessa ordem, quando comparados ao grupo Controle (**Figura 17 D, E e F**, respectivamente).

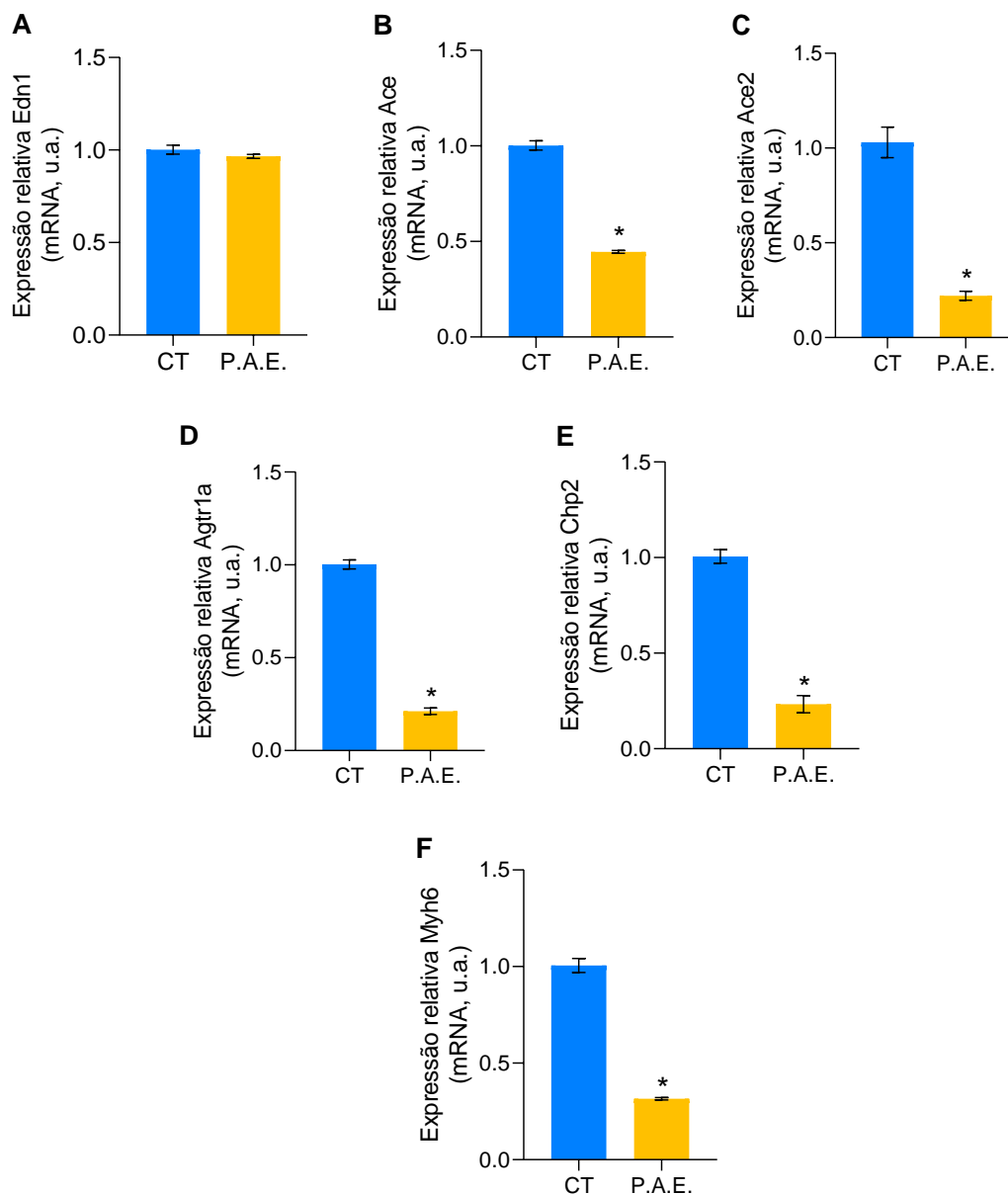


Figura 17. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 1.

A. Endotelina 1 (Edn1); **B.** Enzima Conversora de Angiotensina (Ace); **C.** Enzima Conversora de Angiotensina II (Ace2); **D.** Receptor de angiotensina II tipo 1a (Agtr1a); **E.** Proteína 2 semelhante à Calcineurina B (Chp2); **F.** Cadeia pesada de miosina α (Myh6); Constata-se diminuição significativa na expressão dos genes Ace, Ace2, Chp2, Myh6 e Agtr1a, bem como, inalteração da expressão de Edn1 no grupo P.A.E. em relação ao grupo Controle. (MED \pm EPM). (u.a.) – unidades arbitrárias; * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste *t* para amostras independentes, com correção de *Welch* quando necessário.

Contrapondo-se aos resultados de Myh6 e Chp2, os genes da cadeia pesada de miosina β (Myh7) e da proteína 1 de ligação à Calcineurina (Cabin1), apresentaram, no grupo P.A.E., aumentos de 226,28% e 269,08% em sua

expressão, respectivamente, quando comparado ao grupo Controle (**Figura 18 A e B**). As expressões de RNAm de fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático, dependente de Calcineurina 3 (Nfatc3), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf-1) e proteína Quinase, Quinase, Quinase, 2 ativada por Mitogênio (Map3k2), apresentaram aumentos de 259,45%, 221,94% e 178,55%, nessa ordem, quando comparado ao grupo Controle (**Figura 18 C, D, e E**, respectivamente).

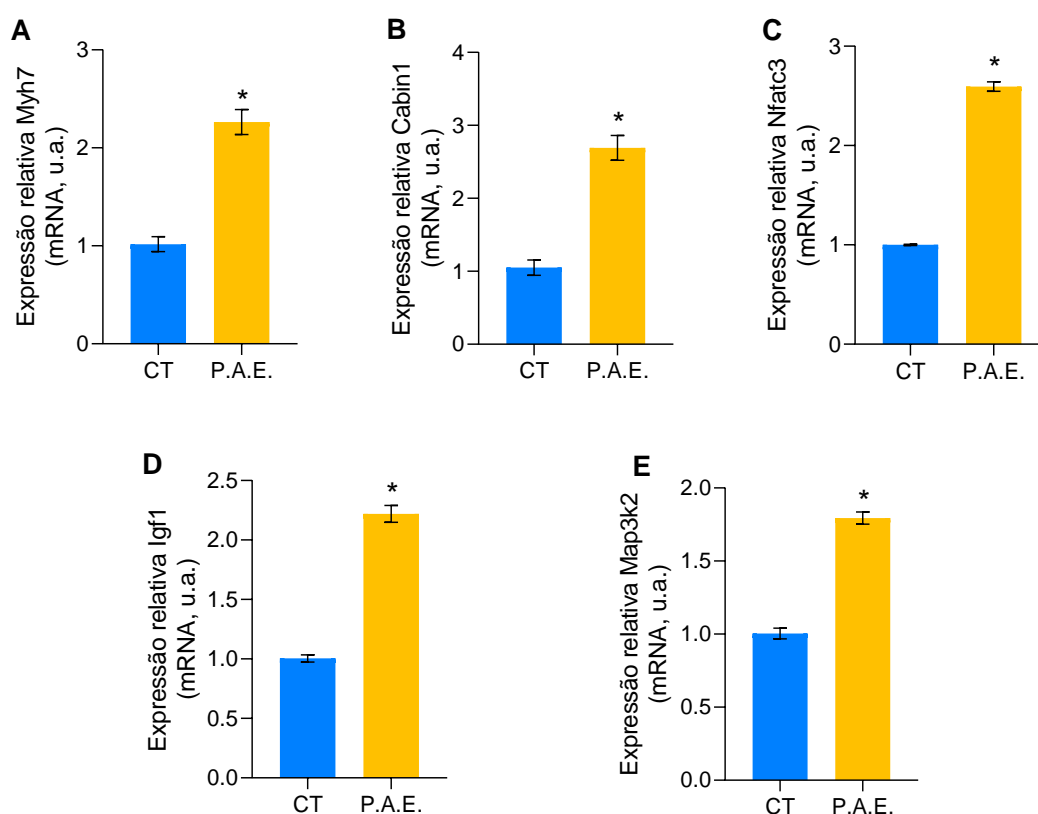


Figura 18. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 2.

A. Cadeia pesada de miosina β (Myh7); **B.** Proteína 1 de ligação à Calcineurina (Cabin1); **C.** Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático, dependente de Calcineurina 3 (Nfatc3); **D.** Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf1); **E.** Proteína Quinase, Quinase, Quinase, 2 ativada por Mitogênio (Map3k2); Observa-se no grupo P.A.E., aumento significativo na expressão dos genes de todos apresentados, em relação ao grupo Controle. (MED \pm EPM). (u.a.) – unidades arbitrárias; * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes, com correção de *Welch* quando necessário.

Os genes codificadores dos peptídeos natriuréticos e das proteínas Quinases C apresentaram, no grupo P.A.E., os maiores aumentos de expressão de RNAm quando comparados ao grupo Controle. O gene peptídeo natriurético B (Nppb) apresentou a maior expressão relativa, 405,92%, nesse protocolo,

quando comparado ao grupo Controle (**Figura 19 A**). Já os genes do peptídeo Natriurético A (Nppa), proteína Quinase C α (Prkca), β (Prkcb) e γ (Prkcg) apresentaram aumentos de expressão de RNAm de 353,82%, 378,62%, 399,50% e 230,54%, respectivamente (**Figura 19 B, C, D, e E**, nessa ordem).

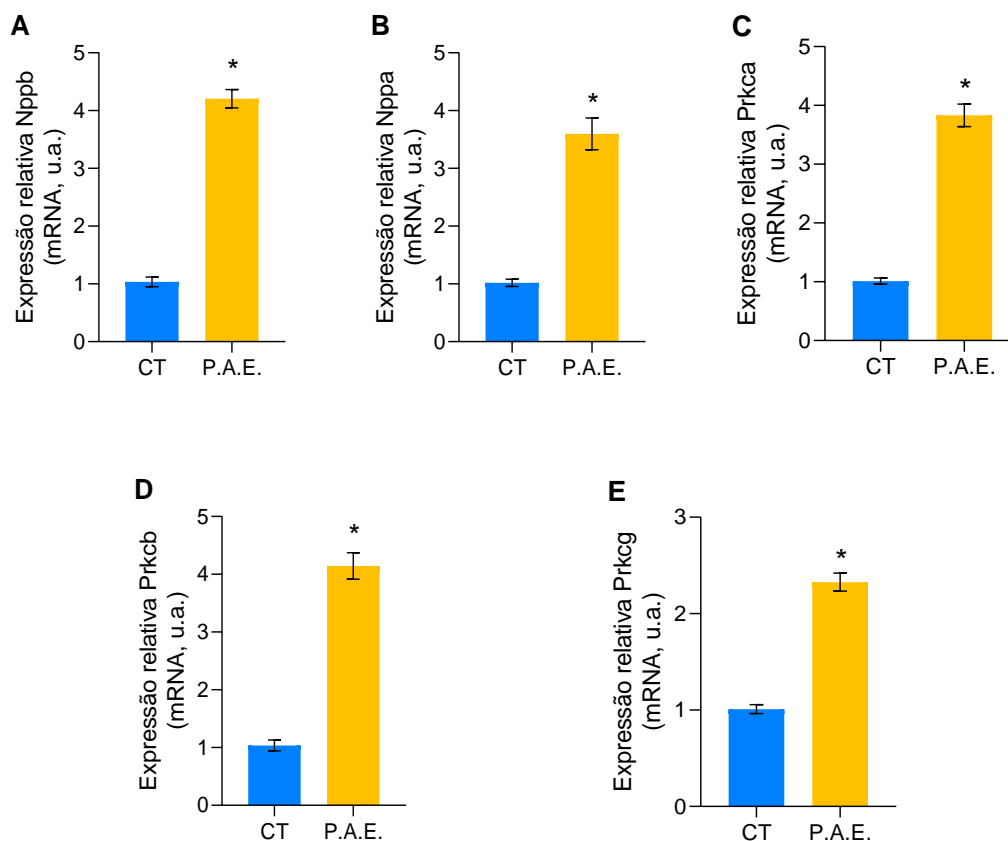


Figura 19. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 3.

A. Peptídeo Natriurético B (Nppb); **B.** Peptídeo Natriurético A (Nppa); **C.** Proteína Quinase C α (Prkca); **D.** Proteína Quinase C β (Prkcb) **E.** Proteína Quinase C γ (Prkcg); Constata-se no grupo P.A.E., aumento significativo na expressão de todos os genes apresentados, em relação ao grupo Controle. (MED \pm EPM). (u.a.) – unidades arbitrárias; * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes, com correção de *Welch* quando necessário.

Consequentemente, as alterações nos genes da matriz extracelular (MEC) podem desencadear uma série de perturbações estruturais e funcionais ao coração e estão envolvidos no processo de hipertrofia cardíaca. Para avaliar o efeito da P.A.E. em uma possível alteração na composição e dinâmica da matriz extracelular cardíaca, foram avaliadas as expressões de RNAm de Col1a1, Col3a1, Tgfb1 e Mmp9. No grupo P.A.E. foi possível observar o aumento significativo de 378,33% na expressão do gene fator de crescimento

transformador β 1 (Tgfb-1) , de 268,92% no gene da cadeia α 1 do colágeno tipo I (Col1a1) e 378,34% na expressão do gene Matriz Metaloproteinase 9 (Mmp-9) (**Figura 20 A, B e C**, respectivamente). Entretanto, não foram observadas alterações na expressão do gene da cadeia α 1 do colágeno tipo III (Col3a1) (**Figura 20 D**) em relação ao grupo controle.

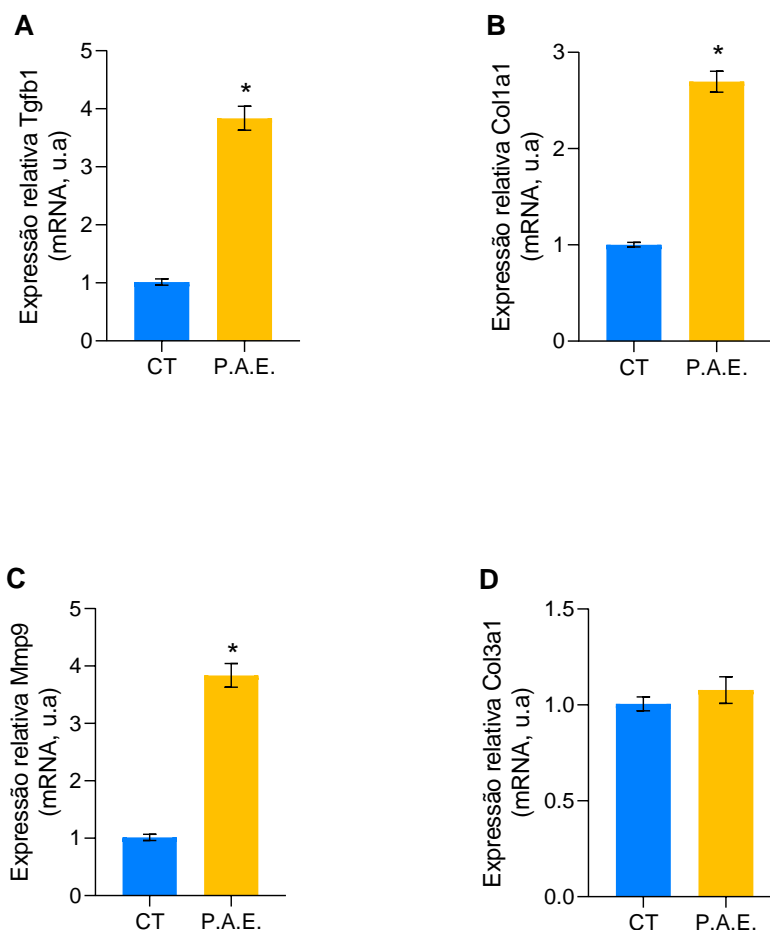


Figura 20. Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes pertencentes a VTS da Hipertrofia cardíaca nos grupos amostrais – 4.

A. Fator de crescimento transformador β 1 (Tgfb1); **B.** Cadeia α 1 do colágeno tipo I (Col1a1); **C.** Matriz Metaloproteinase 9 (Mmp9); **D.** Cadeia α 1 do colágeno tipo III (Col3a1); Observa-se aumento significativo na expressão dos genes Tgfb1, Col1a1 e Mmp9. O gene Col3a1 manteve-se inalterado no grupo P.A.E. em relação ao grupo Controle. (MED \pm EPM). (u.a.) – unidades arbitrárias; * $p \leq 0,05$ versus grupo Controle, determinado por Teste t para amostras independentes, com correção de Welch quando necessário.

O Grupo P.A.E., em comparação com o grupo Controle, apresentou 13 genes (65%) com expressão *up regulated*, 5 (25%) *down regulated* e 2 genes com expressão inalterada (10%). Os equivalentes em porcentagem para a expressão são apresentados na **Figura 21**.

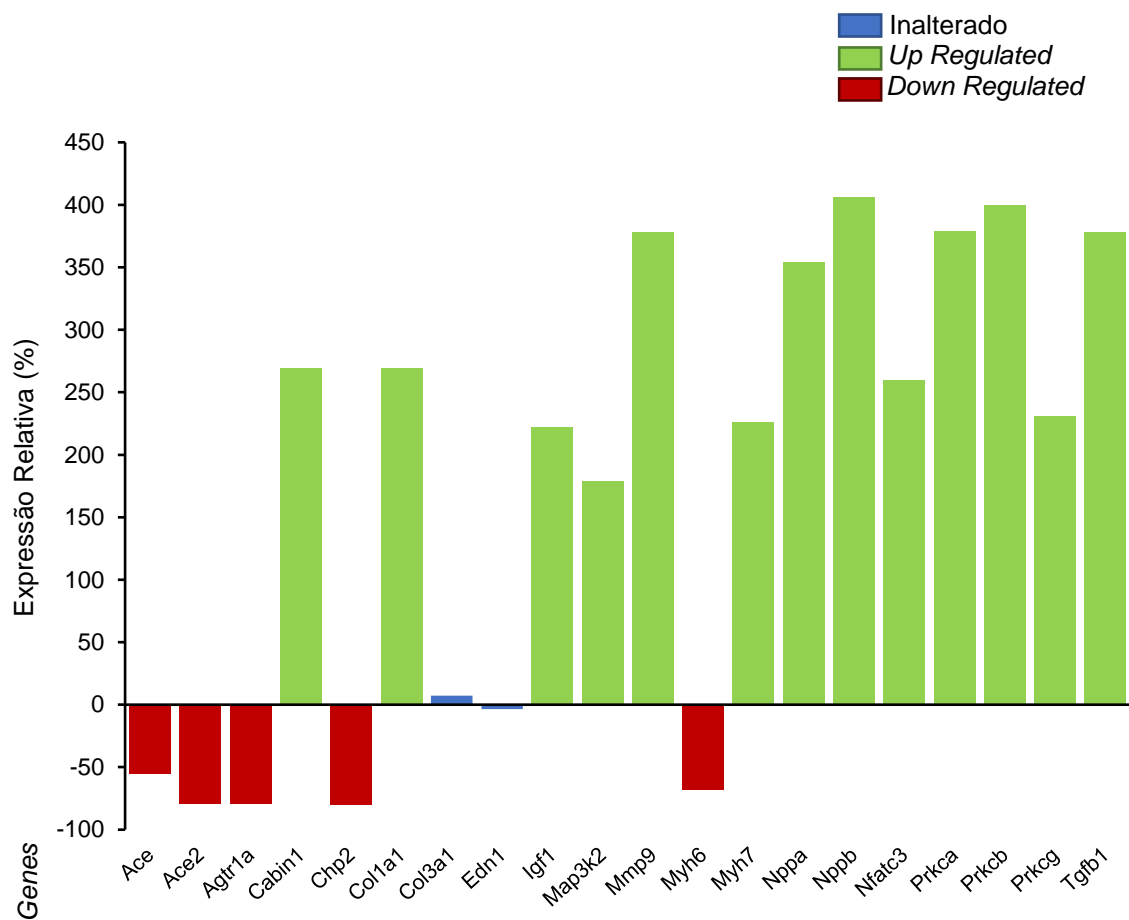


Figura 21. Expressão dos genes no grupo P.A.E. em comparação ao grupo Controle. Valores em porcentagem (%), (MED \pm EPM) valores expressos na diferença de expressão em relação a expressão do grupo Controle.

5. Discussão

Os efeitos tóxicos do álcool no desenvolvimento do embrião são bem conhecidos. O álcool atravessa facilmente as barreiras placentária e hematoencefálica e pode, portanto, afetar o desenvolvimento de células. Sabe-se que o álcool atua e/ou modula muitas moléculas diferentes [49,147]. Assim, múltiplos mecanismos podem ser ativados em diferentes estágios do desenvolvimento, variando de acordo com os diferentes limiares de dose e tempo de exposição, contribuindo para os diversos fenótipos observados na FASD, por exemplo [10,148]. Entretanto, estas alterações podem ocorrer de forma silenciosa, como observamos nos resultados obtidos em nosso estudo.

Em relação a processo de sensibilização alcoólica, verificamos que, como descrito na literatura [90,73], o aumento gradual da quantidade de álcool diluído em água de consumo impediu a ocorrência de consumo excessivo, dado ao fato de que não houve diferença na média de consumo diário entre fêmeas Controle e P.A.E. progenitoras. Nosso protocolo estimulou o comportamento de beber nas fêmeas antes da fecundação, levando ao estabelecimento de padrões estáveis de consumo de álcool antes do início da gestação. Acreditamos que isso representa mais de perto os padrões humanos de consumo alcoólico do que os protocolos nos quais o consumo de álcool é iniciado depois que a gestação foi estabelecida.

A partir do acompanhamento do peso das fêmeas progenitoras durante esse período, foi possível verificar que as alterações morfométricas ocorridas nas proles, deram-se exclusivamente durante o período gestacional e refletem, de forma consistente, os efeitos deletérios causados pela exposição pré-natal, corroborando estudos que indicam que o consumo de álcool não interfere do peso pré-gestacional [90].

Além disso, não encontramos alterações na taxa de mortalidade dos filhotes, o que está em consonância com estudos anteriores que relataram não ocorrer alterações na mortalidade com doses alcoólicas baixo-moderadas [90]. Além disso, os óbitos e/ou reabsorções podem estar relacionadas à espécie utilizada, que pode levar ao canibalismo das proles [84-86].

5.1. Exposição pré-natal ao álcool e alterações morfométricas na prole

A partir da análise dos dados relacionados ao peso dos filhotes em PN2 foi possível evidenciar que doses consideradas de álcool baixo-moderadas são suficientes para levar à restrição de crescimento intrauterino (RCIU), corroborando diversos estudos [7,22,55,60,68-71,73,122,149,150,151], inclusive em humanos [71,152], que evidenciam o baixo peso ao nascimento. Outros estudos sugerem que essa diminuição e/ou restrição de crescimento gestacional está associada ao desenvolvimento de doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes tipo II e asma [83,133,153].

Nykjaer *et al.* [154], em um estudo de coorte relacionando P.A.E. e baixo peso ao nascimento em humanos, verificaram que o primeiro trimestre gestacional é o mais sensível às alterações causadas pelo consumo de álcool materno, mesmo em quantidades consideradas baixo-moderada (duas unidades/semana). Em nosso protocolo, a ingestão de álcool foi contínua durante todo o período gestacional, porém, considerando a dose alcoólica oferecida, é possível corroborar estes achados, tendo em vista que tais modificações também foram observadas, mesmo que em menor significância, nos demais períodos gestacionais, no estudo citado.

Em nosso estudo, ao analisarmos o peso dos animais 60 dias após o nascimento não encontramos diferenças na comparação entre os grupos experimentais, corroborando estudos que evidenciaram que tal evidência está relacionada ao crescimento acelerado de recuperação no início da puberdade [122,150,155,156]. Entretanto, a partir do cálculo da relação entre peso e comprimento corporal (P/C), verificamos que os animais do grupo P.A.E. apresentam maior peso em relação ao comprimento (sobrepeso) quando comparados ao grupo Controle.

Apesar de não termos encontrado estudos mostrando sobrepeso em adultos expostos a P.A.E., estudos relacionados ao consumo de álcool em adultos, indicam que o álcool é capaz de impedir a transformação de ácidos graxos em energia, pelo recrutamento de enzimas hepáticas chaves nesse processo [157], podendo levar a um quadro de hipertrigliceridemia [158] e sobrepeso [2]. Isso nos permite supor que, a exposição pré-natal ao álcool,

possa ter ocasionado uma alteração no metabolismo dos ácidos graxos levando ao sobrepeso na vida adulta nesses animais [159].

Em relação ao comprimento corporal, a observação de que as fêmeas P.A.E. são menores e os machos maiores que seus respectivos comparativos no grupo Controle corrobora estudos que evidenciam o efeito dimórfico da exposição pré-natal ao álcool nas alterações ocorridas no metabolismo e crescimento, sendo mais comumente observados em fêmeas [122,160].

Esses achados, podem estar relacionados também, a uma má nutrição fetal durante a gestação, dado ao fato que fêmeas progenitoras P.A.E [7]. apresentaram menor ganho de peso durante a gestação, quando comparadas ao grupo Controle. Como não encontramos diferenças nos pesos entre grupos durante o período de sensibilização, é possível sugerir que o álcool possa interferir no fluxo sanguíneo e transporte de nutrientes, ocasionando baixo peso ao nascimento, discutido anteriormente [7,39,90,159].

A hipertrofia cardíaca proveniente da exposição pré-natal ao álcool é relatada em diversos estudos animais e humanos. Walton *et al.* [122], utilizando uma dose alcoólica de 6,36% v/v, verificaram que ratos *Sprague-Dawley* fêmeas com 120 dias apresentaram hipertrofia ventricular esquerda e fibrose, mas não em PN30. Corroborando estas informações, observamos que em PN60, os pesos do coração e do ventrículo esquerdo nos animais do grupo P.A.E. foram maiores em ambos os sexos, quando comparados ao grupo Controle, mesmo após correção pela tibia esquerda, indicando uma leve hipertrofia cardíaca. Podemos observar também, que essa hipertrofia é mais acentuada em machos, como observado por Nguyen *et al.* [121] em PN30.

Esse achado, em PN60, permite inferir que a exposição pré-natal ao álcool, mesmo em doses baixo-moderadas, é suficiente para modificar a estrutura do coração e levar a um quadro hipertrófico, mesmo no início da idade adulta, como relatado em literatura [122,161], inclusive em humanos [162]. Esse achado possui grande relevância clínica, pois a hipertrofia cardíaca, especialmente a ventricular esquerda, é relatada como a mais forte preditora de eventos cardiovasculares adversos, independentemente da idade, sexo e pressão arterial [121,163,164].

Além disso, como as doenças cardiovasculares e as lesões renais associadas são mais frequentemente observadas no final da idade adulta e início da idade senil, é possível sugerir que as alterações causadas pela exposição pré-natal ao álcool desencadeiam um processo contínuo de compensação no sistema cardiovascular que, com o passar do tempo, possa predispor tais animais a doenças cardiovasculares [121,122,165].

Outro aspecto importante é a discrepância de resultados encontrados na literatura relacionados à grande diversidade de protocolos utilizados e/ou carência de informações, como sexo e método de medição [104,121,122,155]. Muitos estudos utilizam somente o peso corporal como fator de correção para o peso do coração e VE. Como sugerido em diversos estudos, tal método apresenta baixa confiabilidade, principalmente quando se leva em consideração o achado em relação ao sobrepeso, encontrado em nosso protocolo [144].

5.2. Exposição pré-natal ao álcool e VTS da Hipertrofia Cardíaca

O processo de remodelamento cardíaca é caracterizado por alterações na geometria, volume, peso e constituição do coração em resposta a uma agressão tecidual, que pode ser física ou química. A hipertrofia miocárdica, importante componente desse processo, permite ao coração manter suas funções básicas em vigência do aumento das condições de carga. Em longo prazo, entretanto, tal mecanismo de compensação representa um fator de risco para morbidade e mortalidade de indivíduos acometidos por doenças cardíacas [166,167].

A regulação positiva da expressão de mRNA de marcadores hipertróficos no miocárdio após exposição pré-natal ao álcool e o peso do ventrículo esquerdo destes animais, sugerem a ocorrência de um discreto alargamento das câmaras do coração, como uma estratégia para compensar o efeito deletério do álcool durante o desenvolvimento fetal. Portanto, pode ser sugerido, que a forte alteração da expressão observada destes genes possa ser indicativa de gravidade do estímulo estressor do álcool.

O aumento da expressão de marcadores hipertróficos, tais como os peptídeos natriuréticos, foi de especial interesse. Estes representam o padrão

ouro para biomarcadores na insuficiência cardíaca (IC), além de desempenharem um papel crucial na homeostase da pressão arterial (PA) e do volume sanguíneo (VB) [168]. Com isso, o entendimento sobre a sua biogênese e seu uso clínico tem crescido exponencialmente desde a sua descoberta.

Classificados como hormônios pleiotróficos, peptídeos natriuréticos são geneticamente distintos, mas estrutural e funcionalmente relacionados para a regulação da homeostase circulatória em vertebrados e inclui o peptídeo natriurético atrial (ANP), a urodilantina (uma isoforma do ANP), o peptídeo natriurético do tipo B ou cerebral (BNP), o peptídeo natriurético do tipo C (CNP) e o peptídeo natriurético *Dendroaspis* (DNP) [169-172].

Em nosso protocolo verificamos a expressão dos genes codificadores de ANP (Nppa) e BNP (Nppb), dado ao fato que, são transcritos e produzidos principalmente nos miócitos dos átrios e ventrículos, respectivamente [173]. Porém, ambos passam a ser produzidos nos ventrículos em resposta ao estiramento do miocárdio, devido à sobrecarga de pressão ou volume [168,174,175], condições comumente encontradas na Insuficiência cardíaca (IC).

Após síntese, o ANP atua em diversos mecanismos de compensação como aumento da natriurese e da diurese e indução de hipovolemia, diminuindo a PA. Além disso, muitos estudos indicam sua relação na inibição da hipertrofia cardíaca e da fibrose, induzindo a apoptose de cardiomiócitos e inibindo o crescimento de fibroblastos [168,176-178].

Além da natriurese, diurese e vasodilatação, o BNP também tem efeitos diretos no coração [179] podendo fornecer proteção compensatória, pela inibição da apoptose do miocárdio e necrose, redução da hipertrofia cardíaca e diminuição de fibrose, pela inibição da proliferação de fibroblastos cardíacos [180]. O BNP também pode modular a reação imune e inflamatória à lesão cardíaca, aumentar a expressão de metaloproteinase-9 após o infarto do miocárdio (IM) e ter efeitos diretos no remodelamento da MEC [168,181].

Não encontramos na literatura estudos relacionando os peptídeos natriuréticos e a exposição pré-natal ao álcool mas, porém, é possível supor que, o aumento da expressão de mRNA destes dois peptídeos adiciona mais um fator

hipertrófico no perfil de expressão gênica observado em nosso estudo e, pode indicar, um esforço do organismo em diminuir o quadro hipertrófico ocasionado pela exposição pré-natal ao álcool.

O hormônio Endotelina-1, potente vasoconstritor e pró-inflamatório, age diretamente nos músculos lisos das artérias, estimulando a liberação de ANP e BNP no coração. Tirapelli *et al.* [182], não identificaram alterações significativas na expressão e concentração sérica de endotelina 1 na artéria carótida, mesmo após 10 semanas, em ratos Wistar adultos expostos ao volume alcoólico de 20% (v/v). Em nosso protocolo, também não observamos alterações na expressão gênica de *Edn1*.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é responsável pelo controle da pressão sanguínea, por meio do controle da vasodilatação e vasoconstrição. Nesse sistema, a enzima conversora de angiotensina converte a Angiotensina I em Angiotensina II (Ang II) causando vasoconstrição e, conseqüentemente, elevando a pressão sanguínea [183].

A síntese de Ang II pode ocorrer tanto em miócitos como em fibroblastos e miofibroblastos [184]. Os efeitos biológicos da Ang II são controlados pelos receptores de membrana AT1 e AT2. Ao interagir com o receptor AT1, associado à proteína G, ocorre estimulação da fosfolipase C, esta induz a formação de trifosfato de inositol, bem como, de diacilglicerol (DMA), provocando aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} . Essa cascata leva à ativação das proteínas quinases C (PKCs) e da adenilatociclase [184]. Simultaneamente, essa via também é capaz de induzir uma cascata de ativação via tirosinas-quinases [185], reguladoras de vias efetoras intracelulares, como das MAPKs, que ativam vários fatores de transcrição de proteínas nos cardiomiócitos. A enzima conversora de angiotensina, também degrada bradicinina [186] e estimula a produção de superóxido, reduzindo a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais [187,188]

Tan *et al.* [189] evidenciaram que a morte celular cardíaca induzida por álcool pode ser desencadeada por estresse nitrativo gerado a partir de uma via dependente de PKC β 1 e NOX, ativada por Ang II, através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, verificaram que a inibição de AT1 impediu o dano nitrativo

cardíaco, morte celular, remodelação e a disfunção. Nossos dados em relação a expressão dos genes Ace, Ace II e Agtr1a permitem supor que possa haver uma tentativa do organismo em compensar o desenvolvimento do quadro hipertrófico observado.

O fator de crescimento semelhante à insulina 1 é codificado pelo gene Igf-1 e é secretado, principalmente, pelo fígado em resposta ao hormônio do crescimento (GH), desempenhando papel importante na proliferação celular e inibição de apoptose, bem como, no desenvolvimento e manutenção do coração, participando no amadurecimento dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento embrionário [190,191]. Recentemente, de Souza *et al.* [192] verificaram que o aumento da expressão de Igf-1 está relacionado ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca fisiológica, principalmente após exercício, considerada como uma alteração positiva para o organismo. Em contrapartida, DeLaughter *et al.* [190] relataram que o aumento da expressão de Igf-1 em um modelo transgênico, induziu inicialmente um análogo da hipertrofia fisiológica, caracterizada por aumento da massa cardíaca e melhora do desempenho sistólico. No entanto, essa hipertrofia progrediu para uma condição patológica caracterizada por diminuição do desempenho sistólico e aumento da fibrose intersticial.

Estudos referentes à exposição pré-natal ao álcool atribuem ao Igf-1 um papel cardioprotetor. Chen *et al.* [193], utilizando cardiomiócitos fetais isolados de ratos tratados com 0,2% de EtOH, relacionaram o aumento de expressão de Igf-1 à supressão parcial da indução de Bax, da ativação de caspase 3 e da fragmentação do DNA, levando à diminuição da apoptose e, consequentemente, protegendo essas células da morte celular induzida pelo álcool. Goh *et al.* [194] demonstraram que essa regulação positiva induziu uma maturação acelerada e, consequentemente, aumento no tamanho dos cardiomiócitos fetais isolados de ovelhas expostos ao álcool durante o período gestacional, impedindo a apoptose nessas células. Além disso, a suprarregulação compensatória da expressão do gene Igf-1 já foi descrita em outros tecidos em apoptose [195,196].

Assim, podemos supor que o aumento observado na expressão de RNAm de Igf-1 em nosso estudo possa ser uma resposta compensatória do miocárdio ao aumento da apoptose causada pela exposição ao álcool,

adicionando mais um fator ao quadro hipertrófico observado. Além disso, alguns estudos observaram que o aumento na expressão de Igf-1 pós exposição pré-natal ao álcool está diretamente relacionado à expressão de proteínas C quinases (PKC), principalmente PKC- α [197].

As proteínas C quinases pertencem a uma família de proteínas quinases dependentes de serina e treonina, que podem ser ativadas pela fosfatidilserina, pelo cálcio (Ca^{2+}) e pelo diacilglicerol (PMA). São conhecidas por fosforilar uma ampla variedade de alvos proteicos e por estarem envolvidas em diversas vias de sinalização celular. Cada membro da família PKC tem um perfil de expressão específico e acredita-se que desempenhem papéis distintos nas células [198,199].

A isoforma α (gene *Prkca*) está envolvida na regulação positiva e negativa da proliferação celular, apoptose, diferenciação, migração e adesão celular, tumorigênese e inflamação. PKC- β , codificada pelo gene *Prkcb*, participa na sinalização de insulina, apoptose por estresse oxidativo, proliferação de células endoteliais e regulação da ativação de NF κ - β [198-200]. A isoforma γ , codificada pelo gene *Prkcg*, é raramente expressa em corações normais, sendo altamente expressa no SNC, principalmente no córtex e cerebelo, desempenhando diversos papéis em células neuronais e tecidos oculares. Além disso, está envolvida na sensibilidade e tolerância inicial ao etanol, mediando os efeitos comportamentais e, também, os efeitos desta droga nos receptores GABA_A [201,202].

Os cardiomiócitos saudáveis coexpressam múltiplas isoformas de Proteínas C quinases, sendo que vários estudos buscaram entender sua participação no metabolismo do coração e nas doenças cardiovasculares [197-203] (hipertrofia e insuficiência cardíaca), com especial interesse pelas isoformas clássicas (cPKC) α , β I, β II e δ . Em muitos modelos de lesão ou hipertrofia cardíaca, a expressão e/ou atividade de PKC- α foi aumentada, sendo relatada como prejudicial para o coração [198-200]. Entretanto não há um consenso na literatura se sua atividade está diretamente relacionada a hipertrofia cardíaca ou à regulação da contração cardíaca [198,199,204-207]. Outro aspecto importante é que Braz *et al.* [204] demonstraram que essa isoforma é extremamente

importante para o desenvolvimento dos cardiomiócitos durante o período gestacional.

A expressão e a atividade de PKC- β é aumentada na insuficiência cardíaca humana em estágio final [198]. Além disso, foi relatado que camundongos transgênicos que superexpressam PKC- β desenvolvem um fenótipo cardiomiopático mais grave, caracterizado por fibrose multifocal e calcificação distrófica, além de apresentarem contratilidade deprimida dos cardiomiócitos [199]. Em contraste, níveis médios de expressão de PKC- β em cardiomiócitos adultos levam a uma hipertrofia ventricular leve/progressiva e relaxamento diastólico prejudicado [208]. Ainda assim, é consenso que sua ativação está ligeiramente relacionada a um efeito cardioprotetor e como medida de adequação do coração à apoptose [200].

Não encontramos estudos relacionando a expressão das proteínas C quinases no coração e a exposição pré-natal ao álcool, mas estudos recentes mostraram que uma baixa exposição pré-natal ao álcool (5% v/v) foi capaz de aumentar significativamente a expressão gênica de PKC- α e PKC- γ no cérebro de camundongos. [202]. Além disso, aparentemente, as proteínas C quinases sofrem uma “ativação indireta” pelo álcool, que pode ser explicada pelo aumento de DMA, um dos seus substratos, após P.A.E. [209].

Esses dados permitem sugerir que o aumento na expressão dos genes *Prkca* e *Prkcb* nos animais P.A.E. seja uma tentativa do organismo para regular a contratilidade e o influxo de cálcio. Vale ressaltar, que o aumento na expressão gênica de PKC- α possa ser uma medida compensatória do organismo para controlar o quadro hipertrófico ativado pela superexpressão de Igf-1, dado ao fato que esta PKC é antagonista a ele [197].

Outra família importante no desenvolvimento do coração e nas doenças cardíacas é a superfamília das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que desempenham um papel crítico na transdução e regulação do sinal intracelular [210,211]. Estudos recentes demonstraram uma nova via de MAPK iniciada pela proteína quinase, quinase, quinase 2 ativada por mitógeno, como um contribuinte para hipertrofia cardíaca, desenvolvimento pulmonar e respostas inflamatórias e como um mediador chave na hipertensão pulmonar

[212,213]. Codificada pelo gene *Map3k2*, regula a entrada de diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento e estressores físico-químicos, além de sua participação na modulação das respostas inflamatórias em diversas células [214]. A partir do entendimento de sua função e participação na hipertrofia cardíaca, podemos supor que o aumento de expressão observado em nosso protocolo deste gene esteja possivelmente relacionado ao controle da via inflamatória na modulação da hipertrofia cardíaca.

As fibras miofilamentares também são importantes marcadores de hipertrofia. A isoforma alfa da miosina ($\text{MHC}\alpha$) mostrou-se regulada negativamente após exposição pré-natal ao álcool. A grande mudança na distribuição das isoformas de miosina ocorre durante a hipertrofia patológica mediada por sobrecarga de pressão e volume [215]. Esta hipertrofia está associada com a indução de $\text{MHC}\beta$ à custa de $\text{MHC}\alpha$. Esta mudança do fenótipo de α - para $\text{MHC}\beta$ é uma indicação de hipertrofia patológica, que é mais intensa na hipertrofia de sobrecarga de pressão que na de sobrecarga de volume [215].

A diminuição na expressão da cadeia pesada de miosina alfa ($\text{MHC}\alpha$) e o aumento na expressão da cadeia pesada de miosina beta ($\text{MHC}\beta$) prejudicam diretamente a capacidade contrátil do miocárdio após o IM [216,217]. Essas duas isoformas da miosina são componentes contráteis do miócito. A $\text{MHC}\alpha$ possui atividade ATPásica mais alta, o que gera uma contração cardíaca mais eficiente. Por outro lado, a $\text{MHC}\beta$ possui atividade ATPásica mais lenta, contribuindo para uma contração menos eficiente [218]. Assim, nossos dados de expressão gênica destas duas proteínas corroboram o perfil hipertrófico do ventrículo esquerdo de animais expostos ao álcool durante o desenvolvimento fetal.

Os componentes da MEC são responsáveis pelo suporte mecânico e funcionamento correto do sistema cardiovascular. Assim, uma alteração de expressão de componentes da MEC pode, ao longo do tempo, resultar diretamente em mudanças em propriedades mecânicas e comprometimento funcional.

A exposição ao álcool foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de colágeno I no ventrículo esquerdo, sendo que a expressão do RNAm de colágeno III manteve-se inalterada. Este fato é corroborado por relatos de vários

pesquisadores que apontaram, em diversas condições clínicas, o aumento significativo na expressão das fibras de colágeno tipo I como produto final quando o tecido está reparado. Este evento é observado, por exemplo, durante a insuficiência cardíaca em modelos animais e em pacientes humanos [160,219], enquanto o colágeno III é rapidamente sintetizado e gradualmente substituído por fibras colágeno I.

Observamos também, aumento na expressão do gene da Metaloproteinase-9 de matriz (Mmp-9). Estas, são capazes de degradar componentes proteicos da MEC, participando em diversos processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas [220-223].

Na falência cardíaca, o colágeno é degradado e substituído por fibras de colágenas com baixa capacidade de interação, pela ação das MMPs, levando à dilatação dos ventrículos [224]. Além disso, a quebra da MEC libera moléculas com potente efeito na síntese de matriz, tais como fatores de crescimento de ligação à matriz e as matriquinas, que são peptídeos de matriz fragmentados com atividade biológica na regulação da atividade das células do tecido conjuntivo, levando, muitas vezes, a um aumento das MMPs e da fibrose [220]. Além disso, o aumento de MMP 9 está associado à maturação do colágeno I e III em indivíduos com IC, indicando a importância dessas enzimas na configuração, ativação e deposição do colágeno no processo de fibrose [223].

Apesar de não termos analisado histologicamente, há indícios que possa ter havido uma ativação da transcrição de genes relacionados ao reparo provocado pelo insulto do álcool. A elevada expressão de TGF- β 1, um estímulo persistente na fase de reparação em hipertrofia e uma citocina pró-fibrótica chave corrobora esta especulação. Em caso de terapia anti-TGF- β 1 há uma atenuação do remodelamento cardíaco, afetando a dinâmica fibrose/infarto nos tecidos cardíacos [225].

Assim, as proteínas da MEC, especialmente em relação aos resultados de expressão de RNAm de colágeno I, TGF e metaloproteinase de matriz 9 sugerem um possível início de mecanismo de transdução de sinais moleculares fundamentais para o processo de reparação cardíaca [226].

Este trabalho evidenciou que o consumo de álcool durante a gestação, mesmo em concentrações baixas a moderada pode trazer repercussões cardíacas que se manifestam morfolologicamente com uma discreta hipertrofia e com inúmeras alterações moleculares semelhantes às observadas em animais infartados experimentalmente [145]. A ativação da transcrição de genes específicos e uma possível repercussão da tradução destas mensagens evidenciam o efeito deletério silencioso do álcool na homeostase e suscetibilidade às doenças cardíacas. Esses efeitos adversos sobre o miocárdio podem não afetar a função cardíaca em curto prazo, mas podem ser aumentar a vulnerabilidade cardíaca em longo prazo [194].

6. Considerações finais

Em nosso modelo experimental, a exposição pré-natal ao álcool resultou em modificações morfométricas e na alteração da expressão de diversos genes relacionados à hipertrofia cardíaca. Nossos dados sugerem que estas mudanças evidenciam o início de alterações do *milieu* miocárdico relacionadas à lesão e remodelamento cardíaco.

7. Referências bibliográficas

1. Sales E. Aspectos da história do álcool e do alcoolismo no século XIX. *Cadernos de Hist. UFPE*. 2010; 7(7): 167-203.
2. Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Rev. psiquiatr. clín.* 2008; 35(Supl1): 21-4. doi: [10.1590/S0101-60832008000700006](https://doi.org/10.1590/S0101-60832008000700006)
3. Tillonen J. Ethanol, acetaldehyde and gastrointestinal flora [Dissertação]. Helsinki: Research Unit of Alcohol Diseases, University of Helsinki; 2000. 81 p. ISBN [952-91-2603-4](https://www.isbn-international.org/product/952-91-2603-4)
4. WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. 478 p. ISBN [978-92-4-156563-9](https://www.isbn-international.org/product/978-92-4-156563-9)
5. Rehm J, Baliunas D, Borges GLG, Graham K, Irving H, Kehoe T. et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction*. 2010 Apr; 105(5): 817-43. doi: [10.1111/j.1360-0443.2010.02899.x](https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.02899.x)
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 424 p.:il. ISBN [978-85-334-2701-3](https://www.isbn-international.org/product/978-85-334-2701-3)
7. Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res. Health*. 2000; 24(2): 93-104. PMID: [11199283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11199283/)
8. Warren KR, Hewitt BG, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Research Challenges and Opportunities. *Alcohol Res. Health*. 2011; 34(1): 4-14. PMID: [23580035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580035/)
9. Eberhart JK, Parnell SE. The Genetics of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2016 Apr; 40(6): 1154-65. doi: [10.1111/acer.13066](https://doi.org/10.1111/acer.13066)
10. Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG. Effects of prenatal alcohol exposure (P.A.E.): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem. Cell. Biol*. 2018 Apr; 96(2): 131-47. doi: [10.1139/bcb-2017-0280](https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0280)
11. Jordão Junior AA, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathione reduzida e da vitamina E. *Med. Ribeirão Preto*. 1998; 31(3): 434-49. doi: [10.11606/issn.2176-7262.v31i3p434-449](https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v31i3p434-449)
12. Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug. Metab. Rev*. 2004 Oct; 36(3-4): 511-29. doi: [10.1081/DMR-200033441](https://doi.org/10.1081/DMR-200033441).
13. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2010 May-Jun; 3(3): 178-85. doi: [10.4161/oxim.3.3.12288](https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12288).
14. Mincis M, Mincis R. Álcool e o fígado. *GED*. 2011; 30(4): 152-62.
15. Aguiar AS, Silva VA, Boaventura GT. As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? *Nutrição em Pauta*. 2007; s/v: 45-9.
16. Matos LC. Doença Hepática Alcoólica (DHA). *Rev. Soc. Port. Med. Int*. 2003; 13(3): 207-16.
17. Maher JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res. World*. 1997; 21(1): 5-12. PMID: [15706758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15706758/)
18. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012 Mar; 139(5): 829-41. doi: [10.1242/dev.060426](https://doi.org/10.1242/dev.060426)

19. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen Embriologia Humana. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. 899 p. i.l. ISBN [978-85-352-8338-9](#)
20. Mazzu-Nascimento T, Melo DG, Morbioli GG, Carrilho E, Vianna FSL, da Silva AA. et al. Teratogens: a public health issue – a Brazilian overview. Genet. Mol. Biol. 2017 Apr-Jun; 40(2): 387-97. doi: [10.1590/1678-4685-GMB-2016-0179](#)
21. Alves-Santos NH, Cocate PG, Benaim C, Farias DR, Emmett PM, Kac G. Prepregnancy dietary patterns and their association with perinatal outcomes: A prospective cohort study. J. Acad. Nutr. Diet. 2019 Sep; 119(9): 1439-51. doi: [10.1016/j.jand.2019.02.016](#)
22. Sulik KK. Chapter 26 - Fetal alcohol spectrum disorder: pathogenesis and mechanisms. Sullivan EV [ed]. Alcohol and the Nervous System. Handb. Clin. Neurol. 2014 ;125: 463-75. doi: [10.1016/B978-0-444-62619-6.00026-4](#)
23. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. In utero alcohol exposure and the alteration of histone marks in the developing fetus: An epigenetic phenomenon of maternal drinking. Int. J. Biol. Sci. 2017 Sep 5; 13(9):1100-08. doi: [10.7150/ijbs.21047](#)
24. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. Gestational alcohol exposure altered DNA methylation status in the developing fetus. Int. J. Mol. Sci. 2017 Jun; 18(7): 1386-400. doi: [10.3390/ijms18071386](#)
25. Shepard TH. Detection of human teratogenic agents. J. Pediatr. 1982 Nov; 101(5): 810-15. doi: [10.1016/S0022-3476\(82\)80338-7](#)
26. Finnell RH. Teratology: General considerations and principles. J. Allergy Clin. Immunol. 1999 Feb; 103(2 Pt2): S337-42. doi: [10.1016/S0091-6749\(99\)70259-9](#)
27. Freire TM, Machado JC, Melo EV, Melo DG. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]. 2005 Jul; 27(7): 376-81. doi: [10.1590/S0100-72032005000700002](#)
28. May PA, Hasken JM, Blankenship J, Marais A-S, Joubert B, Cloete M. et al. Breastfeeding and maternal alcohol use: Prevalence and effects on child outcomes and fetal alcohol spectrum disorders. Reprod. Toxicol. 2016 Aug; 63:13-21. doi: [10.1016/j.reprotox.2016.05.002](#)
29. Spahn JM, Callahan EH, Spill MK, Wong YP, Benjamin-Neelon SE, Birch. et al. Influence of maternal diet on flavor transfer to amniotic fluid and breast milk and children's responses: a systematic review. Am. J. Clin. Nutr. 2019 Mar; 109(Supp_7):1003S-1026S. doi: [10.1093/ajcn/nqy240](#)
30. Grinfeld, H. Capítulo 1. Alcoolismo feminino durante a gestação. p. 19-37. Em: Segre CAM [Coord.]. Efeitos do álcool na gestante, no feto e no recém-nascido. São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo. 2010. 79 p. ISBN [978-85-62773-01-3](#)
31. Mennella J. Alcohol's effect on lactation. Alcohol Res. Health. 2001; 25(3): 230-4. PMID: [11810962](#)
32. Carey LC, Coyle P, Philcox JC, Rofe AM. Maternal ethanol exposure is associated with decreased plasma zinc and increased fetal abnormalities in normal but not metallothionein-null mice. Alcohol. Clin. Exp. Res. 2000 Feb; 24(2): 213-9. doi: [10.1111/j.1530-0277.2000.tb04593.x](#)
33. Kingdon D, Cardoso C, McGrath JJ. Research review: Executive function deficits in fetal alcohol spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity

- disorder – a meta-analysis. *J. Child. Psychol. Psychiatr.* 2016 Feb; 57(2): 116-31. doi: [10.1111/jcpp.12451](https://doi.org/10.1111/jcpp.12451).
34. Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J, Burd L, Popova S. Global prevalence of fetal alcohol spectrum disorder among children and youth: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2017 Oct; 171(10): 948-56. doi: [10.1001/jamapediatrics.2017.1919](https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1919)
 35. Idrus NM, Thomas JD. Fetal alcohol spectrum disorders: Experimental treatments and strategies for intervention. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 76-85. PMID: [23580044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580044/)
 36. Zhang Y, Wang H, Li Y, Peng Y. A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2018 Dec; 71: 140-5. doi: [10.1016/j.ijdevneu.2018.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.09.001)
 37. Reidpath DD, Allotey P. Infant mortality rate as an indicator of population health. *J. Epidemiol. Community Health.* 2003 May; 57(5): 344-6. doi: [10.1136/jech.57.5.344](https://doi.org/10.1136/jech.57.5.344)
 38. Jones KL. The effects of alcohol on fetal development. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* 2011 Mar; 93(1):3-11. doi: [10.1002/bdrc.20200](https://doi.org/10.1002/bdrc.20200)
 39. Bailey BA, Sokol RJ. Prenatal alcohol exposure and miscarriage, stillbirth, preterm delivery, and sudden infant death syndrome. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 86-91. PMID: [23580045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580045/)
 40. Reis AT, Santos RS, Mendes TAR. Prevalência de malformações congênitas no município do Rio de Janeiro, Brasil, entre 2000 e 2006. *Rev. Enf. UERJ.* 2011 Jul-Sep; 19(3):364-8.
 41. Fontoura FC, Cardoso MVLML. Associação das malformações congênitas com variáveis neonatais e maternas em unidades neonatais numa cidade do nordeste brasileiro. *Texto contexto - enferm.* 2014 Oct-Dec; 23(4): 907-14. doi: [10.1590/0104-07072014002320013](https://doi.org/10.1590/0104-07072014002320013)
 42. Mendes IC, Jesuino RSA, Pinheiro DS, Rebelo ACS. Anomalias congênitas e suas principais causas evitáveis: uma revisão. *Rev. Méd. Minas Gerais.* 2018; 28(e-1977): 2-6. doi: [10.5935/2238-3182.20180011](https://doi.org/10.5935/2238-3182.20180011)
 43. Oliveira-Brancati CIF, Ferrarese VCC, Costa AR, Fett-Conte AC. Birth defects in Brazil: Outcomes of a population-based study. *Genet. Mol. Biol.* 2020 Feb; 43(1): e20180186. doi: [10.1590/1678-4685-GMB-2018-0186](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0186)
 44. DATASUS. Informações de saúde (TABNET) [homepage na internet]. Epidemiológicas e morbidade. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos, 2008-2017 [acesso em: 15 out 2019]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>
 45. Cosme HW, Lima LS, Barbosa LG. Prevalência de anomalias congênitas e fatores associados em recém-nascidos do município de São Paulo no período de 2010 a 2014. *Rev. Paul. Pediatr.* 2017 Mar; 35(1): 33-8. doi: [10.1590/1984-0462/2017;35;1;00002](https://doi.org/10.1590/1984-0462/2017;35;1;00002)
 46. Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Global Health.* 2017 Mar; 5(3):e290-9. doi: [10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9)
 47. Passini Junior R. Alcohol consumption during pregnancy. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2005 Jul; 27(7): 373-5. doi: [10.1590/S0100-72032005000700001](https://doi.org/10.1590/S0100-72032005000700001)
 48. Fiorentin CF, Vargas D. O uso de álcool entre gestantes e os seus conhecimentos sobre os efeitos do álcool no feto. *SMAD, Rev. Eletr. Saúde*

- Mental Álcool Drog. 2006; 2(2): 01-16. doi: [10.11606/issn.1806-6976.v2i2p01-16](https://doi.org/10.11606/issn.1806-6976.v2i2p01-16)
49. Gouvea PB, Souza SNDH, Haddad MCL, Mello DF. Avaliação do consumo de álcool entre gestantes cadastradas no SISPRENATAL em Londrina/PR. *Cogitare Enfer.* 2010; 15(4): 624-30.
 50. Kaup ZOL, Merighi MAB, Tsunechiro MA. Avaliação do consumo de bebida alcoólica durante a gravidez. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2001 Oct; 23(9): 575-80. doi: [10.1590/S0100-72032001000900005](https://doi.org/10.1590/S0100-72032001000900005)
 51. Sbrana M, Grandi C, Brazan M, Junquera N, Nascimento MS, Barbieri MA. et al. Alcohol consumption during pregnancy and perinatal results: a cohort study. *Sao Paulo Med. J.* 2016; 134(2): 146-52. doi: [10.1590/1516-3180.2015.02040211](https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.02040211)
 52. Ernhart CB, Morrow-Tlucak M, Sokol RJ, Martier S. Underreporting of alcohol use in pregnancy. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1988 Aug; 12(4): 506-11. doi: [10.1111/j.1530-0277.1988.tb00233.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1988.tb00233.x)
 53. Burns L, Mattick RP, Wallace C. Smoking patterns and in a population of pregnant women with other substance use disorders. *Nicotine Tob. Res.* 2008 Jun; 10(6): 969-74. doi: [10.1080/14622200802097548](https://doi.org/10.1080/14622200802097548)
 54. Guttlein L, Macchione AF, Hernández-Fonseca K, Haymal OB, Molina JC, Ubach MM. et al. Maternal manipulation during late gestation (PGs 17-20) enhances ethanol consumption and promotes changes and opioid mRNA expression in infant rats. *Behav. Brain Res.* 2019 Aug; 368: 111908. doi: [10.1016/j.bbr.2019.111908](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111908)
 55. Hoyme HE, Kalberg WO, Elliott AJ, Blankenship J, Buckley D, Marais AS et al. Updated clinical guidelines for diagnosing fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics.* 2016 Aug; 138(2): e20154256. doi: [10.1542/peds.2015-4256](https://doi.org/10.1542/peds.2015-4256)
 56. Wiczorek L, Fish EW, O'Leary-Moore SK, Parnell SE, Sulik KK. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and behavioral dysfunction following early binge-like prenatal alcohol exposure in mice. *Alcohol.* 2015 May; 49(3): 207-17. doi: [10.1016/j.alcohol.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.01.005)
 57. Boa-Amponsem O, Zhang C, Mukhopadhyay S, Ardrey I, Cole GJ. Ethanol and cannabinoids interact to alter behavior in a zebrafish fetal alcohol spectrum disorder model. *Birth Defects Res.* 2019 Jul; 111(12): 775-88. doi: [10.1002/bdr2.1458](https://doi.org/10.1002/bdr2.1458)
 58. May PA, Tabachnick B, Hasken JM, Marais A-S, De Vries MM, Barnard R et al. Who is most affected by prenatal alcohol exposure: Boys or girls? *Drug Alcohol Dep.* 2017 Aug; 177: 258-67. doi: [10.1016/j.drugalcdep.2017.04.010](https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.04.010)
 59. Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Les enfants des parents alcooliques. Anomalies observées à propos de 127 cas. *Ouest Médical.* 1968; 25:476-82. doi: [10.1097/00007691-200304000-00002](https://doi.org/10.1097/00007691-200304000-00002)
 60. Jones K, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet.* 1973 Nov; 302(7836): 999-1001. doi: [10.1016/S0140-6736\(73\)91092-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91092-1)
 61. Jones K, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth AP. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet.* 1973 Jun; 1(7815):1267-71. doi: [10.1016/S0140-6736\(73\)91291-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91291-9)
 62. May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res. Health.* 2001; 25(3): 159-67. PMID: [11810953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11810953/)

63. May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M. et al. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 2009 Sep; 15(3): 176-92. doi: [10.1002/ddrr.68](https://doi.org/10.1002/ddrr.68)
64. Bakhireva LN, Savage DD. Focus on: biomarkers of fetal alcohol exposure and fetal alcohol effects. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 56-63. PMID: [23580042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580042/)
65. Pinson MR, Miranda RC. Noncoding RNAs in development and teratology, with focus on effects of cannabis, cocaine, nicotine, and ethanol. *Birth Defects Res.* 2019 Oct; 111(17):1308-19. doi: [10.1002/bdr2.1559](https://doi.org/10.1002/bdr2.1559)
66. Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CA, Chadi G. Fetal alcohol syndrome in São Paulo, Brazil. *Paediatr. Perinatal Epidemiol.* 1999 Oct; 13(4): 496-7. doi: [10.1046/j.1365-3016.1999.00201.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3016.1999.00201.x)
67. Baptista FH, Rocha KBB, Martinelli JL, Avó LRS, Ferreira RA, Germano CMR, Melo DG. Prevalência e fatores associados ao consumo de álcool durante a gravidez. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.* 2017 Apr-Jun; 17(2): 271-9. doi: [10.1590/1806-93042017000200004](https://doi.org/10.1590/1806-93042017000200004)
68. O'Leary CM, Elliott EJ, Nassar N, Bower C. Exploring the potential to use data linkage for investigating the relationship between birth defects and prenatal alcohol exposure. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 2013 Jul; 97(7): 497-504. doi: [10.1002/bdra.23142](https://doi.org/10.1002/bdra.23142)
69. Mattson SN, Foroud T, Sowell ER, Jones KL, Coles CD, Fagerlund A. et al. Collaborative initiative on fetal alcohol spectrum disorders: methodology of clinical projects. *Alcohol.* 2009 Nov-Dec; 44(7-8): 635-641. doi: [10.1016/j.alcohol.2009.08.005](https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.08.005)
70. Burd L, Deal E, Rios R, Adickes E, Wynne J, Klug MG. Congenital heart defects and fetal alcohol spectrum disorders. *Congenit. Heart Dis.* 2007 Jul-Aug; 2(4):250-5. doi: [10.1111/j.1747-0803.2007.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1747-0803.2007.00105.x)
71. Carter RC, Jacobson JL, Sokol RJ, Avison MJ, Jacobson SW. Fetal alcohol-related growth restriction from birth through young adulthood and moderating effects of maternal prepregnancy weight. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2013 Mar; 37(3):452-62. doi: [10.1111/j.1530-0277.2012.01940.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01940.x)
72. Coriale G, Fiorentino D, Di Lauro D, Marchitelli R, Scalese B, Fiore M. et al. Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD): neurobehavioral profile, indications for diagnosis and treatment. *Rev. Psichiatr.* 2013 Sep-Oct; 48(5): 359-69. doi: [10.1708/1356.15062](https://doi.org/10.1708/1356.15062)
73. Akers KG, Kushner SA, Leslie AT, Clarke L, Van der Kooy E, Lerch JP. et al. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. *Mol. Brain.* 2011 Jul; 4(29): 2-15. doi: [10.1186/1756-6606-4-29](https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-29)
74. Henriksen TB, Hjollund NH, Jensen TK, Bonde JP, Andersson AM, Kolstad H. et al. Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. *Am. J. Epidemiol.* 2004 Oct; 160(7):661-7. doi: [10.1093/aje/kwh259](https://doi.org/10.1093/aje/kwh259)
75. Kesmodel U, Kesmodel PS. Drinking During Pregnancy: Attitudes and Knowledge Among Pregnant Danish Women, 1998. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2002 Oct; 26(10): 1553-60. doi: [10.1111/j.1530-0277.2002.tb02455.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02455.x)
76. Patra J, Taylor B, Irving H, Roerecke M, Baliunas D, Mohapatra S. et al. Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types - a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2010 May; 10: 258. doi: [10.1186/1471-2458-10-258](https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-258)

77. Altura BM, Zhang A, P-OC, Altura BT. Exposure of piglet coronary arterial muscle cells to low alcohol results in elevation of intracellular free Ca^{2+} : relevance to fetal alcohol syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 1996 Oct; 314(3): R9-11. doi: [10.1016/S0014-2999\(96\)00739-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00739-X)
78. Shankar K, Hidestrand M, Liu X, Xiao R, Skinner CM, Simmen FA. et al. Physiologic and genomic analyses of nutrition-ethanol interactions during gestation: Implications for fetal ethanol toxicity. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2006 Sep; 231(8): 1379-97. doi: [10.1177/153537020623100812](https://doi.org/10.1177/153537020623100812)
79. Jones KL, Robinson LK, Bakhireva LN, Marintcheva G, Storojev V, Strahova A. et al. Accuracy of the diagnosis of physical features of fetal alcohol syndrome by pediatricians after specialized training. *Pediatrics.* 2006 Dec; 118(6): e1734-8. doi: [10.1542/peds.2006-1037](https://doi.org/10.1542/peds.2006-1037)
80. Chudley A, Conry J, Cook JL, Looock C, Rosales T, LeBlanc N, Public Health Agency of Canada's National Advisory Committee on Fetal Alcohol Spectrum Disorder. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *CMAJ.* 2005 Mar; 172(5 Suppl): S1-S21. doi: [10.1503/cmaj.1040302](https://doi.org/10.1503/cmaj.1040302)
81. Wilson SEDVM, Cudd, TADVM. Focus On: The Use of Animal Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 92-8. PMID: [23580046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580046/)
82. Tanguay RL, Reimers MJ. Analysis of ethanol developmental toxicity in zebrafish. *Methods in Molecular Biology.* 2008; 447: 63-74. doi: [10.1007/978-1-59745-242-7_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-242-7_5)
83. Wilcoxon JS, Kuo AG, Disterhoft JF, Redei EE. Behavioral deficits associated with fetal alcohol exposure are reversed by prenatal thyroid hormone treatment: a role for maternal thyroid hormone deficiency in FAE. *Mol. Psychiatry.* 2005 Oct; 10(10): 961-71. doi: [10.1038/sj.mp.4001694](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001694)
84. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007; 28(1):11-23.
85. Levine JE. Chapter 26. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Plant TM, Zeleznik A. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol. 2. 4. ed. Londres: Academic Press; 2015. ISBN [0123971756](https://www.isbn-international.org/product/9780123971756)
86. Santos BF. Criação e Manejo de Camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2002. [acesso em: 10 jul 2019]. Disponível em: SciELO Books. ISBN [85-7541-015-6](https://www.isbn-international.org/product/9788575410156).
87. Gu Y, Jayatilak PG, Parmer TG, Gauldie J, Fey GH, Gibori G. Alpha 2-macroglobulin expression in the mesometrial decidua and its regulation by decidual luteotropin and prolactin. *Endocrinology.* 1992 Sep; 131(3): 1321-8. doi: [10.1210/endo.131.3.1380439](https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1380439)
88. Candeloro L, Zorn TM. Granulated and non-granulated decidual prolactin-related protein-positive decidual cells in the pregnant mouse endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007 Feb; 57(2): 122-32. doi: [10.1111/j.1600-0897.2006.00452.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00452.x)
89. Tillonen J, Väkeväinen S, Salaspuro V, Zhang Y, Rautio M, Jousimies-Somer H. et al. Metronidazole increases intracolonic but not peripheral blood acetaldehyde in chronic ethanol-treated rats. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 2000 Apr; 24(4):570-5. doi: [10.1111/j.1530-0277.2000.tb02026.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb02026.x)
90. Allan AM, Chynoweth J, Tyler LA, Caldwell KK. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. *Alcohol. Clin. Exp.*

- Res. 2003 Dec; 27(12): 2009-16. doi: [10.1097/01.ALC.0000100940.95053.72](https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000100940.95053.72)
91. Bird CW, Baculis BC, Mayfield JJ, Chavez GJ, Ontiveros T, Paine DJ. et al. The brain-derived neurotrophic factor VAL68MET polymorphism modulates how developmental ethanol exposure impacts the hippocampus. *Genes Brain Behav.* 2019 Mar; 18(3): e12484. doi: [10.1111/gbb.12484](https://doi.org/10.1111/gbb.12484)
 92. Ninh VK, El Hajj EC, Mouton AJ, Gardner JD. Prenatal alcohol exposure causes adverse cardiac extracellular matrix changes and dysfunction in neonatal mice. *Cardiovasc. Toxicol.* 2019 Oct; 19(5): 389-400. doi: [10.1007/s12012-018-09503-8](https://doi.org/10.1007/s12012-018-09503-8)
 93. Gilbert-Barness E. Teratogenic causes of malformations. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2010; 40(2): 99-114. PMID: [20421621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20421621/)
 94. Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res. Health.* 2007; 30(1): 5-13. PMID: [17718394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17718394/)
 95. Boschen KE, Gong H, Murdaugh LB, Parnell SE. Knockdown of Mns1 increases susceptibility to craniofacial defects following gastrulation-stage alcohol exposure in mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2018 Nov; 42(11): 2136-43. doi: [10.1111/acer.13876](https://doi.org/10.1111/acer.13876)
 96. Carmo JC do, Peters VM, Guerra M de O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos conforme a datação do início da prenhez: [revisão]. *Bol. Centro Biol. Reprod.* 2004; 26(1/2): 52-59. LILACS: [lil-586321](https://lilacs.bvs.br/lil-586321)
 97. Serano M, Han M, Brinez P, Linask KK. Fetal alcohol syndrome: Cardiac birth defects in mice and prevention with folate. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010 Jul; 203(1):75.e7-75.e15. doi: [10.1016/j.ajog.2010.03.017](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.03.017)
 98. Linask KK, Huhta JC. Use of Doppler echocardiography to monitor embryonic mouse heart function. *Methods Mol. Bio.* 2000; 135: 245–252. PMID: [10791321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10791321/)
 99. Grewal J, Carmichael SL, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM. Maternal periconceptional smoking and alcohol consumption and risk for select congenital anomalies. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 2008 Jul; 82(7): 519-26. doi: [10.1002/bdra.20461](https://doi.org/10.1002/bdra.20461)
 100. Parkington HC, Coleman HA, Wintour EM, Tare M. Prenatal alcohol exposure: Implications for cardiovascular function in the fetus and beyond. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010 Feb; 37(2):e91-8. doi: [10.1111/j.1440-1681.2009.05342.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05342.x)
 101. Gray SP, Denton KM, Cullen-McEwen L, Bertram JF, Moritz KM. Prenatal exposure to alcohol reduces nephron number and raises blood pressure in progeny. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Nov; 21(11): 1891-902. doi: [10.1681/ASN.2010040368](https://doi.org/10.1681/ASN.2010040368)
 102. Mesquita MA, Segre CA de M. Frequência dos efeitos do álcool no feto e padrão de consumo de bebidas alcoólicas pelas gestantes de maternidade pública da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Crescimento desenvolv. Hum.* 2009 Apr; 19(1): 63-77.
 103. Rojmahamongkol P, Cheema-Hasan A, Weitzman C. Do pediatricians recognize fetal alcohol spectrum disorders in children with developmental and behavioral problems? *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2015 Apr; 36(3): 197-202. doi: [10.1097/DBP.0000000000000146](https://doi.org/10.1097/DBP.0000000000000146)

104. Turcotte LA, Aberle NS, Norby FL, Wang GJ, Ren J. Influence of prenatal ethanol exposure on vascular contractile response in rat thoracic aorta. *Alcohol*. 2002 Feb; 26(2): 75-81. doi: [10.1016/s0741-8329\(01\)00198-7](https://doi.org/10.1016/s0741-8329(01)00198-7)
105. Yuan F, Lei Y, Wang Q, Esberg LB, Huang Z, Scott GI. et al. Moderate ethanol administration accentuates cardiomyocyte contractile dysfunction and mitochondrial injury in high fat diet-induced obesity. *Toxicol. Lett.* 2015 Mar; 233(3): 267-77. doi: [10.1016/j.toxlet.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.018)
106. Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006 Sep; 291(3): H1015-26. doi: [10.1152/ajpheart.00023.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00023.2006)
107. Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. A new hope. *Circ. J.* 2016 Oct; 80(11): 2269-76. doi: [10.1253/circj.CJ-16-1003](https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-1003)
108. Deb A, Ubil E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014 May; 70:47-55. doi: [10.1016/j.yjmcc.2014.02.017](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.017)
109. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circ. Res.* 2009 Dec; 105(12): 1164-76. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.109.209809](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209809)
110. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 2011 Jun; 91(6): 535-50. doi: [10.1002/bdra.20810](https://doi.org/10.1002/bdra.20810)
111. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PGNF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res.* 2010 Jun; 106(11): 1675-80. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.217737](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217737)
112. Prioste RN, Casagrande CI, Hungaro CM, Nunes DA, Bueno ÉA, Bordin L. et al. Alterações no metabolismo da homocisteína induzidas por aguardente de cana-de-açúcar. *J. bras. patol. med. lab.* 2003 Jul-Sep; 39(3):203-06. LILACS [lil-349001](https://lilacs.bvs.br/lil-349001)
113. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism.* 1987 May; 36(5): 458-62. doi: [10.1016/0026-0495\(87\)90043-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90043-6)
114. Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A, Vargas CR, Wyse ATS. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺,K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab. Brain Dis.* 2013 Mar; 29(1):153-60. doi: [10.1007/s11011-013-9451-x](https://doi.org/10.1007/s11011-013-9451-x)
115. Kobor MS, Weinberg J. Focus On: epigenetics and fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 29-37. PMID: [23580038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580038/)
116. Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc. Toxicol.* 2011 Mar; 11(1): 67-73. doi: [10.1007/s12012-010-9094-7](https://doi.org/10.1007/s12012-010-9094-7)
117. Sprince H, Parker CM, Smith GG, Gonzales LJ. Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid. *Agents Actions.* 1974 Apr; 4(2): 125-30. doi: [10.1007/BF01966822](https://doi.org/10.1007/BF01966822)
118. Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DA. Hiper-Homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. *Arq. Bras. Cardiol.* 1998 Jul; 71(1):69-76. doi: [10.1590/S0066-782X1998000700013](https://doi.org/10.1590/S0066-782X1998000700013)

119. Loureiro SO, Romão L, Alves T, Fonseca A, Heimfarth L, Moura Neto V. et al. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res.* 2010 Oct; 8(1355): 151-64. doi: [10.1016/j.brainres.2010.07.071](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.071)
120. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2004 Oct; 40(5): 311-20. doi: [10.1590/S1676-24442004000500006](https://doi.org/10.1590/S1676-24442004000500006)
121. Nguyen VB, Probyn ME, Campbell F, Yin KV, Samuel CS, Zimanyi MA. et al. Low-dose maternal alcohol consumption: effects in the hearts of offspring in early life and adulthood. *Physiol. Rep.* 2014 Jul; 2(7): e12087. doi: [10.14814/phy2.12087](https://doi.org/10.14814/phy2.12087)
122. Walton SL, Tjongue M, Tare M, Kwok E, Probyn M, Parkington HC. et al. Chronic low alcohol intake during pregnancy programs sex-specific cardiovascular deficits in rats. *Biol. Sex. Differ.* 2019 Apr; 10(1): 21. doi: [10.1186/s13293-019-0235-9](https://doi.org/10.1186/s13293-019-0235-9)
123. Lander ES, Weinberg, RA. Genomics: journey to the center of biology. *Science.* 2000 Mar; 287(5459): 1777-82. doi: [10.1126/science.287.5459.1777](https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1777)
124. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res.* 2006 May; 34(8): 2428-37. doi: [10.1093/nar/gkl287](https://doi.org/10.1093/nar/gkl287)
125. Brown TA. Chapter 1. The human genome. In: *Genomes*. 2.ed. Oxford: Wiley-Liss; 2002 [Acesso: 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>
126. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P; Baltimore D, Darnell J. The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. In: *Molecular Cell Biology*. 4.ed. New York: W. H. Freeman; 2000. [Acesso: 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
127. Caron H, Van Schaik B, Van der Mee M, Baas F, Riggins G, Van Sluis P. et al. The Human Transcriptome Map: Clustering of Highly Expressed Genes in Chromosomal Domains. *Science.* 2001 Feb; 291(5507):1289-92. doi: [10.1126/science.1056794](https://doi.org/10.1126/science.1056794)
128. Alberts B, Bray D, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. et al. *Fundamentos da biologia celular*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. ISBN [978-85-363-2513-2](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x)
129. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic. Sci.* 2006 Mar; 51(2): 253-65. doi: [10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x)
130. Aronson JK, Ferner, RE. Biomarkers-A general review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017 Mar; 76:9.23.1-17. doi: [10.1002/cpph.19](https://doi.org/10.1002/cpph.19)
131. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006 May; 113(19): 2335–62. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570)
132. Azuaje F, Devaux Y, Wagner D. Computational Biology for cardiovascular biomarker discovery. *Brief Bioinform.* 2009 Jul; 10(4): 367-77. doi: [10.1093/bib/bbp008](https://doi.org/10.1093/bib/bbp008)
133. Hocher B. Fetal programming of cardiovascular diseases in later life - mechanisms beyond maternal undernutrition. *J. Physiol.* 2007 Mar; 579(Pt 2): 287-8. doi: [10.1113/jphysiol.2007.127738](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.127738)

134. Yao B, Christian KM, Chuan H, Peng J, Guo-Li M, Song H. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016 Sep; 17(9): 537-49. doi: [10.1038/nrn.2016.70](https://doi.org/10.1038/nrn.2016.70)
135. Mendes CQS, Avena MJ, Mandetta MA, Balieiro MMFG. Prevalência de nascidos vivos com anomalias congênitas no município de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Enf. Pediat.* 2015; 15(1): 7-12.
136. Caldwell KK, Solomon ER, Smoake JJW, Djatche De Kamgaing CD, Allan AM. Sex-specific deficits in biochemical but not behavioral responses to delay fear conditioning in prenatal alcohol exposure mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 2018 Dec; 156: 1-16. doi: [10.1016/j.nlm.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.10.002)
137. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. 1.ed. Londres: CRC Press; 1988. 176 p. ISBN [9780849349348](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.10.002)
138. Torloni MR, Nakamura UM, Megale A, Sanchez VHS, Mano C, Fusaro AS, Mattar R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2007;29(5):267-75. doi: [10.1590/S0100-72032007000500008](https://doi.org/10.1590/S0100-72032007000500008)
139. Fritz H, Hess R. Prenatal development in the rat following administration of cyclamate, saccharin and sucrose. *Experientia.* 1968 Nov; 24(11): 1140-1. doi: [10.1007/BF02147812](https://doi.org/10.1007/BF02147812)
140. Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ Jr, Kling TG. Placental transmission and fetal distribution of saccharin in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1971 Sep; 111(2): 280-6. doi: [10.1016/0002-9378\(71\)90903-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(71)90903-3)
141. Abate P, Hernández-Fonseca K, Reyes-Guzmán AC, Barbosa-Luna IG, Méndez M. Prenatal ethanol exposure alters met-enkephalin expression in brain regions related with reinforcement: Possible mechanism for ethanol consumption in offspring. *Behav. Brain Res.* 2014 Nov; 274: 194-204. doi: [10.1016/j.bbr.2014.08.022](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.022)
142. Villain H, Benkahoul A, Birmes P, Ferry B, Rouillet P. Influence of early stress on memory reconsolidation: Implications for post-traumatic stress disorder treatment. *PLoS ONE.* 2018 Jan; 13(1): e0191563. doi: [10.1371/journal.pone.0191563](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191563)
143. Sanchez Vega MC, Chong S, Burne THJ. Prenatal vitamin D deficiency does not exacerbate behavioural impairments associated with prenatal ethanol exposure in juvenile male mice. *Behav. Brain Res.* 2019 Jan; 356:127-36. doi: [10.1016/j.bbr.2018.08.018](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.018)
144. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am. J. Physiol.* 1982 Dec; 243(6): H941-7. doi: [10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941)
145. Santana ET, Feliciano RS, Serra AJ, Brígido E, Antonio EL, Tucci PJF. et al. Comparative mRNA and MicroRNA profiling during acute myocardial infarction induced by coronary occlusion and ablation radio-frequency currents. *Front Physiol.* 2016 Nov. 25(7): 565. doi: [10.3389/fphys.2016.00565](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00565)
146. Nanni L, Romualdi C, Maseri A, Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006 Dec; 41(6): 934-48. doi: [10.1016/j.yjmcc.2006.08.009](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.08.009)
147. Kalter H. Teratology in the 20th century: Environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. *Neurotoxicol. Teratol.* 2003 Mar-Apr; 25(2):131-282. doi: [10.1016/S0892-0362\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(03)00010-2)

148. Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2005 Jun; 230(6): 394-406. doi: [10.1177/15353702-0323006-07](https://doi.org/10.1177/15353702-0323006-07)
149. Hellemons KG, Sliwowska JH, Verma P, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure: fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010 May; 34(6): 791-807. doi: [10.1016/j.neubiorev.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.06.004)
150. Uban KA, Comeau WL, Ellis LA, Galea LA, Weinberg J. Basal regulation of HPA and dopamine systems is altered differentially in males and females by prenatal alcohol exposure and chronic variable stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Oct; 38(10):1953–66. doi: [10.1016/j.psyneuen.2013.02.017](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.017)
151. Shankar K, Ronis MJ, Badger TM. Effects of pregnancy and nutritional status on alcohol metabolism. *Alcohol Res Health*. 2007;30(1):55-59. PMID: [17718402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17718402/)
152. Patra J, Bakker R, Irving H, Jaddoe VW, Malini S, Rehm J. Dose-response relationship between alcohol consumption before and during pregnancy and the risks of low birthweight, preterm birth and small for gestational age (SGA)-a systematic review and meta-analyses. *BJOG*. 2011 Nov; 118(12): 1411-21. doi: [10.1111/j.1471-0528.2011.03050.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.03050.x)
153. Huang I, Mak D, Cheung P, Abraham M, Clemens T, Turner S. A systematic review of associations between maternal exposures during pregnancy other than smoking and antenatal fetal measurements. *Environ. Res.* 2019 Jun; 173: 528-38. doi: [10.1016/j.envres.2019.04.005](https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.005)
154. Nykjaer C, Alwan NA, Greenwood DC, Simpson NAB, Hay AWM, White KLM. et al. Maternal alcohol intake prior to and during pregnancy and risk of adverse birth outcomes: evidence from a British cohort. *J. Epidemiol. Community Health*. 2014 Jun; 68(6): 542-49. doi: [10.1136/jech-2013-202934](https://doi.org/10.1136/jech-2013-202934)
155. Gray SP, Denton KM, Cullen-McEwen L, Bertram JF, Moritz KM. Prenatal exposure to alcohol reduces nephron number and raises blood pressure in progeny. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Nov; 21(11):1891-902. doi: [10.1681/ASN.2010040368](https://doi.org/10.1681/ASN.2010040368)
156. Blaine K, Gasser K, Conway S. Influence of fetal alcohol exposure on the GABAergic regulation of growth hormone release in postnatal rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999 Oct; 23(10): 1681-90. PMID: [10550002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10550002/)
157. Robinson S, Quarfordt S. The effect of ethanol on lipoprotein metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1981 Jan; 5(1): 101-9. doi: [10.1111/j.1530-0277.1981.tb04872.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1981.tb04872.x)
158. Mincis M, Chebli JMF, Khouri ST, Mincis R. Etanol e o trato gastrointestinal. *Arq. Gastroenterol.* 1995; 32(3): 131-139.
159. Burd L, Roberts D, Olson M, Odendaal H. Ethanol and the placenta: A review. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2007 May; 20(5): 361-75. doi: [10.1080/14767050701298365](https://doi.org/10.1080/14767050701298365)
160. Amiri S, Davie JR, Rastegar M. Chronic Ethanol Exposure Alters DNA Methylation in Neural Stem Cells: Role of Mouse Strain and Sex. *Mol. Neurobiol.* 2020 Feb; 57(2):650-67. doi: [10.1007/s12035-019-01728-0](https://doi.org/10.1007/s12035-019-01728-0)
161. Gallo PV, Weinberg J. Organ growth and cellular development in ethanol-exposed rats. *Alcohol*. 1986 Jul-Aug; 3(4):261-7. doi: [10.1016/0741-8329\(86\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0741-8329(86)90035-2)

162. Krasemann T, Klingebiel S. Influence of chronic intrauterine exposure to alcohol on structurally normal hearts. *Cardiol. Young.* 2007 Apr; 17(2):185-8. doi: [10.1017/S1047951107000224](https://doi.org/10.1017/S1047951107000224)
163. Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension.* 2000 Feb; 35(2): 580-6. doi: [10.1161/01.hyp.35.2.580](https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.2.580)
164. Paoletti E, Specchia C, Di Maio G, Bellino D, Damasio B, Cassottana E. et al. The worsening of left ventricular hypertrophy is the strongest predictor of sudden cardiac death in haemodialysis patients: a 10 year survey. *Nephrol. Dial. Transplant.* Jul; 19(7): 1829-34. doi: [10.1093/ndt/gfh288](https://doi.org/10.1093/ndt/gfh288)
165. Ren J, Wold LE, Natavio M, Ren BH, Hannigan JH, Brown RA. Influence of prenatal alcohol exposure on myocardial contractile function in adult rat hearts: role of intracellular calcium and apoptosis. *Alcohol Alcohol.* 2002 Jan-Feb; 37(1):30-7. doi: [10.1093/alcalc/37.1.30](https://doi.org/10.1093/alcalc/37.1.30)
166. Zornoff LAM, Skali H, Pfeffer MA, Sutton MSJ, Rouleau JL, Lamas GA. et al. Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002 May; 39(9):1450-5. doi: [10.1016/s0735-1097\(02\)01804-1](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)01804-1)
167. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012 Jan; 110(1): 159-73. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.111.243162](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162)
168. Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O. et al. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2001 Apr; 107(8): 975-84. doi: [10.1172/JCI11273](https://doi.org/10.1172/JCI11273)
169. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y. et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* 1991 Apr; 87(4): 1402-12. doi: [10.1172/JCI115146](https://doi.org/10.1172/JCI115146)
170. Fu S, Ping P, Zhu Q, Ye P, Luo L. Brain natriuretic peptide and its biochemical, analytical, and clinical issues in heart failure: A narrative review. *Front Physiol.* 2018 Jun; 9: 692. doi: [10.3389/fphys.2018.0069](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.0069)
171. Cea LB. Natriuretic peptide family: new aspects. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc Hematol. Agents.* 2005 Apr; 3(2): 87-98. doi: [10.2174/1568016053544309](https://doi.org/10.2174/1568016053544309)
172. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology.* 1993 May; 132(5):1961-70. doi: [10.1210/endo.132.5.8477647](https://doi.org/10.1210/endo.132.5.8477647)
173. Silva Jr JA, Araujo RC, Baltatu O, Oliveira SM, Tschope C, Walther T. et al. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. *FASEB J.* 2000 Oct; 14(13): 1858-60. doi: [10.1096/fj.99-1010fje](https://doi.org/10.1096/fj.99-1010fje)
174. Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS. et al. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J. Clin. Invest.* 1986 Nov; 78(5): 1362-74. doi: [10.1172/JCI112723](https://doi.org/10.1172/JCI112723)

175. Marcus LS, Hart D, Packer M, Yushak M, Medina N, Danziger RS. et al. Hemodynamic and renal excretory effects of human brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled, randomized crossover trial. *Circulation*. 1996 Dec; 94(12): 3184-9. doi: [10.1161/01.cir.94.12.3184](https://doi.org/10.1161/01.cir.94.12.3184)
176. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2007 Oct; 43(4): 388-403. doi: [10.1016/j.yjmcc.2007.07.045](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.07.045)
177. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Dimopoulos A, Xinaris C, Kokkinos AD. et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2007 Aug; 32(2): 333-9. doi: [10.1016/j.ejcts.2007.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.05.004)
178. Franco F, Dubois SK, Peshock RM, Shohet RV. Magnetic resonance imaging accurately estimates LV mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol*. 1998 Feb; 274(2): H679–83. doi: [10.1152/ajpheart.1998.274.2.H679](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.2.H679)
179. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J. Cardiol*. 2011 Mar; 57(2):131-40. doi: [10.1016/j.jjcc.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.01.002)
180. Cataliotti A, Tonne JM, Bellavia D, Martin FL, Oehler EA, Harders GE. et al. Long-term cardiac pro-B-type natriuretic peptide gene delivery prevents the development of hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2011 Mar; 123(12): 1297-305. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981720](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981720)
181. Chiurchiù V, Izzi V, D'Aquilio F, Carotenuto F, Di Nardo P, Baldini PM. Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul. Pept*. 2008 Jun; 148(1-3):26-32. doi: [10.1016/j.regpep.2008.02.009](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.02.009)
182. Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, Legros E. et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2006 Aug; 318(2): 819-27. doi: [10.1124/jpet.106.103010](https://doi.org/10.1124/jpet.106.103010)
183. Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu. Rev. Physiol*. 1997; 59:395-412. doi: [10.1146/annurev.physiol.59.1.395](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.395)
184. Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T. Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*. 1995 Apr; 25(4 Pt 2): 726-30. doi: [10.1161/01.hyp.25.4.726](https://doi.org/10.1161/01.hyp.25.4.726)
185. Bernstein KE, Ali MS, Sayeski PP, Semeniuk D, Marrero MB. New insights into the cellular signaling of seven transmembrane receptors: the role of tyrosine phosphorylation. *Lab. Invest*. 1998 Jan; 78(1): 3-7. PMID: [9461117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9461117/)
186. Taylor-McCabe KJ, Erşahin C, Simmons WH. Bradykinin metabolism in the isolated perfused rabbit heart. *J. Hypertens*. 2001 Jul; 19(7): 1295-9. doi: [10.1097/00004872-200107000-00015](https://doi.org/10.1097/00004872-200107000-00015)
187. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Eur. Heart J*. 1998 Sep; 19 Suppl J: J7-15. PMID: [9796835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9796835/)
188. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.

- Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 1996 Apr; 97(8): 1916-23. doi: [10.1172/JCI118623](https://doi.org/10.1172/JCI118623)
189. Tan Y, Li X, Prabhu SD, Brittian KR, Chen Q, Yin X. et al. Angiotensin II plays a critical role in alcohol-induced cardiac nitrative damage, cell death, remodeling, and cardiomyopathy in a protein kinase C/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent manner. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012 Apr; 59(16): 1477-86. doi: [10.1016/j.jacc.2011.12.034](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.12.034)
 190. Delaughter MC, Taffet GE, Fiorotto ML, Entman ML, Schwartz RJ. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB J.* 1999 Nov; 13(14): 1923-9. doi: [10.1096/fasebj.13.14.1923](https://doi.org/10.1096/fasebj.13.14.1923)
 191. Liu JL, LeRoith D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology.* 1999 Nov; 140(11): 5178-84. doi: [10.1210/endo.140.11.7151](https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7151)
 192. de Souza FR, Resende ES, Lopes L, Gonçalves A, Chagas R, Fidale T. et al. Resposta hipertrófica da associação de hormônio tireoideano e de exercício físico no coração de ratos. *Arq. Bras. Cardiol.* 2014; 102(2): 187-91. doi: [10.5935/abc.20130243](https://doi.org/10.5935/abc.20130243)
 193. Chen DB, Wang L, Wang PH. Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci.* 2000 Aug; 67(14): 1683-93. doi: [10.1016/s0024-3205\(00\)00759-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00759-1)
 194. Goh JM, Bensley JG, Kenna K, Sozo F, Bocking AD, Brien J. et al. Alcohol exposure during late gestation adversely affects myocardial development with implications for postnatal cardiac function. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2011 Feb; 300(2): H645-51. doi: [10.1152/ajpheart.00689.2010](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00689.2010)
 195. Connor B, Beilharz EJ, Williams C, Synek B, Gluckman PD, Faull RL. et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997 Oct; 49(1-2): 283-90. doi: [10.1016/s0169-328x\(97\)00192-7](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00192-7)
 196. Guan J, Bennet L, Gluckman PD, Gunn AJ. Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* 2003 Aug; 70(6): 443-62. doi: [10.1016/j.pneurobio.2003.08.002](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.08.002)
 197. Ila R, Solem M. Chronic-alcohol exposure alters IGF1 signaling in H9c2 cells via changes in PKC delta. *Alcohol.* 2006 Jul; 39(3): 169-78. doi: [10.1016/j.alcohol.2006.08.006](https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.08.006)
 198. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL. et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999 Jan; 99(3): 384-91. doi: [10.1161/01.cir.99.3.384](https://doi.org/10.1161/01.cir.99.3.384)
 199. Steinberg SF. Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda).* 2012 Jun; 27(3): 130-9. doi: [10.1152/physiol.00009.2012](https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2012)
 200. Liu Q, Chen X, Macdonnell SM, Kranias EG, Lorenz JN, Leitges M. et al. PKC α , but not PKC β or PKC γ , regulates contractility and heart failure susceptibility: Implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach. *Circ. Res.* 2009 Jul; 105(2): 194-200. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.109.195313](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.195313)
 201. Harris RA, McQuilkin SJ, Paylor R, Abeliovich A, Tonegawa S, Wehner JM. Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-

- aminobutyrate type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Apr; 92(9): 3658-62. doi: [10.1073/pnas.92.9.3658](https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3658)
202. Newton PM, Ron D. Protein kinase C and alcohol addiction. *Pharmacol. Res.* 2007 Jun; 55(6): 570-7. doi: [10.1016/j.phrs.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.008)
 203. Hoque M, Rentero C, Cairns R, Tebar F, Enrich C, Grewal T. Annexins - scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cell. Signal.* 2014 Jun; 26(6): 1213-25. doi: [10.1016/j.cellsig.2014.02.012](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.012)
 204. Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J. Cell. Biol.* 2002 Mar; 156(5): 905-19. doi: [10.1083/jcb.200108062](https://doi.org/10.1083/jcb.200108062)
 205. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R. et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.* 2004 Mar; 10(3): 248-54. doi: [10.1038/nm1000](https://doi.org/10.1038/nm1000)
 206. Rybin VO, Steinberg SF. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ. Res.* 1994 Feb; 74(2): 299-309. doi: [10.1161/01.res.74.2.299](https://doi.org/10.1161/01.res.74.2.299)
 207. Rybin V, Steinberg SF. Do adult rat ventricular myocytes express protein kinase C-alpha? *Am. J. Physiol.* 1997 May; 272(5 Pt 2): H2485-91. doi: [10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2485](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2485)
 208. Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J. Clin. Invest.* 1997 Nov; 100(9): 2189-95. doi: [10.1172/JCI119755](https://doi.org/10.1172/JCI119755)
 209. Stubbs CD, Slater SJ. Ethanol and protein kinase C. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999 Sep; 23(9): 1552-60. doi: [10.1111/j.1530-0277.1999.tb04680.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04680.x)
 210. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation.* 2007 Sep; 116(12): 1413-23. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589)
 211. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J. Cell. Sci.* 2005 Aug; 118(Pt 16): 3569-72. doi: [10.1242/jcs.02470](https://doi.org/10.1242/jcs.02470)
 212. Brown RD, Ambler SK, Li M, Sullivan TM, Henry LN, Crossno JT Jr. et al. MAP kinase kinase kinase-2 (MEKK2) regulates hypertrophic remodeling of the right ventricle in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013 Jan; 304(2): H269-81. doi: [10.1152/ajpheart.00158.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00158.2012)
 213. Hayashi M, Lee JD. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J. Mol. Med. (Berl).* 2004 Dec; 82(12): 800-8. doi: [10.1007/s00109-004-0602-8](https://doi.org/10.1007/s00109-004-0602-8)
 214. Tachibana H, Perrino C, Takaoka H, Davis RJ, Naga Prasad SV, Rockman HA. JNK1 is required to preserve cardiac function in the early response to pressure overload. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 May; 343(4): 1060-6. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.03.065](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.065)
 215. Pantos C, Mourouzis I, Tsagoulis N, Markakis K, Galanopoulos G, Roukounakis N. et al. Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009 Sep; 60(3): 49-56. PMID: [19826181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19826181/)
 216. Morkin E. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation.* 1993 May; 87(5): 1451-60. doi: [10.1161/01.cir.87.5.1451](https://doi.org/10.1161/01.cir.87.5.1451)

217. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Dec; 32(12): 2131-9. doi: [10.1006/jmcc.2000.1270](https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1270)
218. Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation.* 1990 Feb; 81(2 Suppl): III21-32. PMID: [2153479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2153479/)
219. Stefanon I, Valero-Muñoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr, Rodríguez C, Miana M. et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS One.* 2013 May; 8(5): e64986. doi: [10.1371/journal.pone.0064986](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064986)
220. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc. Res.* 2000 May; 46(2): 214-24. doi: [10.1016/s0008-6363\(00\)00003-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00003-1)
221. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc. Res.* 2006 Feb; 69(3): 604-13. doi: [10.1016/j.cardiores.2005.10.002](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.002)
222. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2010 Mar-Apr; 61(2): 205-9. doi: [10.1016/j.vascn.2010.02.011](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.011)
223. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S. et al. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int. J. Cardiol.* 2011 Aug; 151(1):18-33. doi: [10.1016/j.ijcard.2010.04.053](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.04.053)
224. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP. et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2006 Oct; 30(4): 604-10. doi: [10.1016/j.ejcts.2006.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2006.07.006)
225. Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M. et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation.* 2005 May; 111(19): 2430-7. doi: [10.1161/01.CIR.0000165066.71481.8E](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000165066.71481.8E)
226. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda).* 2013 Nov; 28(6): 391-403. doi: [10.1152/physiol.00029.2013](https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2013)

8. Apêndice

Artigo aceito e publicado:

JUCIARA DA COSTA SILVA, ALLAN ATUM BARBOZA, LAURA CASARI SARTORI, JOSE ANTONIO SILVA JUNIOR, CARLOS ALBERTO AVELLANEDA PENATTI. **Protocolo de vocalização ultrassônica em camundongos: Uma ferramenta para avaliação do comportamento social.** REBSCAL. 2020; 8(1): 44-51

ARTIGO ORIGINAL

ISSN 2238-1589

PROTOCOLO DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA EM CAMUNDONGOS: UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL

Juciara da Costa Silva¹, Allan Atum Barboza², Laura Casari Sartori³, Jose Antonio Silva Junior⁴, Carlos Alberto Avellaneda Penatti⁴

RESUMO

O estudo de desarranjos do neurodesenvolvimento, sejam estes herdados ou adquiridos, necessita da integração cada vez mais aprofundada entre pesquisa básica e abordagem clínica. Apesar da análise do comportamento humano ser essencial para caracterizar e motivar a inovação científica nas várias condições clínicas e/ou de disfunção social, os estudos comportamentais bem controlados utilizando modelos animais favorecem a ponte do conhecimento entre o laboratório e o clínico populacional. No comportamento social fino e adaptado às espécies animais de experimentação científica, estudos de comunicação ultrassônica em camundongos vem sendo de extrema importância para esclarecimento de achados comportamentais de linguagem em correspondentes em condições humanas. O presente estudo busca consolidar um paradigma de investigação comportamental em linguagem utilizando um modelo murino de linhagem selvagem C57/BL6 no contexto de vocalização ultrassônica na separação materna estabelecida em filhotes pré-adolescentes. Além da determinação e aplicação do protocolo experimental aqui relatado, os resultados demonstraram que não houve diferenças nas idades analisadas e corroboram com os dados descritos em literatura uma vez que ocorreu uma inclinação para comunicação de baixa complexidade.

Palavras-chave: Vocalização ultrassônica, C57/BL6, protocolo, comportamento social

1. Doutoranda na Universidade Nove de Julho
- Programa de Mestrado e Doutorado em Medicina - São Paulo - SP - Brasil
2. Mestrando na Universidade Nove de Julho
- Programa de Mestrado e doutorado em Medicina - São Paulo - SP - Brasil
3. Graduanda na Universidade Nove de Julho
- Programa de graduação em Ciências Biológicas - São Paulo - SP - Brasil
4. Docente na Universidade Nove de Julho
- Programa de Mestrado e doutorado em Medicina - São Paulo - SP - Brasil

DATA RECEBIMENTO: 06/02/2020
ACEITO PARA A PUBLICAÇÃO: 07/04/2020

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA
Juciara da Costa Silva
E-mail: juciaraasilva@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Comunicação vocal em animais – Um panorama da biologia comparada

A comunicação vocal é característica compartilhada por diferentes espécies. Os chamados sinais sonoros são primordiais por ditar informações sobre padrão de reprodução, acasalamento, identificação de população, percepção da relação caça-predador e identificação de abrigo¹.

A maioria das espécies de aves e mamíferos produz vocalizações que são controladas por

estruturas cerebrais conectadas aos interferentes genéticos subjacentes com pouca ou nenhuma influência ambiental. Essas vocalizações inatas ocorrem espontaneamente em todos os membros saudáveis de uma espécie expostos a um estímulo².

Do ponto de vista fisiológico relativo à vocalização animal, ele deve gerar a pressão correta em seus pulmões, ajustar a tensão e a taxa de vibração de suas cordas vocais e configurar o trato respiratório superior para produzir o som. Todas essas ações devem ser coordenadas com planos de respiração e deglutição³.

Além das questões fisiológicas, outro ponto primordial é o ritmo caracterizado pelos inter-

44

REBSCAL, São Paulo, v.8 n.1, pg. 44-51, 2020

valos de tempo, geralmente em várias escalas, que podem ser combinadas para produzir uma estrutura métrica vocal hierárquica. A percepção de características rítmicas, como o agrupamento, é geralmente estudada na esfera experimental. Roedores, assim como os humanos, são capazes de usar a alternância de tom nas sequências sonoras para agrupá-los como pares alto-baixo ⁴.

Comunicação em roedores - Vocalização ultrassônica

Camundongos selvagens e de laboratório (*Mus musculus*) produzem uma variedade de vocalizações ultrassônicas (*usvs*) em ausência ou presença de interação social tais como: isolamento neonatal, aproximação social, separação de filhotes das mães, chamadas agressivas de machos e emissão vocal durante o comportamento de corte ⁵. Quando um roedor macho encontra uma fêmea, o macho apresenta um comportamento de namoro que inclui a emissão de vocalizações na faixa de frequência ultrassônica, ou seja, inaudível à capacidade humana. A alta correlação temporal entre as vocalizações produzidas por camundongos machos e fêmeas indica que eles desempenham um papel nas interações de corte. Essas ditas sílabas de vocalização ultrassônica consistem principalmente de chamados de bandas simples ou de duplo saltos rápidos de frequência, criando estruturas espectrais complexas com classificações em simples, modulada e harmônicas. Vários estudos demonstraram que os roedores modificam seu conteúdo silábico em resposta a diferentes situações sociais ⁶.

Em relação à base neural da comunicação vocal em camundongos, a maioria dos estudos se concentrou no processamento de vocalizações pelo sistema auditivo e pouco se sabe sobre o controle neural da produção vocal. As investigações são referentes ao colículo inferior, um grande núcleo do mesencéfalo que recebe informações de todos os núcleos auditivos do tronco cerebral ^{7, 8, 9}. Os neurônios do colículo inferior respondem vigorosamente aos *usvs* de roedores. Como em outros mamíferos, o ajuste da resposta às vocalizações

nesses neurônios é modulado pela dopamina com conectividade sináptica inibitória. Os *usvs* de camundongo contêm modulação de frequência significativa e os neurônios do colículo inferior também mostram sintonia com esse recurso acústico proeminente, curiosamente dependente da liberação de serotonina no colículo inferior ¹⁰.

O registro e a análise de *usvs* têm ampla utilidade durante diversos testes comportamentais, os quais fornecem informações detalhadas sobre o estado emocional e a função motora do animal a ser avaliado. Apesar das fortes evidências de que os *usvs* atendem uma série de funções comunicativas, limitações técnicas e de custo tecnológico/estrutural têm sido barreiras para a maioria dos laboratórios adotarem a análise desse protocolo ¹¹.

A frequência da vocalização ultrassônica em alguns roedores ocorre entre 30 a 100 kHz e geralmente contêm saltos de frequência separados de 15 a 35 kHz, sendo hipoteticamente produzidos por um mecanismo de assobio, onde dois orifícios circulares espaçados geram o som ¹². Nos camundongos, ocorrem três tipos principais caracterizados de chamados diferenciados: 1) ultrassom de 60 kHz induzido pelo isolamento em filhotes, 2) ultrassom de 70 kHz induzido por interação entre juvenis e fêmeas adultas e 3) durante o comportamento de corte e interação de macho e fêmea. O primeiro tipo de chamada principal, ultrassom de 60 kHz induzido por isolamento, é produzido em camundongos durante as 2 primeiras semanas de vida, principalmente em resposta à separação da mãe e dos irmãos da ninhada. Conforme demonstrado por análises espectrográficas detalhadas, os ultrassons de 60 kHz induzidos pelo isolamento de apito são tipicamente caracterizados por uma ampla faixa de frequência de som de 50 a 110 kHz com dois subtipos: um se agrupando em torno de 60 kHz e outro em torno de 90 kHz. Eles duram entre 2 e 70 milissegundos. O padrão de emissão é não aleatório, conforme indicado por correlações positivas significativas entre as durações das chamadas subsequentes. A emissão de chamadas nas primeiras 2 semanas de vida é fortemente dependente do estágio de desenvolvimento com um padrão de emissão invertido em forma de

PROTOCOLO DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA EM CAMUNDONGOS: UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL

tipicamente entre os dias 6 e 9. O segundo subtipo, centrado em torno de 90 kHz, torna-se mais proeminente durante o desenvolvimento ¹³.

As vocalizações têm sido intensamente estudadas tanto em humanos quanto em uma variedade de espécies não humanas como aves, macacos, sapos, vacas e camundongos. Enquanto as vocalizações diferem em origem, estrutura e complexidade de espécies diferentes, elas geralmente desempenham papéis importantes em uma variedade de comportamentos animais que servem desde aviso simples para chamados até canções de acasalamento altamente complexas exibidas por muitas espécies ¹⁴.

Os ultrassons de 60 kHz induzidos por isolamento refletem estados afetivos negativos, como ansiedade e angústia, e em repetidas publicações, ficou evidente que os compostos ansiolíticos reduzem a chamada ultrassônica em filhotes de camundongos isolados. Eles desempenham importantes funções comunicativas e induzem o comportamento de recuperação materna em estudos de capacidade reprodutiva. Abordagens experimentais em reprodução animal são uma abordagem complementar importante em estudos de função comunicativa por meio de ultrassons. Estes avaliam as respostas comportamentais no animal receptor quando exposto à mensagem de *usvs* pré-gravados por alto-falante específico na ausência de outras variáveis de corte como odores e movimentos. Em adição, os ultrassons de 60 kHz induzidos por isolamento foram extensivamente estudados e usados como medidas precoces de ansiedade e de déficits de comunicação ¹³.

Composição acústica da vocalização ultrassônica

Os roedores têm um repertório particularmente rico de chamadas ultrassônicas que se destacam na comunicação intraespecífica. A estereotipia dos padrões motores subjacentes foi demonstrada apenas no nível da chamada, porque estudos em outros mamíferos sugeriram que a 'chamada' é a menor unidade vocal. A geração de algumas chamadas parece envolver mais de um padrão motor, sugerindo a existência de unidades menores

abaixo do nível da chamada. Os padrões motores devem ser semelhantes entre as chamadas de módulo único (produzidas por um único módulo) e as chamadas compostas (produzidas por vários módulos) se um e o mesmo programa motor for recrutado para produzir os dois tipos de chamada. Duas hipóteses foram abordadas: (1) se os padrões motores de uma chamada de módulo único são idênticos aos usados em chamadas compostas; e (2) se os roedores combinam esses módulos para gerar chamadas compostas. A primeira hipótese foi testada comparando-se a pressão subglótica e as atividades musculares laringeas em módulos únicos e compostos. A segunda hipótese foi testada determinando as características modulares dos tipos de chamadas compostas e suas taxas. O teste dessas duas hipóteses também permitiu a detecção de módulos montados de maneira incompleta, o que era inesperado para *usvs* em roedores. A coordenação laringeo-respiratória associada não apenas forneceu um suporte adicional para uma característica modular dos padrões motores subjacentes dos *usvs*, mas também demonstrou uma característica fundamental da coordenação laringeo-respiratória compartilhada com a produção da fala humana ¹⁵.

Fica claro que a emissão das vocalizações ultrassônicas, ou seja, acima do limiar de audição humana de cerca de 20 kHz, expressa estados emocionais positivos ou negativos durante as interações sociais. É bem caracterizado que roedores de experimentação emitem *usvs* de 50 kHz em situações apetitivas, como comportamento de reprodução em juvenis, acasalamento ou em resposta a psicoestimulantes, enquanto *usvs* de 22 kHz podem indexar um estado de ativação negativa, incluindo situações estressantes e dolorosas. Assim, o *usv* aversivo de 22 kHz e o apetitivo *usv* de 50 kHz servem funções comunicativas distintas, pois refletem padrões distintos de ativação cerebral. Também é digno de nota pelo menos três subtipos de chamadas apetitivas descritas: (1) chamadas planas ou simples, (2) moduladas em frequência e (3) chamadas harmônicas, que se acredita serem emitidas em diferentes contextos sociais e estados afetivos ¹⁶.

Juciara da Costa Silva, Allan Atum Barboza, Laura Casari Sartori, Jose Antonio Silva Junior, Carlos Alberto Avellaneda Penatti

Circuitos centrais da vocalização

Compreender a evolução do fundamento neural dos sistemas de comunicação vocal intraespécie continua sendo um dos grandes desafios da biologia. Os princípios do controle vocal mostram sua relevância na construção da linguagem humana. Embora as redes neuronais envolvidas na produção da linguagem são mais complexas que os sistemas motores vocais de mamíferos em geral, uma dessas pré-adaptações cruciais é o entendimento do sistema neural pré-frontal e/ou mecanismos de controle cortical capazes de iniciar e/ou modular com precisão um processo filogeneticamente conservado motor vocal primário no mamífero. É importante decifrar a interconexão do córtex motor com estruturas corticais auditivas em camundongos, computando o tempo vocal rápido e preciso observados¹⁷.

Os circuitos centrais que controlam a vocalização têm sido amplamente estudados em vertebrados adultos, onde se sobrepõem em seus componentes executivos aos circuitos respiratórios. As vias cerebrais anteriores (i.e., pré-frontais) que controlam a frequência e a sequência dos ultrassons em camundongos não são essenciais para a vocalização básica inata; ao contrário, é a substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo que modula a atividade dos neurônios motores no cérebro posterior e na medula espinhal para implementar chamadas e modular a respiração¹⁸.

Com base nos itens apresentação e embasamento teórico, o presente trabalho busca determinar um estudo protocolar na esfera comportamental com base na vocalização ultrassônica de linhagem selvagem comumente utilizada nas dependências de experimentação animal mundial.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Modelo animal

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de

Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Nove de Julho, sob o parecer nº 9355120319. Foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6 entre 45 a 60 dias de vida, sendo destinada à formação de dois casais.

Durante a realização, os animais foram mantidos em gabinete ventilado alocados no biotério central do campus Vergueiro e alojados em caixa de polipropileno com assoalho recoberto de maravalha. A oferta de água e ração foi de maneira à vontade, com período de 12 horas no ciclo claro e 12 horas no escuro e com temperatura média de 22°C. Os filhotes foram separados das mães para realização do protocolo experimental.

Paradigma comportamental de vocalização ultrassônica

As gravações foram com base na coleta do áudio digital através do gravador de Avisoft Ultra-SoundGate 116m Mobile - 41165- Delta -Sigma, posicionado próximo à caixa teste. As análises sonográficas foram realizadas com o auxílio do Avisoft-SAS LAB - Alemanha. Para a realização do protocolo o microfone foi distanciado 10 cm dos animais (Figura 1). As gravações ocorreram durante a separação materna pelo período de duração de 3 minutos em idades distintas sendo pós-natal 6 e 13 dias, respectivamente.

O animal testado foi separado da sua mãe disposto em caixa com assoalho de maravalha e sua vocalização foi gravada. Foi identificado a composição acústica emitida por cada indivíduo durante o contexto de separação mãe-filhote.

Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad 6.0 (São Diego, Califórnia). Os resultados foram analisados conforme sua distribuição utilizamos os testes Mann Whitney e Teste Anova One-way com o grau de significância estabelecido em $p < 0,05$.

PROTOCOLO DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA EM CAMUNDONGOS: UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL

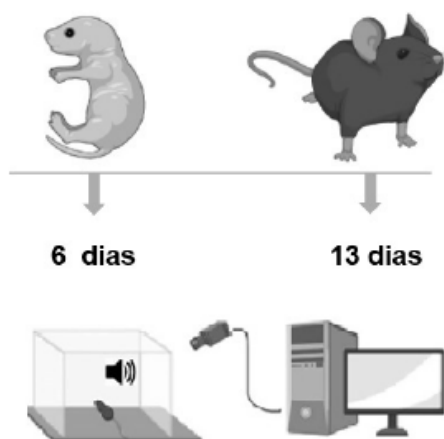


Figura 1 Avaliação da comunicação ultrassônica em dois momentos: período atribuído como a “infância” de 6 dias e período da “adolescência” com 13 dias de vida. Instrumento Avisoft-UltraSoundGate – Avisoft Bioacoustics com a capacitação até 250 kHz com posicionamento de 10 cm de distância e coleta realizada durante 3 minutos por animal. A maravalha foi alterada conforme o animal avaliado (Figura realizada com o auxílio do BioRender).

RESULTADOS

Composição da prole

Após o acasalamento de 1 matriz sem nenhum tipo de manipulação obtivemos um total de 7 indivíduos, foi registrado duas mortes de fêmeas totalizando a descrição com $n=5$ em PN 13.

Total de ocorrências ultrassônicas em ambos os sexos e composição acústica

Não houve diferença significativa entre PN6 e PN13 na avaliação do total de vocalização $p=0.254$ Figura 2A. Na análise da composição vocal, utilizando os critérios de comunicação simples, harmônica e modula em PN6, houve uma

tendência de aumento de comunicação do tipo simples Figura 2B $p=0.0574$ no contraponto da avaliação em PN13.

DISCUSSÃO

Os chamados distúrbios do sistema nervoso central são alterações com significativo impacto socioeconômico sendo, tradicionalmente dicotomizados entre doenças de neurodesenvolvimento e neurodegenerativas de surgimento inicial ou tardio. Eles se associam à disfunção da atividade neuronal por perturbações no posicionamento neuronal dentro de seu circuito ou entre circuitos neurais compartilhados ou no nível do microdomínio das sinapses. Alterações essas causalmente associadas às doenças neurológicas aparecem precocemente, aqui incluídas distúrbios do espectro autista (TEA) e esquizofrenia e também em patologias degenerativas de início tardio, como exemplos as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington¹⁹.

Diante da literatura crescente sobre *usvs* em camundongos, é importante ressaltar que os padrões de desvio *usvs* neonatal e adultos podem ser determinados em investigações de fenótipos comportamentais em vários modelos de camundongos de distúrbios do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos humanos, a partir daqueles nos quais os déficits na comunicação são um sintoma primário²⁰.

Para a determinação protocolar experimental aqui empregada, nota-se a importância do número de animais quando da realização comparativa entre linhagens a fim de determinar suas particularidades. A opção pelo C57/BL6 foca-se na obviedade da grande gama de estudos conduzidos e possibilidade de partir para abordagens de manipulações genéticas tais como a transgenia nessa linhagem, sendo a mesma selvagem de base para a determinação comportamental e criação/exploração de um ecossistema em ‘cativeiro experimental acadêmico’.

A janela de dados coletados ocorreu em idades de PN6 e PN13 sem a distinção dos sexos, no en-

Juciara da Costa Silva, Allan Atum Barboza, Laura Casari Sartori, Jose Antonio Silva Junior, Carlos Alberto Avellaneda Penatti

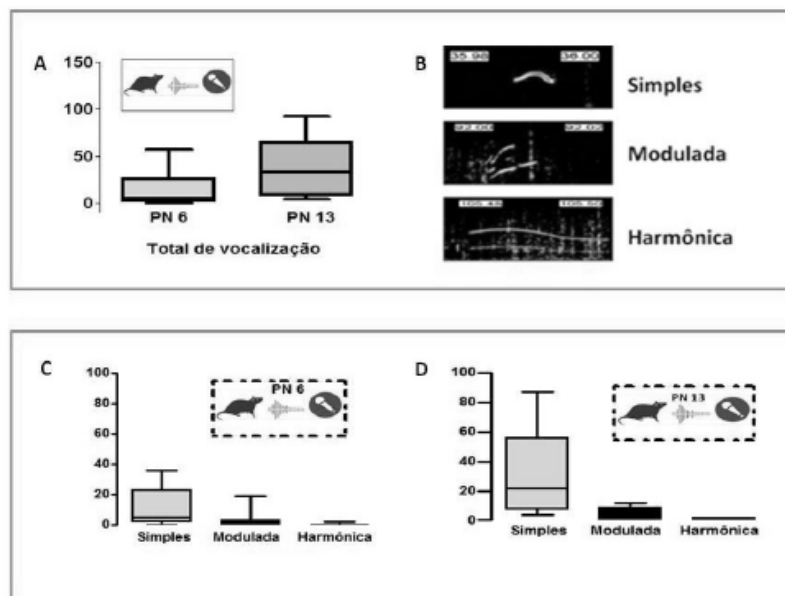


Figura 2 A) Total de ocorrências acústicas em PN6 N = 7 e PN13 = 5 (Mann Whitney $p=0.2548$). B) Exemplos de sonograma simples, modulada e harmônica realizado no Avisoft SASLab Pro. C) Composição vocal em PN6 (Anova One-way $p=0.0574$). D) Composição vocal em PN13 (Anova One-way $p=0.0683$).

tanto a literatura científica centrada em vocalização animal mostra que em PN8 não foram encontradas diferenças entre os sexos nas frequências ultrassônicas analisadas de 50, 60, 70 e 80 kHz²¹. Esses dados vão de acordo com a relação ao ciclo estral (não foram observadas nenhuma alteração no número de chamadas dependente ao ciclo) em idade mais avançada na fêmea, enquanto no macho o parâmetro será exclusivamente o perfil de idade. Dessa maneira, embora os *usvs* estejam envolvidos com o comportamento sexual, eles não parecem afetados pelo ciclo estral, apesar de crenças apontando possibilidades de diferenças específicas²².

Outros grupos, ao avaliarem a comunicação em PN8, mostram que os resultados sustentam a predição de que maior capacidade de resposta materna é relacionada às chamadas ultrassônicas mais baixas emitidas pelo filhote durante o isola-

mento. Isso reforça a hipótese de uma coadaptação à vida familiar que permite um ajuste fino da mãe e necessidade da prole²³.

Em relação à ocorrência de vocalização, alguns estudos sugerem que as chamadas vocais em filhotes geralmente surgem em PN4, com pico em PN8 e declínio em PN12²⁴. Na investigação da comunicação ultrassônica em idades distintas (e.g., PN1, PN3, PN7, PN8 e PN14), foi observado um número muito baixo de *usvs* na idade de PN1. O número começou a aumentar em PN3, atingindo pico em PN8 e depois com declínio em PN14²⁵. Aqui fica demonstrado uma divergência ainda não explicada ou justificada. Por nosso registro, ficou evidente uma maior vocalização em PN13 (mais próximo de idade de PN14) que possa depender de uma atividade exploratória do animal pelo formato da coleta dos dados experimentais.

PROTOCOLO DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA EM CAMUNDONGOS: UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Finalmente, nosso estudo sugere um protocolo experimental simples e consistente em análise de *usvs* que permite amplificar a abordagem para maior compreensão dos distúrbios de neurodesenvolvimento com impacto direto na interação social. Propomos a expansão dos estudos atrelados a variações e modelos experimentais com transgênicos para intensificar a compreensão dessas desordens. Sugerimos a expansão no número de animais em teste a fim de detectar possíveis sutilezas de gatilhos em outras idades específicas dependendo das características do modelo experimental escolhido. Adicionalmente, associar parcerias técnicas de eletrofisiologia dos circuitos neurais junto ao paradigma comportamental em tempo real tornam os experimentos em neurobiologia mais robustos e completos, além de ofere-

cerem maior proximidade de correlato à condição humana no campo dessas desordens. Finalmente, a complexidade genética e epigenética/ambiental das redes corticais coordenam o comportamento vocal dentro da esfera mais ampla do comportamento fino social intraespécie e, portanto, novos estudos e paradigmas em vocalização de experimentação podem contribuir significativamente para a evolução dos estudos de comunicação ainda não estabelecidas na literatura.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao biotério central da Universidade Nove de Julho Campus Vergueiro - São Paulo -SP e a CAPESP - PROSUP pelo fomento da bolsa de doutorado e a Universidade Nove de Julho pela bolsa de iniciação científica.

ULTRASONIC VOCALIZATION PROTOCOL IN MICE: A TOOL FOR ASSESSING SOCIAL BEHAVIOR

ABSTRACT

Neurodevelopmental disorders can be inherited or acquired and requires deeper integration between basic and clinical research. The access and analysis of human behavior patterns are essential to push for scientific innovation in various clinical conditions and/or social dysfunction, but clinical and psychological approach can be challenging to achieve in these conditions. Thus, behavioral studies using animal models in experimental settings favor and advance the understanding of neurodevelopmental disarrangements in human population. In this regard, social behavior testing in fine and elaborate cognitive skills such as ultrasonic vocalization in mice have been extremely important to study behavioral findings of language dysfunction in human condition. Therefore, the present study seeks to consolidate a behavioral investigation paradigm in language using a murine model of wild line C57/BL6 in the context of ultrasonic vocalization in the maternal separation established in pre-adolescent subjects. Besides the establishment and application of the experimental design reported here, the results showed a trend for low complexity communication manifested by the pre-adolescent offspring with no differences regarding age or sex in tested animals.

Keywords: Ultrasonic vocalization, C57 / BL6, protocol, social behaviour

Juciara da Costa Silva, Allan Atum Barboza, Laura Casari Sartori, Jose Antonio Silva Junior, Carlos Alberto Avellaneda Penatti

REFERÊNCIAS

1. Snowdon CT. Cognitive Components of Vocal Communication: A Case Study. *Animals (Basel)*. 2018;8(7).
2. Nieder A, Mooney R. The neurobiology of innate, volitional and learned vocalizations in mammals and birds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2020;375(1789):20190054.
3. Tyack PL. A taxonomy for vocal learning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2020;375(1789):20180406.
4. Ravignani A, Dalla Bella S, Falk S, Kello CT, Noriega F, Kotz SA. Rhythm in speech and animal vocalizations: a cross-species perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1453(1):79-98.
5. Castellucci GA, Calbick D, McCormick D. The temporal organization of mouse ultrasonic vocalizations. *PLoS One*. 2018;13(10):e0199929.
6. Weiner B, Hertz S, Perets N, London M. Social Ultrasonic Vocalization in Awake Head-Restrained Mouse. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:236.
7. Shepard KN, Lin FG, Zhao CL, Chong KK, Liu RC. Behavioral relevance helps untangle natural vocal categories in a specific subset of core auditory cortical pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2015;35(6):2636-45.
8. Issa JB, Haeffele BD, Agarwal A, Bergles DE, Young ED, Yue DT. Multiscale optical Ca²⁺ imaging of tonal organization in mouse auditory cortex. *Neuron*. 2014;83(4):944-59.
9. Marlin BJ, Mitre M, D'Amour J A, Chao MV, Froemke RC. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature*. 2015;520(7548):499-504.
10. Egnor SR, Seagraves KM. The contribution of ultrasonic vocalizations to mouse courtship. *Curr Opin Neurobiol*. 2016;38:1-5.
11. Coffey KR, Marx RG, Neumaier JF. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. *Neuropsychopharmacology*. 2019.
12. Mahrt E, Agarwal A, Perkel D, Portfors C, Elemans CP. Mice produce ultrasonic vocalizations by intra-laryngeal planar impinging jets. *Curr Biol*. 2016;26(19):R880-r1.
13. Jouda J, Wöhr M, Del Rey A. Immunity and ultrasonic vocalization in rodents. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1437(1):68-82.
14. Heckman J, McGuinness B, Celikel T, Englitz B. Determinants of the mouse ultrasonic vocal structure and repertoire. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;65:313-25.
15. Riede T. Rat ultrasonic vocalization shows features of a modular behavior. *J Neurosci*. 2014;34(20):6874-8.
16. Barroso AR, Araya EI, de Souza CP, Andreatini R, Chichorro JG. Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: Influence of the social context. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2019;29(11):1213-26.
17. Hage SR. Precise vocal timing needs cortical control. *Science*. 2019;363(6430):926-7.
18. Hernandez-Miranda LR, Ruffault PL, Bouvier JC, Murray AJ, Morin-Surun MP, Zampieri N, et al. Genetic identification of a hindbrain nucleus essential for innate vocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30):8095-100.
19. Taoufik E, Kouroupi G, Zygogianni O, Matsas R. Synaptic dysfunction in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases: an overview of induced pluripotent stem-cell-based disease models. *Open Biol*. 2018;8(9).
20. Scattoni ML, Crawley J, Ricceri L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(4):508-15.
21. Binder MS, Hernandez-Zegada CJ, Potter CT, Nolan SO, Lugo JN. A comparison of the Avisoft (5.2) and Ultravox (2.0) recording systems: Implications for early-life communication and vocalization research. *J Neurosci Methods*. 2018;309:6-12.
22. Kim H, Son J, Yoo H, Oh J, Han D, Hwang Y, et al. Effects of the Female Estrous Cycle on the Sexual Behaviors and Ultrasonic Vocalizations of Male C57BL/6 and Autistic BTBR T+ tf/J Mice. *Exp Neurobiol*. 2016;25(4):156-62.
23. D'Amato FR, Scalera E, Sarli C, Moles A. Pups call, mothers rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalizations in mouse pups? *Behav Genet*. 2005;35(1):103-12.
24. P OB, Beckert MV, Takahashi T, Izumi T, Ye K, Kang G, et al. Computational Analysis of Neonatal Mouse Ultrasonic Vocalization. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2018;8(2):e46.
25. Yin X, Chen L, Xia Y, Cheng Q, Yuan J, Yang Y, et al. Maternal Deprivation Influences Pup Ultrasonic Vocalizations of C57BL/6J Mice. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160409.

9. Anexos



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE GENES APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM CAMUNDONGOS C57Bl/6", protocolada sob o CEUA nº 9355120319 (ID 000115), sob a responsabilidade de **José Antônio Silva Júnior e equipe; Allan Luis Barboza Atum** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 19/03/2019.

We certify that the proposal "EFFECT OF PRENATAL EXPOSURE IN EXPRESSION OF GENES AFTER MYOCARDIAL INFARCTION OF C57Bl/6 MICE", utilizing 12 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 9355120319 (ID 000115), under the responsibility of **José Antônio Silva Júnior and team; Allan Luis Barboza Atum** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 03/19/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019 a 03/2021** Área: **Medicina**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **12**

Linhagem: **C57Bl/6**

Peso: **15 a 25 g**

Local do experimento: Salas de Experimentação do Biotério da UNINOVE, unidade Vergueiro.

São Paulo, 20 de março de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho