

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE  
PÓSGRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DANILA MARQUES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NO  
MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS C57BL/6: IMPACTOS NA  
EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE COMPONENTES DAS  
VIAS DE CINÉTICA DO CÁLCIO, INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM MACHOS E FÊMEAS ADULTOS.**

**São Paulo 2021**

**DANILA MARQUES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NO  
MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS C57BL/6: IMPACTOS NA  
EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE COMPONENTES DAS  
VIAS DE CINÉTICA DO CÁLCIO, INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM MACHOS E FÊMEAS ADULTOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, para obtenção do grau de doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

**SÃO PAULO 2021**

Marques, Danila.

Efeito da exposição pré-natal ao álcool no miocárdio de camundongos C57BL/6: impactos na expressão de RNA mensageiro de componentes das vias de cinética do cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em machos e fêmeas adultos. / Danila Marques. 2021.

100 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Exposição pré-natal ao álcool. 2. Expressão gênica. 3. Transdução de sinais. 4. Dimorfismo sexual.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616



São Paulo 13 de dezembro de 2021

**TERMO DE APROVAÇÃO**

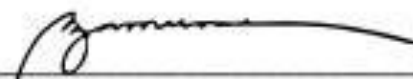
Aluna: **DANILA MARTQUES DE OLIVEIRA**

Titulo da tese: **EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS C57BL6: IMPACTOS NA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE COMPONENTES DAS VIAS DE CINÉTICA DO CÁLCIO, INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO EM MACHOS E FÊMEAS ADULTOS.**

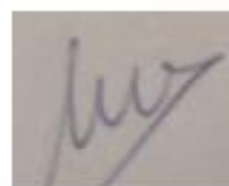
Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR



Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES



Membro: PROF. DR. OVIDIU CONSTANTIN BALTATU



## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado com muita gratidão aos meus pais **Mauro Rafael de Oliveira** (in memorian) e **Tânia Graciete Marques de Oliveira** por todo amor que sempre dedicaram à nossa família.*

*Dedico também ao meu esposo amado **Luiz Eduardo Simeone** que esteve comigo pacientemente desde o início deste doutorado sempre me apoiando. Seu amor me incentivou, me fez acreditar que eu era capaz nos momentos em que duvidei.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, esta é a realização de um sonho e sem sua permissão e seu cuidado comigo em todos os passos, este trabalho não teria se concretizado!*

*Aos meus pais, avós e todos que vieram antes deles, desde a origem, que me deram o mais importante: a vida! E junto com ela todo seu amor, dedicação e permissão para que eu seguisse meu caminho e me desenvolvesse.*

*Às minhas irmãs Karine e Evelize, minhas sobrinhas Ana Carolina, Mariana e Gabriela. junto com meu esposo Luiz e meus pais formam meu núcleo de amor. De onde vem tudo o que preciso para prosseguir.*

*Ao meu orientador Dr. José Antônio Silva Junior, a quem admiro muito pela inteligência, competência e personalidade. Devo-lhe muito pela paciência, persistência e orientação. Por nunca ter desistido de mim apesar de todas as dificuldades e contratemplos que se apresentaram nessa época de pandemia de Covid-19.*

*Ao colega do grupo de pesquisa responsável por desenhar todo o estudo e fazer os experimentos que geraram material para tantos estudos Allan Luís Barbosa Atum. Serei eternamente grata por toda sua ajuda. Você é a peça fundamental, sem a qual este trabalho não teria sido feito.*

*À professora Dra. Fernanda Colombo, ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação da Medicina da UNINOVE, que sempre me recebeu com um sorriso e cordialidade quando tive dificuldades. Ela é um exemplo de pesquisadora a quem, nós os alunos, admiramos e seguimos suas orientações.*

*À querida professora Dra. Stella Regina Zamuner que foi minha orientadora de mestrado, pela amizade, ensinamentos, apoio e correções na qualificação. Meu exemplo de competência e profissionalismo. Enriqueço-me com seus ensinamentos a cada encontro.*

*À querida professora Dra. Maria Cristina Chavantes, que me ensinou tanto em todos estes anos de estudo. Admiro sua referência e importância para a ciência. Agradeço as correções na qualificação. Obrigada pelas conversas e por sempre fazer questão de me cumprimentar e me chamar pelo nome em qualquer lugar que me encontre.*

*À querida professora Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira, por suas correções e orientações na qualificação. Sou grata pelas aulas, pelas conversas edificantes, por tudo que me ensinou.*

*Ao querido professor Dr. Humberto Dellê, pelo trabalho junto aos alunos, pelo exemplo de educação e gentileza com todos. Me auxiliou com cordialidade sempre que o procurei e por toda sua importância na pesquisa.*

*A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho. Admiro demais cada um destes professores que tive o privilégio de conviver.*

*À querida amiga professora Maria Luiza Makabe (in memoriam) exprofessora da Uninove que me convidou para o mestrado e abriu esta porta de oportunidades. Agradeço pelo trabalho que desenvolvemos juntas na atenção primária, por sua amizade e sua gentileza que era constante. Ainda bem que tive a chance de dizer que a amava e era grata por tudo, dias antes da sua partida.*

*À querida amiga Aline Silva que me auxiliou desde o mestrado e agora durante o doutorado me permitindo acompanhá-la em seus experimentos para que eu pudesse aprender as práticas de laboratório. Estou muito feliz porque ela também está terminando seu doutorado. Sou grata por tê-la como amiga e por tudo que generosamente sempre me ensinou.*

*Ao querido amigo de nosso grupo de pesquisa José Almir Alves da Silva, que tive a alegria de conhecer. Com quem compartilhei desde o início as angústias e dificuldades. Espero tê-lo como um grande amigo por toda a vida.*

*Ao amigo Erico Ruiz, também do grupo de nosso grupo de pesquisa. Foi uma honra conhecê-lo, rapaz inteligente e perspicaz, obrigada pela amizade e conversas que nos foram permitidas antes da pandemia.*

*Às alunas de iniciação científica que auxiliaram na parte prática do trabalho com os animais.*

*Às equipe do biotério Dra. Nurya e Vanessa. Amigas queridas!*

*Às secretárias do Programa de Pós-Graduação Camila e Daniela pela disponibilidade e ajuda em todos estes anos na organização dos documentos e questões burocráticas.*

*Ao meu gerente Alexandre Souza por todo apoio e compreensão pelas vezes em que tive que trocar de horário ou me ausentar do trabalho.*

*A toda minha equipe do trabalho pela compreensão, torcida e apoio neste período do doutorado.*

*À querida amiga Thaís Batoni pelo exemplo de esforço e pela ajuda na formatação deste trabalho.*

*A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.*

*Agradeço a esta grande Instituição de Ensino e Pesquisa Universidade Nove de Julho – UNINOVE, que me concedeu bolsa de estudos para o mestrado e doutorado.*

*Fui recebida de braços abertos por todos do Programa de Pós-Graduação em Medicina desta instituição que me despeço agora com muita gratidão. Recebi muito desta casa e de todos. Espero retribuir à sociedade muitas vezes mais.*

*Minha eterna gratidão! Sentirei saudades desta época, de tudo e de todos!*



*“Por mais que na batalha se vença um ou mais inimigos, a vitória sobre si mesmo é a maior de todas as vitórias.”*

*Buda*

## RESUMO

O álcool é uma substância psicoativa, com propriedades causadoras de dependência, que tem sido amplamente utilizado em muitas culturas durante séculos. O uso abusivo de álcool causa um grande número de doenças, além de sobrecarga social e econômica aos países. As mulheres são mais vulneráveis ao consumo de álcool devido a uma menor quantidade de enzimas que o metabolizam. O consumo de álcool durante a gestação pode induzir no feto alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais, muitas vezes irreversíveis, como morte celular e desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a habilidade das células fetais de se protegerem com antioxidantes endógenos. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da exposição pré-natal ao álcool (PAE) no miocárdio de camundongos C57BL/6 e seus impactos na expressão de RNA mensageiro (RNAm) de componentes das vias de cinética do cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em machos e fêmeas. Para a obtenção da prole, objeto de estudo deste projeto, foram utilizados 20 camundongos isogênicos (15 fêmeas e 5 machos) da linhagem C57Bl/6. As fêmeas foram randomizadas em dois grupos: grupo Controle – CT (n = 4) e grupo de exposição pré-natal ao álcool – PAE (n = 11). Foram analisados 5 machos e 5 fêmeas por prole. Noventa dias após o nascimento (PN90), os animais de ambos os grupos foram anestesiados por inalação com isoflurano (<20 segundos) e decapitados. Um total de 17 genes foi selecionado de acordo com a participação em vias de transdução de sinais (VTS) de cinética de cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em disfunção cardiovascular. A expressão diferencial destes genes foi analisada em camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE. Para análise estatística foi realizada ANOVA de duas vias, seguido de teste *ad hoc* de Bonferroni. Verificamos aumento na expressão de RNAm de genes de estresse oxidativo GPX4, Cat, Hspa1a/b, Sod1 em machos no grupo PAE em relação ao grupo controle. Não houve aumento para fêmeas do grupo PAE dos genes Cat e Hspa1a/b. Observamos também diferença de expressão de RNAm entre machos e fêmeas do grupo PAE, com aumento significativo de RNAm de GPX4. Machos e fêmeas do grupo PAE apresentaram aumento na expressão de RNAm nos genes de inflamação IL-6, Tnfrsf1a, Tnf- $\alpha$  em relação ao grupo controle. Os machos apresentaram um aumento do gene Tnfrsf1 em relação às fêmeas do grupo PAE. Nos genes de apoptose Bax, Mapk1, Mapk14 e TP53, o grupo PAE apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle, não houve aumento do gene FAS. O grupo PAE apresentou aumento Atp2a2, PLN e RYR2 em relação ao grupo controle, enquanto os genes CAsq2 e SLC8a1as fêmeas do grupo PAE apresentaram diminuição na expressão de RNAm em relação ao grupo controle. Concluímos que a PAE pode desencadear alterações significativas na expressão de genes relacionados à cinética de cálcio, apoptose e inflamação e estresse oxidativo em animais de ambos os sexos. Verificamos que os machos sofreram uma maior lesão. A presença do estrógeno, que atenua o desenvolvimento de cardiopatias, pode ter sido fundamental para a maior proteção observada em fêmeas.

Palavras chave: exposição pré-natal ao álcool, expressão gênica, transdução de sinais, dimorfismo sexual

## ABSTRACT

Alcohol is a psychoactive substance with addictive properties that has been widely used in many cultures for centuries. The abusive use of alcohol causes a large number of illnesses, in addition to a social and economic burden on countries. Women are more vulnerable to alcohol consumption due to a lower amount of enzymes that metabolize it. Alcohol consumption during pregnancy can induce molecular, physiological and behavioral changes in the fetus, often irreversible, such as cell death and imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of fetal cells to protect themselves with endogenous antioxidants. This work aimed to analyze the effect of prenatal alcohol exposure (PAE) on the myocardium of C57BL/6 mice and its impacts on messenger RNA (mRNA) expression of components of calcium kinetic pathways, inflammation, apoptosis and stress oxidative in males and females. To obtain the offspring, object of study of this project, 20 inbred mice (15 females and 5 males) of the C57Bl/6 lineage were used. Females were randomized into two groups: Control group – CT (n = 4) and prenatal alcohol exposure group – PAE (n = 11). Five males and 5 females per offspring were analyzed. Ninety days after birth (PN90), animals in both groups were anesthetized by inhalation with isoflurane (<20 seconds) and decapitated. A total of 17 genes were selected according to their participation in signal transduction pathways (VTS) of calcium kinetics, inflammation, apoptosis and oxidative stress in dysfunction cardiovascular. The differential expression of these genes was analyzed in male and female mice submitted to PAE. For statistical analysis, two-way ANOVA was performed, followed by Bonferroni's ad hoc test. We verified an increase in mRNA expression of oxidative stress genes GPX4, Cat, Hspa1a/b, Sod1 in males in the PAE group compared to the control group. There was no increase for females in the PAE group of the Cat and Hspa1a/b genes. We also observed a difference in mRNA expression between males and females in the PAE group, with a significant increase in GPX4 mRNA. Males and females in the PAE group showed an increase in mRNA expression in the IL-6, Tnfrsf1a, Tnf- $\alpha$  inflammation genes compared to the control group. Males showed an increase in the Tnfrsf1 gene compared to females in the PAE group. In the apoptosis genes Bax, Mapk1, Mapk14 and TP53, the PAE group showed a significant increase compared to the control group, there was no increase in the FAS gene. The PAE group showed increased Atp2a2, PLN and RYR-2 compared to the control group, while the female CAsq2 and SLC8a1as genes in the PAE group showed a decrease in mRNA expression compared to the control group. We conclude that PAE can trigger significant alterations in the expression of genes related to calcium kinetics, apoptosis and inflammation and oxidative stress in animals of both sexes. We found that males suffered a greater injury. The presence of estrogen, which attenuates the development of heart disease, may have been essential for the greater protection observed in females.

Key words: prenatal alcohol exposure, gene expression, signal transduction, sexual dimorphism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Consumo moderado de álcool para homens, idosos e mulheres. ...	20
Figura 2 - Mulheres são mais vulneráveis ao consumo de álcool. ....	22
Figura 3 - Esquema das 3 vias oxidativas do metabolismo alcoólico. ....	26
Figura 4 - Prevalência de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) e Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) na população mundial. ....	32
Figura 5 - Linha do tempo evidenciando alguns dos eventos embrionários na gestação murina relacionando-os com a gestação humana. ....	38
Figura 6 - Sequência experimental do estudo. ....	43
Figura 7 – Expressão de RNAm do gene Gpx4 em camundongos macho e fêmea. ....	53
Figura 8 - Expressão de RNAm de Catalase em camundongos machos e fêmeas com PAE. ....	54
Figura 9 - Expressão de RNAm do gene Hspa1a/b em camundongos machos e fêmeas com PAE. ....	55
Figura 10 - Expressão de RNAm do gene Sod1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	56
Figura 11 - Expressão de RNAm do gene IL-6 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	57
Figura 12 – Expressão de RNAm do gene Tnfrsf1a em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	58
Figura 13 - Expressão de RNAm do gene Tnf- $\alpha$ em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	59
Figura 14 - Expressão de RNAm do gene Bax em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	60
Figura 15 - Expressão de RNAm do gene Fas em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	61
Figura 16 - Expressão de RNAm do gene Mapk1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	62
Figura 17 - Expressão de RNAm do gene Mapk14 em camundongos machos e fêmeas. ....	63

Figura 18 - Expressão de RNAm do gene Tp53 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	64
Figura 19 - Expressão de RNAm do gene Atp2a2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	65
Figura 20 - Expressão de RNAm do gene Casq2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	66
Figura 21 - Expressão de RNAm do gene Pln em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	67
Figura 22 - Expressão de RNAm do gene Slc8a1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	68
Figura 23 - Expressão de RNAm do gene RyR-2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE. ....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agravos à saúde totalmente atribuíveis ao álcool. ....	21
Tabela 2 - Quantidade de nascimentos por categorias de anomalias no Brasil de 2008 – 2017. ....	29
Tabela 3 - Cálculo de diluição para obtenção de 1L da solução de EtOH em relação a porcentagem desejada. ....	45
Tabela 4 - Genes selecionados para análises moleculares (Adaptado <sup>139</sup> ) .....	47
Tabela 5 - Expressão de RNAm dos grupos controle macho e fêmea (A e B) e grupos de exposição pré-natal ao álcool macho e fêmea (C e D) .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau(s) Celsius
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µ	Micrometro(s)
Acetil-CoA	Proteína Acetilcoenzima A
Acta2	Actina alfa 2 do músculo liso $\alpha$
ADH	Álcool desidrogenase
AdoMet	S-adenosilmetionina
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMP	Adenosina Monofosfato
ARBD	Defeitos Congênitos Relacionados ao Álcool
ATP	Trifosfato de Adenosina
Atp2a2	ATPase, transporte de Ca <sup>++</sup> , músculo cardíaco, contração lenta2
AV	Átrio Ventricular
BAC	<i>Blood alcohol concentration</i> / Concentração de álcool no sangue
BAX	<i>Proteína X associada a Bcl2</i>
BDS	<i>Birth Defects</i> / Defeitos do nascimento
BPE	Beber Pesado Episódico
C57Bl/6	Camundongo isogênico C57 <i>Black Six</i>
Casq2	Calsequestrina 2
Cat	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CH <sub>3</sub> CHO	Acetaldeído
CID	Código Internacional de Doenças
CISA	Centro de informações sobre saúde e álcool
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COBEA	Comissão Nacional de Bem-Estar Animal
Col1a1	Gene da cadeia $\alpha$ 1 do colágeno tipo I
Col3a1	Gene da cadeia $\alpha$ 1 do colágeno tipo III

CYP2E1	Citocromo P450 isoforma IIE1
CYP450	Citocromo P450
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
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
EPA	Exposição pré-natal ao álcool
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Álcool etílico/ Etanol
FAA	Fração Atribuída ao álcool
FASD	<i>Fetal Alcohol Spectrum Disorders</i> / Desordens do Espectro Alcoólico Fetal
FAS	Receptor de morte de superfície celular
g	grama(s)
Gpx4	Glutathione Peroxidase4
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidróxido de hidrogênio / Água oxigenada
Hcy	Aminoácido homocisteína (Ácido 2-amino-4mercaptobutanoico)
Hspa 1a/b	Membros 1A e 1B da família de proteínas de choque térmico
IL-6	Interleucina 6
IOM	Instituto de Medicina dos Estados Unidos da América
L	Litro(s)
MAPK1	Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
MAPK14	Proteína quinase 14 ativada por mitogênio
MAT	Enzima metionina-adenosiltransferase
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MED	Média
MEOS	Sistema de enzimas microssomais oxidativas



Met	Aminoácido metionina (Ácido (S)-2-amino-4-(metilsulfanil)butanoico
MS	Ministério da Saúde
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina oxidada
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida ou hidrogenada
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado
NCOP	Não classificados (as) em outras patologias
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OH <sup>+</sup>	Hidroxila
OMICS	Expressão genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Pressão arterial média
PCA	Persistência do canal arterial
PCG-1 $\alpha$	coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PCR	Reação de cadeia da polimerase
PN90	90 dias após o nascimento
Pin	Fosfolamban
pSAF	<i>partial Fetal Alcohol Syndrome</i> / Síndrome Alcoólica Fetal parcial
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RyR-2	<i>Receptor 2 de Rianodina</i>
SAF	<i>Fetal Alcohol Syndrome</i> / Síndrome Alcoólica Fetal
SIDS	Síndrome da morte súbita do lactente
SINASC	Sistema de Informação de Nascidos Vivos do Brasil
Slc8a1	Família de trocadores de soluto (NA-CA) 8, membro A1
SOD1	Superóxido dismutase 1
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde no Brasil

SUS	Sistema Único de Saúde
Tnf- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Tnfrsf1a	Membro da Super família do receptor do fator de necrose tumoral 1 a
Tp53	Proteína tumoral P53
tRNA	RNA transportador de aminoácidos para os ribossomos
UCP-2	Proteína desacopladora 2
Vigitel	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VTS	Via de Transdução de sinais
WHO	<i>World Helth Organization</i> / Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	19
1.1 Mulheres e o consumo de álcool.....	21
1.2 Metabolismo do álcool.....	23
1.3 Exposição Pré-Natal ao Álcool.....	26
1.4 Exposição Pré-Natal ao Álcool, Síndrome Alcoólica Fetal e Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal.....	30
1.5 Alterações Cardíacas geradas pela Exposição Pré-natal ao Álcool.....	33
1.6 Gestação Murina.....	36
1.7 Biomarcadores .....	39
1.8 Objeto de estudo, problematização e formulação da hipótese.....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	42
2.1 Objetivo Geral .....	42
2.2 Objetivos Específicos .....	42
<b>3. MÉTODOS</b> .....	43
3.1 Modelo animal e desenho do estudo .....	43
3.1.1 <i>Protocolo grupo Controle</i> .....	44
3.1.2 <i>Protocolo grupo Etanol</i> .....	45
3.2 Análise da expressão gênica.....	47
3.2.1 <i>Coleta dos materiais biológicos</i> .....	47
3.2.2 <i>Biomarcadores</i> .....	47
3.2.3 <i>Procedimentos – PCR “Array”</i> .....	48
a. Extração do DNA .....	48
b. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras .....	49
c. Síntese de cDNA – Transcrição reversa .....	50
d. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR.....	50
3.3 Análise estatística .....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	52
4.1 Expressão de RNA mensageiro (RNAm) do gene Glutathiona Peroxidase 4 (Gpx4) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE..	53
4.2 Expressão de RNA mensageiro (RNAm) do gene Cat (Catalase) no miocárdio .....	54
de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	54

4.3 Expressão de RNAm de membros 1A e 1B da família de proteínas de choque térmico (Hsp70) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	55
4.4 Expressão de RNAm de Superóxido Dismutase 1 (Sod1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à EPA .....	56
4.5 Expressão de RNAm de Interleucina 6 (IL-6) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE.....	57
4.6 Expressão de RNAm de Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1a (Tnfrsf1a) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE.....	58
4.7 Expressão de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	59
4.8 Expressão de Proteína X associada a BCL2 (BAX) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	60
4.9 Expressão de RNAm de Receptor de morte de superfície celular Fas no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	61
4.10 Expressão de RNAm de Proteína Quinase 1 ativada por mitogênio (Mapk1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE.....	63
4.11 Expressão de RNAm de Proteína Quinase 14 ativada por mitogênio (Mapk14) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	64
4.12 Expressão de RNAm de Proteína Tumoral P53 (Tp53) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	65
4.13 Expressão de RNAm de ATPase de músculo cardíaco de contração lenta 2 (Atp2a2) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	66
4.14 Expressão de RNAm de Calsequestrina 2 (Casq2) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	67
4.15 Expressão de RNAm de Fosfolamban (Pln) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE.....	69
4.16 Expressão de RNAm de trocadores de soluto (Na-Ca) 8, membro A1 (Slc8a1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	70

4.17 Expressão de RNAm Receptor 2 de Rianodina Cardíaco (RyR-2) no ..... 71	71
miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE .....	71
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>100</b>



## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O álcool ou etanol (EtOH) é uma substância psicoativa com propriedades causadoras de dependência que tem sido amplamente utilizado em muitas culturas durante séculos. O uso abusivo de álcool causa um grande número de doenças, levando sobrecarga social e econômica aos países. Fatores como desenvolvimento econômico, cultural, disponibilidade de álcool e a eficácia das políticas de álcool são relevantes para explicar diferenças e tendências históricas no consumo de álcool e danos relacionados<sup>1</sup>.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece como uso nocivo do álcool a ocorrência de consequências sociais e de saúde — tanto para o consumidor quanto às pessoas próximas a ele e para a sociedade em geral — ou quando o padrão de consumo está associado a maior risco de danos à saúde<sup>2</sup>.

O uso de álcool impacta a economia de diversas maneiras. Embora gere uma renda considerável ao longo de sua cadeia produtiva, quando o álcool é utilizado de maneira nociva, cria repercussões econômicas negativas, pelas doenças, acidentes e outros agravos associados a ele. Esses impactos podem ser diretos (custos relativos às lesões totalmente atribuíveis ao álcool), e indiretos, quando seu consumo está relacionado à diminuição ou perda de produtividade, a acidentes de trânsito, de trabalho e situações de violência<sup>3</sup>.

Em 2018, dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) mostraram que nas 27 capitais brasileiras, a frequência do consumo abusivo de álcool pelos usuários foi de 26% para homens e de 11% para mulheres. A análise de regressão logística aponta que os homens têm cerca de três vezes mais chances de consumo abusivo do que as mulheres. Outro dado importante é que, a despeito do consumo abusivo ser predominante entre homens, houve um aumento significativo entre mulheres entre 2010 e 2018, especialmente nas faixas etárias de 18 a 24 anos (de 14,9% para 18%) e de 35 a 44 anos (de 10,9% para 14%)<sup>4</sup>.

As mulheres, por suas características fisiológicas específicas, apresentam maior vulnerabilidade aos efeitos do álcool. Dados mostram que há uma tendência de aumento de consumo nessa população, chamando a atenção para a

necessidade de ações específicas que contemplem suas necessidades e singularidade (**Figura 1**)<sup>4</sup>.

O Beber Pesado Episódico (BPE) é o consumo de 60g ou mais de álcool puro em uma única ocasião, pelo menos uma vez no último mês. O Brasil se destaca, segundo a OMS, como um dos países que apresentam altas porcentagens de BPE: 19,4% da população com 15 anos ou mais relatou tal comportamento em 2016, índice superior ao observado anteriormente, em 2010 (12,7%), e também ao mundial (18,2%)<sup>2</sup>.

**Figura 1** - Consumo moderado de álcool para homens, idosos e mulheres.



Fonte: Andrade, A. Álcool e a saúde dos brasileiros. – PANORAMA 2020 pag.13

O padrão de consumo de álcool é um elemento importante para a avaliação dos riscos e prejuízos associados ao seu uso. O BPE está associado à maior ocorrência de brigas, violência, acidentes, tentativas de suicídio, sexo desprotegido, gravidez indesejada e intoxicação alcoólica. Por essa razão, é considerado um problema de saúde pública, passível de prevenção<sup>4</sup>.

Independentemente da quantidade ingerida, o corpo humano leva de 1 a 3 horas para metabolizar 14 g de álcool puro (1 dose). Esse montante varia amplamente de pessoa para pessoa e de ocasião para ocasião, pois diversos fatores influenciam esse processo, com destaque para o sexo biológico. Diferenças fisiológicas entre homens e mulheres, como o volume de água no organismo e a presença de enzimas que metabolizam o álcool, também influenciam esse processo<sup>5</sup>.



Se frequente, o BPE pode aumentar o impacto negativo do álcool em diversos órgãos e sistemas, especialmente: trato gastrointestinal, fígado, pâncreas, sistema nervoso e sistema cardiovascular. Está bem consolidado que o consumo nocivo está fortemente relacionado a malefícios para a saúde como um todo. Condições de saúde totalmente atribuíveis ao uso de álcool: há relação de causalidade direta, como psicose alcoólica, dependência de álcool, Síndrome Alcoólica Fetal e cirrose hepática alcoólica (**Tabela 1**)<sup>6</sup>.

**Tabela 1** - Agravos à saúde totalmente atribuíveis ao álcool.

<b>Totalmente atribuíveis ao Álcool (FAA=100%)</b>	<b>CID</b>
Dependência de álcool	F10.2
Envenenamento causado pelo álcool	X45.0
Intoxicação alcoólica aguda	F10.0
Miopatia alcoólica	G72.1
Síndrome alcoólica fetal	Q86.0
Transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de álcool	F10.0
Uso nocivo de álcool	F10.1

Fonte: Andrade, A. Álcool e a saúde dos brasileiros. – PANORAMA 2020 pag.13

### 1.1 Mulheres e o consumo de álcool

Em muitos países, o consumo de álcool e os problemas relacionados ao consumo foram observados em homens e mulheres. Altos índices de abuso e dependência foram observados nas Américas para ambos os sexos: 11,5% entre homens e 5,1% das mulheres. No Brasil, segundo o relatório da OMS, 1,6% das mulheres brasileiras apresentam algum transtorno relacionado ao uso de álcool (para os homens, a prevalência é de 6,9%), sendo que 0,5% apresenta diagnóstico de dependência (entre homens é 2,3%)<sup>7</sup>.

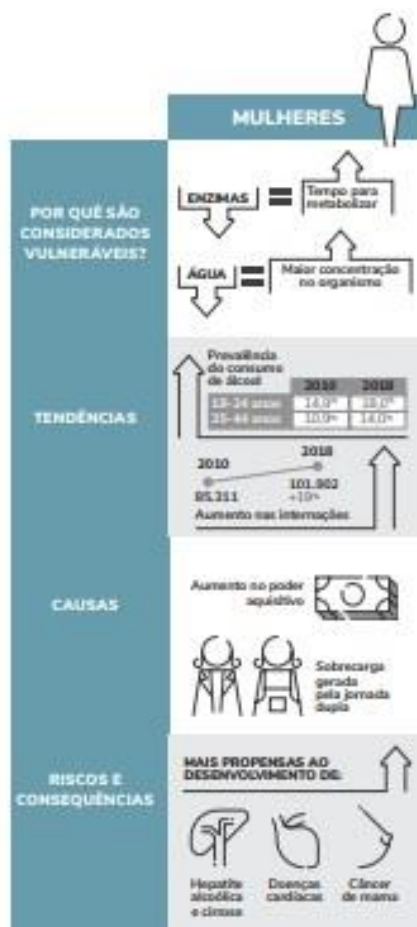
Nos últimos anos, em função das mudanças no estilo de vida das mulheres, houve um aumento significativo do uso de álcool, não só em relação à quantidade, mas também à frequência. Globalmente, prevê-se que a diferença entre homens e mulheres que bebem diminuirá progressivamente até 2030, em

parte devido ao aumento da participação das mulheres no mercado de trabalho e em razão das mudanças de hábitos das mulheres mais jovens<sup>8</sup>.

O consumo do álcool por mulheres gera uma série de preocupações, uma vez que as mesmas são mais sensíveis ao álcool do que os homens, por geralmente, possuírem menor quantidade de água e de enzimas que metabolizam a substância, deixando-a por mais tempo, em maior concentração no organismo **(Figura 2)**<sup>9</sup>.

Um estudo nacional de 2019 mostrou as consequências negativas associadas ao uso nocivo de álcool pelas mulheres: quase metade das que reportaram BPE também relataram ter relações sexuais desprotegidas; entre as mulheres jovens (com 20 anos ou menos) que reportaram BPE, mais de 1 em cada 10 ficou ou estava grávida, e a chance de ter um aborto foi 2 vezes maior do que entre as que não relataram BPE<sup>10</sup>.

**Figura 2** - Mulheres são mais vulneráveis ao consumo de álcool.



Fonte: Andrade, A. Álcool e a saúde dos brasileiros. – PANORAMA 2020 pag.13 Em determinadas atividades ou momentos, mesmo uma pequena quantidade de álcool pode colocar em risco tanto a saúde de quem o consome, como a de terceiros. Por isso, com base em orientações da OMS, o CISA considera inaceitável o consumo de bebidas alcoólicas se a pessoa estiver grávida, tentando engravidar ou amamentando<sup>4</sup>.

Apesar de atualmente caminharmos para uma equiparação de papéis entre homens e mulheres na sociedade, fisiologicamente elas são mais sensíveis aos efeitos do álcool. É preciso lidar com essa questão com cuidado e atenção, com programas de prevenção e tratamento específicos e adequados para esse grupo<sup>2</sup>.

## 1.2 Metabolismo do álcool

Quatro aspectos essenciais devem ser considerados no estudo da toxicidade do álcool: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. O EtOH é de baixa massa molecular e solúvel em água e lipídios. É importante referir que o etanol é inteiramente absorvido pelo tubo digestivo: 30% no estômago, cerca de 65% no duodeno, imediatamente após a sua passagem pelo piloro, e o restante no cólon<sup>11</sup>.

Uma vez absorvido, sua distribuição é rápida, atinge todos os tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais, por ser uma molécula pequena e solúvel tanto em meio aquoso como em meio lipídico<sup>12</sup>. A eliminação de 10% do etanol ingerido é feita pela urina, suor e respiração (o que permite realizar o doseamento da alcoolemia pelo ar expirado). Os restantes 90% são metabolizados no fígado, quase na sua totalidade, no hepatócito. Não é armazenado no corpo, pois tudo o que é ingerido é oxidado<sup>13</sup>.

O álcool é metabolizado principalmente no fígado através de uma série de alterações metabólicas e reações oxidativas. A primeira reação é catalisada por uma enzima, a álcool desidrogenase (ADH), localizada no citosol. No indivíduo bebedor excessivo/alcoólico crônico, em que a atividade de ADH pode encontrar-se bloqueada, duas outras vias, “vias de recurso”, são também chamadas a intervir: a via do Sistema Mitocondrial de oxidação do etanol (MEOS) e a da catalase, localizada nos peroxissomos dos hepatócitos, responsável por

apenas 10% do metabolismo do álcool. A produção de acetaldeído é a principal consequência metabólica via ADH, este e outros aldeídos são capazes de formar radicais livres e podem ainda conduzir a respostas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas, que parecem contribuir para a progressão da lesão hepática<sup>13,14,15</sup>.

A via clássica do metabolismo do etanol, a enzima ADH e a sua coenzima, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), é convertida na sua forma reduzida catalisa a transformação de etanol para acetaldeído (CH<sub>3</sub>CHO): **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH + NAD<sup>+</sup> → CH<sub>3</sub>CHO + NADH + H<sup>+</sup>**. Nesta reação um íon de hidrogênio é transferido do etanol para NAD<sup>+</sup><sup>16</sup>.

A segunda via é o sistema mitocondrial de oxidação do etanol (MEOS), via catálise da isoenzima citocromo P450 (CYP450). As enzimas nesta família incluem as isoformas 2E1, 1A2 e 3A4, que variam em sua capacidade de oxidar o etanol. Esta via utiliza o NADPH em lugar do NAD: **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH + NADPH + H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub> → CH<sub>3</sub>CHO + NADP<sup>+</sup> + 2H<sub>2</sub>O**. A isoenzima 2E1 é um catalisador significativo para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) no consumidor de álcool, já que foi demonstrado que gera mais quantidade de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>19</sup>. Sua elevação no fígado dos consumidores de etanol também tem sido associada ao aumento na geração de radicais hidroxila (OH<sup>+</sup>)<sup>20</sup>.

A terceira via de metabolização do etanol que possui uma pequena participação no processo-catalase, representa 10% da biotransformação peroxidativa do etanol e é limitada pela produção endógena de água oxigenada: **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{Catalase}}$  CH<sub>3</sub>CHO + 2H<sub>2</sub>O**. Esta é uma via de recurso tóxica, sendo a formação de água oxigenada responsável pela destruição de ácidos nucleicos constituintes dos cromossomos indispensáveis à multiplicação celular<sup>19</sup>.

Todas as três vias produzem metabólitos específicos e resultam na produção de acetaldeído como produto final. Numa segunda fase há então a formação de acetato, esta trata-se de uma reação essencialmente hepática (90 a 95%) catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) enzima que possui elevada atividade mitocondrial. Ressaltando que a transformação de acetaldeído para acetato é praticamente irreversível. O acetaldeído pode interagir com aminoácidos como lisina, serina e cisteína<sup>20</sup>.

Na conversão do acetato em coenzima A, há o desdobramento de ATP para adenosina monofosfato (AMP), o AMP poderá ser convertido novamente em ATP ou em purinas e ácido úrico. O acetil-coenzima A, por sua vez, entrará no ciclo de Krebs, transformando-se em dióxido de carbono e água, assim, o acetato, metabolito final da degradação do álcool, é uma ótima forma de energia, inibindo a oxidação lipídica e causando alterações metabólicas e conseqüentemente doenças<sup>21</sup>.

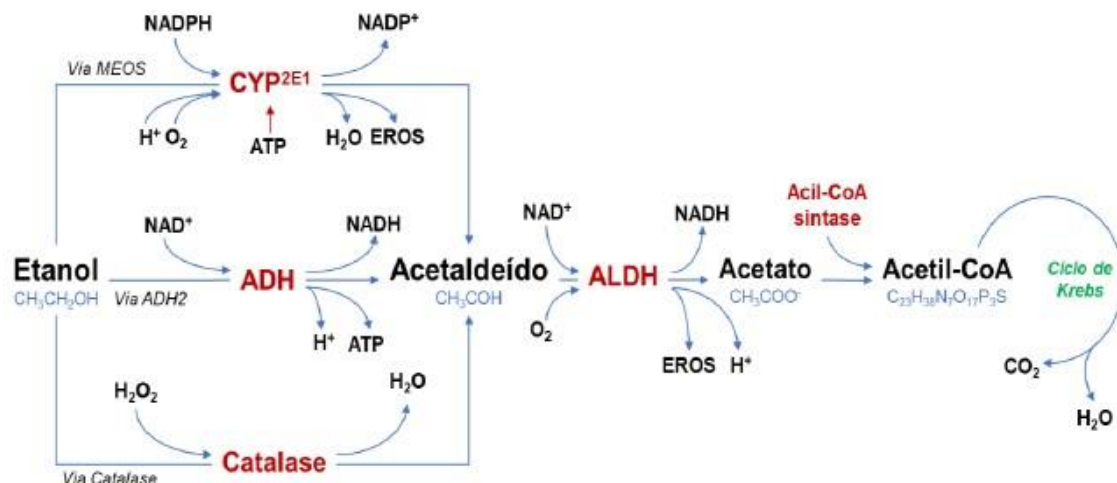
Na oxidação do etanol pela ADH e subsequente oxidação de acetaldeído há um significativo aumento na razão NADH/NAD. Esta mudança tanto na mitocôndria, como no citoplasma, pode causar desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e alterações da exocitose por ligação à tubulina, reduz também o nível de glutathione e aumenta o efeito tóxico de radicais livres. Interfere com a cadeia de transporte de elétrons, causando alterações estruturais na mitocôndria, e inibe os mecanismos de reparação do DNA<sup>22</sup>.

Existem várias formas moleculares de ALDH que intervêm em diferentes metabolismos, nomeadamente nos dos aldeídos derivadas de aminas. O ALDH pode condensar-se com catecolaminas e com indolaminas, para formar compostos de estrutura muito semelhante à de certos produtos psicoativos e alucinógenos. Daí o papel que ultimamente tem sido atribuído ao acetaldeído na formação da dependência alcoólica<sup>18</sup>.

O estresse oxidativo induzido pelo álcool está ligado ao metabolismo alcoólico (**Figura 3**) e pode ter efeitos diretos ou ainda mediados por seus metabólitos secundários, sendo marcante sua atuação sobre a redução dos níveis plasmáticos ou séricos dos antioxidantes dietéticos, entre eles: atocoferol, ácido ascórbico e selênio<sup>23</sup>.

Das & Vasudevan, sugeriram que o metabolismo do etanol está diretamente envolvido na geração EROS e nitrogênio, bem como na depleção dos componentes do sistema antioxidante e aumento nos níveis de marcadores específicos, sobretudo malondialdeído (MDA)<sup>23</sup>.

**Figura 3** - 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 microsomais oxidativas; NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamidaadenina hidrogenado; NADP+ – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamidaadenina; 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 hidrogenado; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio; H<sub>2</sub>O – hidróxido de hidrogênio; Acetil-CoA – Acetil coenzima A; H+ – hídrion (cátion de hidrogênio); O<sub>2</sub> – Oxigênio; CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono. (arquivo pessoal).

### 1.3 Exposição Pré-Natal ao Álcool

As mulheres possuem uma produção menor de ADH 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<sup>24</sup>.

No período embrionário, por exemplo, irão ocorrer eventos essenciais, 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<sup>25,26</sup>.

Pesquisas sobre os possíveis mecanismos teratogênicos envolvidos em SAF (Síndrome Alcoólica Fetal) e Defeitos Congênitos Relacionados ao Álcool (ARBD)

centraram-se em torno da toxicidade, disfunção placentária, déficits nutricionais, hipóxia fetal e toxicidade por acetaldeído<sup>27</sup>.

Deve-se considerar também que não é fácil padronizar a magnitude da exposição pré-natal ao álcool (PAE), seu poder de interação ou doses seguras por serem dependentes de fatores como tempo, nível de exposição e estado nutricional materno<sup>28,29</sup>.

Além disso, cerca de 2% do álcool consumido pela mãe durante o período de amamentação é transferido ao filho, percentual suficiente para prejudicar o desenvolvimento neuromotor, o sono e o aprendizado<sup>30-33</sup>, fazendo deste, o principal agente teratogênico causador de defeitos congênitos evitáveis<sup>34-37</sup>.

O álcool pode favorecer alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais, muitas vezes irreversíveis<sup>38-40</sup>, 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<sup>35,41</sup>.

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<sup>42,43</sup>.

Mulheres com mais de 30 anos, possuem um risco maior de desenvolverem problemas gestacionais e fetais ao consumir álcool durante a gestação, aumentando ainda mais o risco de diversos tipos de defeitos do nascimento (BDs)<sup>44-47</sup>.

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<sup>44,45,47</sup>.

No Brasil, são considerados como a segunda maior causa de mortalidade infantil (11,2%), e representam 37% de todas as internações pediátricas<sup>48-50</sup>. Além disso, estudos recentes mostraram que as anomalias cardíacas ou do sistema circulatório foram as principais responsáveis por tais óbitos no Brasil, apresentando, segundo o DATASUS 19.386 casos, no período de 2008 à 2017, (**Tabela 2**)<sup>49,51, 52</sup>.

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. Temos cerca de 9,8% das gestantes consumindo álcool em 2017 segundo a OMS <sup>49</sup>.

No Brasil, diversos estudos recentes tentaram mensurar esse consumo, apresentando estimativas altas que variam de 10 a 40% das gestantes participantes <sup>53-57</sup>. 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 <sup>46,52, 57-59</sup>.

Estudos clínicos demonstram que o EtOH se difunde pela placenta e se distribui rapidamente no compartimento fetal, onde o EtOH também tem uma taxa mais lenta de eliminação (3 a 4% da taxa materna). Há um acúmulo de EtOH no líquido amniótico. Este reservatório causa maior exposição fetal ao EtOH e é agravado pela deglutição fetal, causada pela excreção renal, excretando xenobióticos no líquido amniótico que o feto então engole <sup>60</sup>.

Os processos oxidativos e não oxidativos regulam o metabolismo do álcool. A ADH é a principal enzima para o metabolismo do ETOH e o CYP2E1 hepático tem um papel menor na biotransformação de EtOH em acetaldeído<sup>61</sup>.

A via CYP2E1 normalmente é responsável por apenas 10% do metabolismo de EtOH, mas torna-se mais significativo durante a ingestão de altas concentrações de álcool, devido a saturação de ADH. Portanto, uma vez que as concentrações de álcool no sangue (BAC) exceder 4,5mg/dl, o EtOH segue a cinética de eliminação de saturação pelo ADH e favorece o metabolismo por CYP2E1<sup>62</sup>.

No feto o metabolismo do álcool é diferente. A placenta tem funcionalidade metabólica devido à expressão enzimática no primeiro trimestre (quando o fígado está se desenvolvendo). Neste caso, o CYP2E1 é a principal enzima metabolizadora, porque CYP2E1 é induzido por álcool e EtOH possui maior afinidade para CYP2E1 placentário do que ADH<sup>63</sup>.



**Tabela 2** – Quantidade de nascimentos por categorias de anomalias no Brasil de 2008 a 2017.

<i>Categorias de anomalia</i>	<i>Nascimentos</i>		
	2008-2012	2013-2017	2008-2017
Espinha bífida	2.568	3.265	5.833
Outras malformações congênitas do sistema nervoso	9.748	13.592	23.340
Malformações congênitas 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 congênitas 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 congênitas do quadril	508	811	1.319
Deformidades congênitas dos pés	14.415	13.516	27.931
Outras Malformações e deformações congênitas do aparelho osteomuscular	30.072	31.637	61.709
Outras malformações congênitas	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
<b>TOTAL</b>	<b>107.879</b>	<b>12.1243</b>	<b>229.122</b>

Fonte: MS/SVS/DASIS – Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC 10/2019. NCOP – Não Classificado em Outra Patologia – Classificação CID10.

O fígado fetal expressa CYP2E1 mais precocemente (com 16 semanas de gestação) quando comparado com ADH (26 semanas). Níveis significativos de CYP2E1e mRNA foram encontrados no tecido cerebral fetal entre 45 e 113 dias de gestação. O álcool, portanto, tem um efeito prolongado no feto devido ao acúmulo amniótico e concentrações reduzidas de enzimas metabólicas fetais. Os níveis de CYP2E1 permaneceram relativamente baixos durante a gravidez

umentando gradualmente para 30 a 40% dos níveis hepáticos de um adulto 1 ano após o parto e tem eliminação reduzida<sup>64</sup>.

O uso do álcool na gravidez prejudica o transporte de nutrientes essenciais e cofatores necessários para o crescimento e desenvolvimento fetal, como a biotina e a vitamina B6. O EtOH causa vasoconstrição levando possivelmente ao retardo do crescimento observado na SAF (Síndrome Alcoólica Fetal) causado pelo fornecimento prejudicado de oxigênio e nutrientes ao feto. Isso ocorre pela via de estresse oxidativo diminuindo a disponibilidade de óxido nítrico (vasodilatador), ou desregulando o balanceamento de tromboxano (vasoconstritor) e prostaciclina (vasodilatador)<sup>65</sup>.

Um estudo realizado com 359 neonatos com PAE determinou que a concepção é o período crítico da gestação para causa de anomalias no feto <sup>66</sup>. Como um limite seguro de consumo de álcool na gravidez não está definido, a abstinência durante a gravidez é a medida preventiva mais prudente<sup>67</sup>.

#### **1.4 Exposição Pré-Natal ao Álcool, Síndrome Alcoólica Fetal e Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal**

Historicamente a humanidade suspeitou que o consumo de álcool estivesse de alguma forma relacionado às más-formações congênitas. A cidade de Londres, no século XVIII, apresentou uma oportunidade única de observar os efeitos do álcool sobre o feto. Foi a conhecida “Epidemia do Gin” de 1720 a 1750<sup>68</sup>.

O consumo da bebida estimulada por medidas promovidas pelo Parlamento britânico causou a mortalidade fetal e infantil em menores de 5 anos. Em 1725 o Colégio de Médicos alertou sobre os efeitos do álcool no temperamento de crianças. Observações e relatórios continuaram ao longo dos séculos XVIII e XIX<sup>69</sup>.

Um estudo bem organizado para a época e publicado em 1899 pelo Dr. Willian Sullivan registrou observações de 600 crianças nascidas de 120 detentas alcoolistas em uma prisão de Liverpool. Seu trabalho representa uma das

primeiras descrições do que mais tarde seria chamada de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF)<sup>70</sup>.

Nos Estados Unidos em 1973 Jones e cols. publicaram seus achados de anormalidades em nascidos e denominaram de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Hoje o álcool é reconhecido como um teratogênico, uma substância capaz de produzir defeitos ao nascer<sup>71</sup>.

O diagnóstico de SAF requer três achados específicos: a) atraso no crescimento pré-natal ou pós-natal; b) perturbações do sistema nervoso central que pode incluir tremores, reflexo de sucção deficientes, tônus muscular anormal, hiperatividade ou déficit de atenção ou deficiência intelectual; c) pelo menos duas anomalias faciais características largura estreita dos olhos, ptose, lábio superior fino, um pequeno e arrebitado nariz com subdesenvolvimento do sulco entre a base do nariz ao topo do lábio superior e subdesenvolvimento (hipoplasia) da hemiface<sup>72</sup>.

As estimativas de incidências de SAF variam consideravelmente de 0,5 a 3/1000 nascidos vivos<sup>73,74</sup>. Nesta incidência a SAF é a principal causa conhecida de retardo mental, à frente da Síndrome de Down<sup>75</sup>.

Devido às variáveis de efeitos físicos e comportamentais geradas pelo álcool no feto, que são difíceis de diagnosticar como SAF, no ano de 1996 o Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM) criou uma escala de distúrbios chamada Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal (FASD), com variações de leves a graves e classificados em: Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), considerada como a forma mais grave, e Síndrome Alcoólica Fetal parcial (pSAF)<sup>76-78</sup>.

Este termo abrangente (FASD) identifica a gama de resultados da PAE e os defeitos congênitos relacionados ao álcool (ARBD)<sup>79,80</sup>.

Dentre as alterações causadas pela PAE, como a síndrome de abstinência neonatal, epilepsia, autismo, entre outras<sup>81</sup>, pode-se concluir que os Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) sejam os mais preocupantes para a saúde pública mundial, pois quando não fatais, demandam cuidados médicos por toda a vida do indivíduo<sup>34-36</sup>.

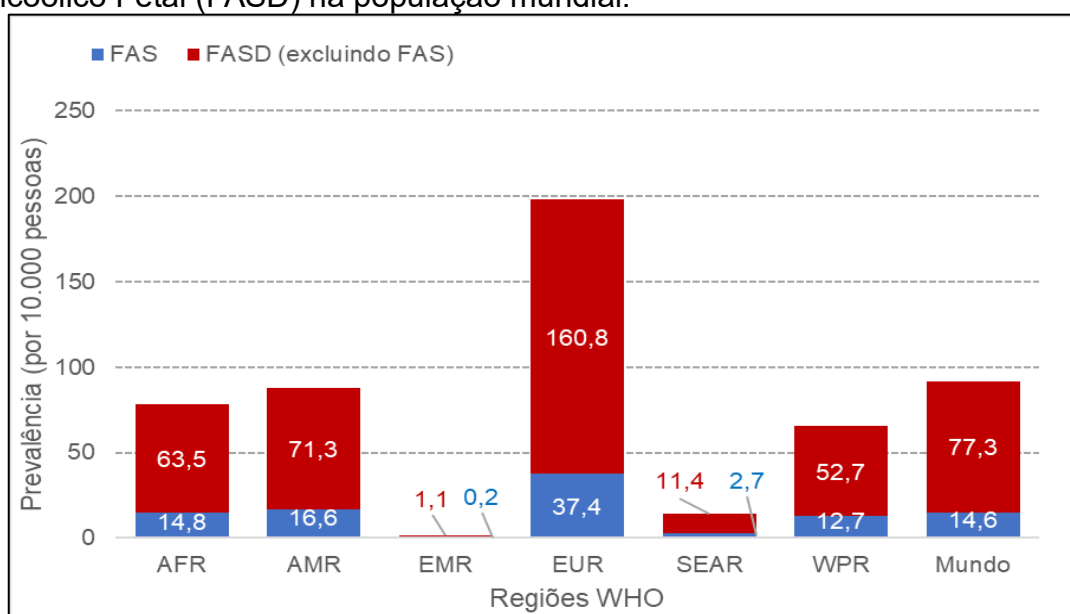
Estudos apontam que sua prevalência varia de 0,5 a 7,73 casos por 1.000 nascidos vivos numa população normal, podendo chegar a até 9,8 em grupos de risco<sup>37, 78, 82-84</sup>.

Além disso, segundo a OMS a prevalência de FASD (incluindo SAF) é maior nas divisões regionais Europa (160,8) e Américas (71,3) a cada 10.000 habitantes (**Figura 4**)<sup>47</sup>.

No Brasil, correspondem ao surgimento de 1.500 a 3.000 novos casos anuais ou a ocorrência de 1 a cada 1.500 nascimentos<sup>40</sup>, estimativas que ultrapassam outros BDs como síndrome de Down e espinha bífida (**Tabela 2**)<sup>38</sup>.

50, 85, 86.

**Figura 4** - Prevalência de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) e Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) na população mundial.



SAF – Síndrome Alcoólica Fetal; FASD - Distúrbios do Espectro Alcoólico Fetal; AFR – África; AMR – Américas; EMR – Mediterrâneo oriental; EUR – Europa; SEAR – Sudeste asiático; WPR – Pacífico ocidental.

Fonte: World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018

As alterações físicas (ptose palpebral, hemiface achatada, hirsutismo, lábio superior fino, baixo peso ao nascer, distúrbios de crescimento e peso)<sup>34, 40, 41, 87, 88-91</sup> 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<sup>34-37, 39, 81, 88, 89, 92</sup>.

Além dessas, é comum ocorrer microcefalia, agenesia do corpo caloso, anomalias renais e defeitos cardíacos<sup>40, 92, 93</sup>. 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<sup>26, 94-96</sup>.

Contudo, a maioria dos indivíduos afetados pela PAE não apresentam dismorfologias características da FASD, apresentando somente alterações celulares ou relacionadas à produção de substâncias endógenas<sup>38, 41, 97, 98</sup>, exigindo para diagnóstico a confirmação do consumo materno na gravidez<sup>99</sup>, assim constituindo um desafio ao diagnóstico da FASD<sup>89,100</sup>.

### **1.5 Alterações Cardíacas geradas pela Exposição Pré-natal ao Álcool**

O álcool durante a gravidez deve ser considerado um cofator significativo e evitável na gênese multifatorial dos defeitos cardíacos, não apenas no caso de abuso e dependência, mas também no caso do consumo habitual de álcool<sup>98</sup>

Defeitos do septo ventricular, persistência do canal arterial (PCA) e estenose da artéria pulmonar são efeitos teratogênicos que podem ser causados pela PAE no coração do feto em desenvolvimento<sup>100</sup>.

O abuso de álcool e o vício durante a gravidez podem causar danos ao músculo cardíaco e defeitos cardíacos na prole. Em um estudo realizado com 216 crianças com SAF foram diagnosticadas e examinadas quanto a defeitos cardíacos congênitos. Exames de cateterismo e ecocardiografias confirmaram defeitos cardíacos em 63 crianças = 29,1%), mais frequentemente defeitos do septo ventricular (24/63) e defeitos do septo atrial (23/63), também defeitos AV (3 casos), PCA (3 casos), Tetralogia de Fallot (5 casos) e outras malformações (5 casos), cardiomiopatias congênitas por álcool aparecem raramente (3 casos). Os defeitos cardíacos ocorreram predominantemente com uma gravidade clínica elevada e com uma fase avançada de alcoolismo materno (com gravidade leve em 21%, com gravidade moderada em 30,0%, com alta gravidade (grau III) em 41%), menos frequentemente (4/38 = 11%) com os chamados efeitos do álcool<sup>101</sup>.

As alterações cardíacas mediadas pela PAE podem ser divididas em diretas, causadas na estrutura e formação das células cardíacas (cardiomiócitos) e indiretas, relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos que atuam no funcionamento do sistema cardiovascular<sup>78, 90</sup>.

As cardiopatias congênitas, por exemplo, ocorrem em 50% dos indivíduos nascidos com SAF e em 38% dos nascidos com FASD, variando entre defeitos do septo atrial ou ventricular, malformação aórtica e valvares, baixo peso cardíaco e atrofia<sup>102</sup>, 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<sup>103</sup>.

O álcool pode interferir no processo de acoplamento de contração por excitação (E-C), interferindo nos níveis de cálcio no citosol das células contráteis, além de reduzir sua sensibilidade ao cátion<sup>105</sup>.

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<sup>106</sup>.

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<sup>107</sup>.

Em ratos foi verificada diminuição na quantidade de miócitos e aumento do tamanho do ventrículo esquerdo. Filhotes de camundongos expostos ao álcool durante a gestação apresentaram paredes ventriculares mais finas, defeitos valvares, além de pressão arterial elevada, resultante de uma função renal e vascular aumentadas<sup>108, 109</sup>.

Estudos como de Yuan *et al.* mostraram que ocorre redução na expressão das proteínas SOD1, UCP-2 e PCG-1 $\alpha$ , importantes para a

funcionalidade dos cardiomiócitos, após exposição pré-natal ao álcool em camundongos quando submetidos à dieta hiper lipídica<sup>109</sup>.

Isso permite 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<sup>110</sup>.

Os fibroblastos, por exemplo, são sensíveis a estímulos nocivos e são responsáveis pela produção da matriz extracelular (MEC) cardíaca, que está envolvida na fixação e organização dos cardiomiócitos<sup>111-113</sup> e, também, no controle da proliferação, migração e diferenciação celular<sup>114</sup>.

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  $\alpha$  (Acta2) e aumentando a secreção de colágeno<sup>115</sup>.

Ninh *et al.* (2019), 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 (RNAm) de Col1a1 e aumento do RNAm de Col3a1, bem como a diminuição da expressão proteica de Col1a1 e aumento de Col3a1 no tecido cardíaco<sup>78</sup>.

Prioste *et al.* (2003) verificaram que humanos adultos expostos ao EtOH apresentaram alterações epigenéticas no ciclo metionina-homocisteína, por reduzir a absorção de folato devido à carência de vitamina B6, componente chave nesse ciclo<sup>114</sup>.

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<sup>116</sup>, ciclo fundamental na função celular normal, principalmente na síntese de proteínas<sup>117-</sup>

Sprince *et al.* (1974) já haviam demonstrado que a cisteína (Cys) diminuiu os efeitos da exposição de álcool em ratos, principalmente ao fígado, participando da cadeia do acetaldeído<sup>119</sup>.

Porém, quando há desequilíbrio na cadeia metionina-homocisteína, o aumento de homocisteína no organismo (hiper-homocisteinemia), se tornou fator de risco para patologias cardiovasculares como, aterosclerose, derrame, trombose e lesões vaso oclusivas, culminando em obstrução e rompimento dos vasos e consequente isquemia<sup>118, 102-122</sup>.

Entretanto, os estudos relacionados à FASD e doenças cardíacas se restringem ao período de desenvolvimento do coração e pouco se sabe como o 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<sup>78</sup>.

Turcotte *et al.*(2002) verificaram após exposição pré-natal crônica ao álcool no período gestacional (6,36% v/v) elevação na pressão arterial média e diminuição do relaxamento dependente do endotélio aórtico na prole de ratos às 25 semanas de idade<sup>108</sup>.

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<sup>123</sup>.

Walton *et al.* (2019) 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<sup>124</sup>.

## 1.6 Gestação Murina

Diversos modelos animais podem ser utilizados para o estudo da exposição fetal ao álcool como, drosófilas, sapos, vermes e peixes<sup>125</sup>. 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. Contudo, com a importância da amamentação nessa exposição, os modelos mamíferos são mais amplamente utilizados, principalmente os roedores<sup>126</sup>.

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<sup>93</sup>.

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<sup>127</sup>.

Outra particularidade importante é que os 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 é expelido, mas regenerado (diestro) para o próximo ciclo reprodutivo permitindo a obtenção de proles com maior facilidade<sup>104,128,129</sup>.

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<sup>128,129</sup>.

Após o início da gestação (5º dia) ocorre a implantação dos embriões no endométrio. Devido à formação de células deciduais e do 6º ao 8º dia, a implantação se estende para a região mesometrial do útero, ocorrendo remodelamento da MEC do endométrio e vários processos denominados decidualização, que permitirão ao útero, por meio da modificação de células fibrosas, estocar energia para o desenvolvimento do zigoto. Nesse período também são formadas duas estruturas, a decídua antimesometrial, que foi 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<sup>130,131</sup>.

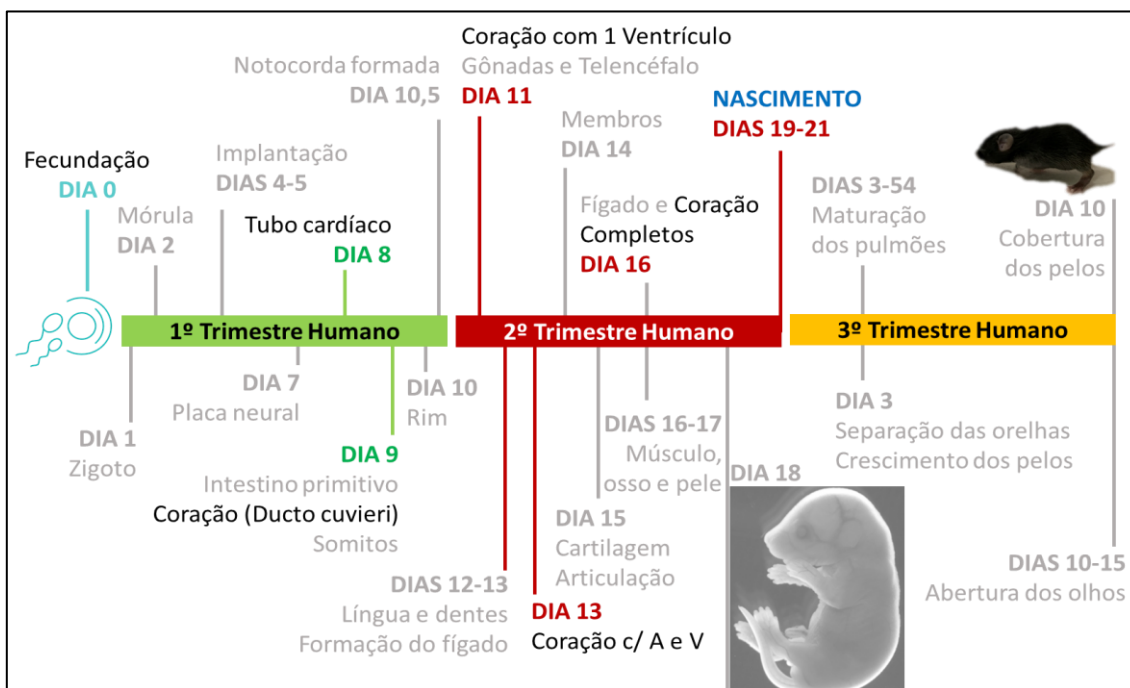
Esses eventos permitirão a construção da placenta, que em camundongos é hemocorial, como em humanos e ocorre pela modificação de células do blastócito do embrião e da decídua mesometrial, estando completa no 13º dia de gestação. Após o processo de implantação inicia-se o período embrionário que é completado 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<sup>41,81</sup>, permitindo mensurar o efeito da PAE em humanos (**Figura 5**)<sup>125</sup>.

O primeiro trimestre humano equivale no camundongo ao período gestacional ocorrente nos dias 0 a 10, iniciando no momento da concepção e incluindo o período pré-implantação, período de implantação, gratulação e o início da neurulação. Neste período, por exemplo, ocorre a formação do coração, tanto em humanos (a partir do 18º dia), como em camundongos (a partir do 6º dia)<sup>125</sup>.

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<sup>125</sup>.

**Figura 5** - Linha do tempo evidenciando alguns dos eventos embrionários na gestação murina relacionando-os com a gestação humana.



Fonte: Tanguay RL, Reimers MJ. Analysis of ethanol developmental toxicity in zebrafish. *Methods in Molecular Biology*. 2008.

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 5**).

## 1.7 Biomarcadores

O genoma possui o armazenamento das informações biológicas de um indivíduo, mas sozinho é incapaz de liberar essas informações para a célula, requerendo a atividade coordenada de enzimas e outras proteínas, que participam de uma rede de complexas reações bioquímicas denominadas expressão do genoma, surgindo 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 permite especificar as reações bioquímicas que cada célula foi capaz de realizar<sup>132-135</sup>.

Inicialmente, o termo compreendia somente o conjunto de moléculas de RNA, denominadas RNAs mensageiros (RNAm) sintetizadas a partir da transcrição do DNA. Estes RNAm participam como codificadores na síntese de proteínas, traduzidos e degradados nos últimos estágios da expressão do genoma e correspondendo a menos de 4% do RNA total de uma célula<sup>133</sup>.

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)<sup>134-136</sup>.

Usando esses achados como ponto de partida, procura-se entender as estruturas moleculares das proteínas, as interações entre elas e com as demais moléculas biológicas (carboidratos, lipídios, DNA e etc.) e 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<sup>137,138</sup>.

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, são assinaturas moleculares que podem ser medidas experimentalmente e indicam a ocorrência de determinada função normal ou patológica em um organismo ou resultado de uma intervenção terapêutica<sup>139</sup>.

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 terapêuticas mais eficazes, com menor efeito colateral e não-invasivas, fazendo com que a procura por novos biomarcadores, com o auxílio de diferentes tipos de dados “OMICS” (Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica) se torne o principal objetivo das pesquisas translacionais<sup>139,140</sup>

## **1.8 Objeto de estudo, problematização e formulação da hipótese**

Indiscutivelmente, o consumo de álcool durante a gestação favorece inúmeras alterações no feto, grande parte já conhecidas e denominadas como

FASD <sup>78</sup>, embora não haja um consenso em relação a quais doses seriam seguras durante tal período<sup>141,142</sup>.

Muitas dessas alterações, quando não resultam em abortos espontâneos e Síndrome da morte súbita do lactente (SIDS) <sup>143</sup> ou características visíveis, se restringem a alterações celulares e metabólicas <sup>39</sup>, tornando-se um desafio diagnóstico, exigindo o acompanhamento e tratamentos médicos por toda a vida do indivíduo<sup>99</sup>.

Deve-se considerar também que a interação do organismo com as moléculas de álcool não ocorre igualmente em todos os indivíduos e, por isso não são totalmente conhecidos. Como o entendimento desses mecanismos dependem exclusivamente da análise de exposição e o tipo, torna-se um desafio aferir com exatidão essa exposição ao álcool em humanos, em razão das dificuldades de se estabelecer padrões de consumo e exposição, pela restrição das gestantes em relatar com exatidão o uso, que pode estar relacionado ao consumo de outras drogas ou doenças psiquiátricas<sup>46,58,59</sup>.

Com a utilização de modelos animais, que permitem o controle do nível e dose de exposição ao álcool e exclusão de fatores contundentes<sup>143-145</sup>, é possível tornar as análises mais profundas e conclusivas em relação a FASD e suas consequências<sup>41, 125</sup>, sendo bem consolidados na literatura científica, principalmente camundongos, como alternativa para esse desafio.

A literatura inclusive apresenta vários modelos de estudos que procuraram entender os mecanismos que levam a deformações cranianas, modificações no sistema nervoso e no comportamento de indivíduos PAE porém, sobre o impacto no sistema cardiovascular permanecem escassas, principalmente em resposta ao que é percebido como níveis baixos a moderados de ingestão de álcool<sup>146</sup>.

Crianças expostas ao álcool durante a gestação apresentam taxas mais altas de malformações cardiovasculares e nos rins, e evidências de enrijecimento vascular <sup>97, 146, 147</sup>.

Como o rim e a vasculatura em desenvolvimento são fundamentais na regulação da pressão arterial ao longo da vida, parecem particularmente suscetíveis a insultos no útero, a exposição repetida ao álcool durante o

desenvolvimento poderia apresentar risco aumentado de disfunção cardiovascular na prole adulta, fazendo dos biomarcadores um aliado para o entendimento destes mecanismos<sup>148-151</sup>.

Assim, a partir da análise da expressão de genes relacionados às vias de transdução de sinais de cinética de cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo relacionados à disfunção cardiovascular pretendeu-se verificar se uma exposição pré-natal, considerada baixa-moderada, seria suficiente para modificar essa expressão e auxiliar no entendimento das diferenças de gênero das comorbidades cardíacas mediadas pela PAE.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito da exposição pré-natal ao álcool (PAE) no miocárdio de camundongos C57BL/6 e seus impactos na expressão de RNA mensageiro de componentes das vias de cinética do cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em machos e fêmeas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Comparar, em camundongos machos e fêmeas expostos ao álcool durante a gestação, a expressão miocárdica de RNAm dos seguintes genes:

Cinética do Cálcio:

- Atp2a2 ATPase, transporte de Ca<sup>++</sup>, músculo cardíaco, contração lenta 2
- Casq2 Calsequestrina 2
- Pin Fosfolamban
- RyR-2 Receptor 2 de Rianodina (Cardíaco)
- Slc8a1 Família de trocadores de soluto (NA-CA)<sup>8</sup>, membro A1 Estresse Oxidativo:

- Cat Catalase
- Gpx4 Glutathione Peroxidase 4
- Hspa1a/b Membros 1A e 1B da família de proteínas de choque térmico
- Sod1 Superóxido Dismutase 1 Apoptose:
- Bax Proteína X associada a BCL2
- FAS Receptor de morte de superfície celular
- MAPK1 Proteína quinase 1 ativada por mitogênio
- MAPK 14 Proteína quinase 14 ativada por mitogênio
- Tp53 Proteína tumoral P53 Inflamação:
- Il-6 Interleucina 6
- Tnfrsf1a Membro da Superfamília do receptor do fator de necrose tumoral 1<sup>a</sup>
- TnF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral alfa.

### 3. MÉTODOS

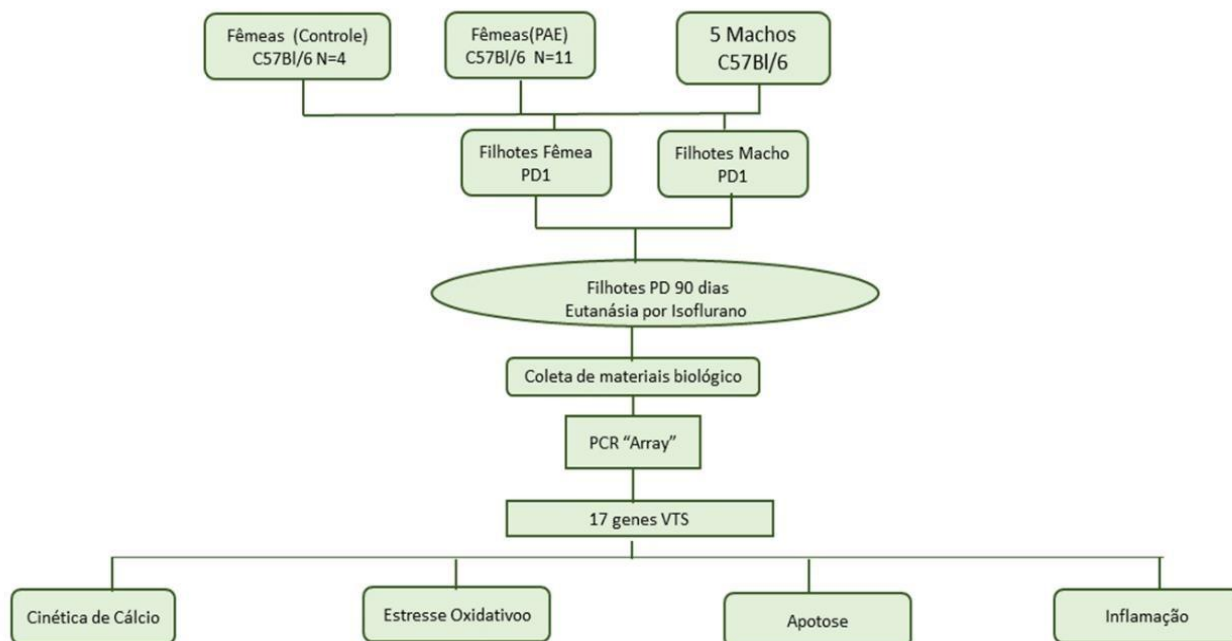
#### 3.1 Modelo animal e desenho do estudo

Para a obtenção da prole, objeto de estudo deste projeto, foram utilizados 20 camundongos isogênicos (15 fêmeas e 5 machos) da linhagem C57Bl/6, de pesos de 20 ( $\pm$  2) gramas (**Figura 6**).

Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Nove de Julho, Campus Vergueiro, confinados em caixas plásticas apropriadas com maravalha, ciclo de luz (ciclo claro/ escuro de 12h/12h) e temperatura ( $21 \pm 2$  °C) e umidade controlados, bem como alimentação e água *ad libitum*<sup>76,93</sup>.

Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 8<sup>a</sup> 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.

**Figura 6** - Sequência experimental do estudo.



Fonte: Produção do autor

As fêmeas foram randomizadas em dois grupos: grupo Controle – CT (n=4) e grupo de Exposição pré-natal ao álcool – PAE (n=11), enquanto os machos foram utilizados apenas como reprodutores, não se permitindo cruzamentos consanguíneos entre os animais. Foram utilizados para análise 5 machos e 5 fêmeas de cada prole <sup>151</sup>.

### 3.1.1 Protocolo grupo Controle

As fêmeas do grupo Controle (n=4) foram acondicionadas unitariamente em gaiolas plásticas com maravalha e com livre acesso à ração e água. As fêmeas Controle tiveram pesos e consumos de água aferidos diariamente até o final do protocolo (PN90). Antes do acasalamento ocorreu o período de sensibilização de 15 dias (I1 a I15), onde cada fêmea teve acesso a 250 ml de água, trocados cada dois dias, por 7 dias (I1 a I7). Após esse período, receberam, a cada dois dias, 250 ml de solução H<sub>2</sub>O + 0,1% de sacarina sódica – PA (Sac) (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>NS · 2H<sub>2</sub>O) (PolyStar, São Paulo, Lote: 18071801) como água de consumo até o 15º dia (I8 a I15).

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 somente 12% da quantidade ingerida é metabolizada pelo organismo, sendo o restante, excretada inalterada pela urina, evitando qualquer alteração nos marcadores analisados pela adição e consumo desta substância<sup>28,92,126</sup>.

Registre-se que a troca da solução ocorreu a cada 2 dias para evitar o amargor decorrente da degradação da sacarina. A adoção de protocolo de sensibilização evita a ocorrência do consumo excessivo pela inserção direta da solução e permite a construção da média de consumo diário de cada fêmea <sup>127</sup>.

Após o período de sensibilização, o macho foi colocado junto a fêmea para o período de acasalamento e, ambos receberam a mesma solução de sacarina descrita anteriormente. Com a confirmação da gestação por meio de análise de tampão vaginal, o macho foi retirado da caixa e a fêmea continuou recebendo a solução de sacarose em todo o período de gestação (GD1 a GD19GD21) até o 10º dia após o nascimento da prole (PN1 – PN10). Do PN10 ao desmame (PN30) as fêmeas receberam somente água com troca realizada a cada dois dias. Durante o acasalamento, o consumo da fêmea foi monitorado através da equação (“consumo total” - “média de consumo do macho durante os 15 dias”) .

### **3.1.2 Protocolo grupo Etanol**

De forma semelhante ao protocolo do grupo controle, as fêmeas do grupo Exposição pré-natal ao álcool - PAE (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:  $H_2O + X\% EtOH + 0,1\% Sac = 250ml$ , com concentração alcoólica aumentando gradualmente até a proporção final de 10% da solução total (2%, 5% e 10%) <sup>127</sup>.

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<sub>2</sub>O + 0,1% de 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, de acordo com a (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - 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% (PA). 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, compartilhando a mesma solução alcoólica durante esse período sendo o consumo da fêmea monitorado por meio da equação anteriormente descrita dividido por 2.

Após a confirmação da gestação (período Gestacional – GD1 a GD21) e retirada do macho, até o décimo dia após o nascimento da prole (PN10) cada fêmea recebeu a solução alcoólica na concentração 10% EtOH com troca realizada a cada dois dias.

Finalmente, a partir do dia PN11, iniciamos o protocolo de dessensibilização alcoólica. Nesse dia, foi disponibilizada para cada fêmea 250 mL de solução a 5% de EtOH, no dia PN13, 250 mL de solução a 2% de EtOH e, do dia PN15 a PN21, 250 mL de solução controle (H<sub>2</sub>O + 0,1% Sac), com troca realizada a cada dois dias. Do dia PN22 até o desmame (PN30) as fêmeas receberam somente água filtrada <sup>77,93</sup>.

Vale ressaltar, que 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, mães e filhotes, exclusão da necessidade de alimentação dupla dos filhotes<sup>93,127</sup>.

Os progenitores não foram utilizados para as análises e foram eutanasiados após o desmame, 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.

### 3.2 Análise da expressão gênica

#### 3.2.1 Coleta dos materiais biológicos

Após o desmame, os filhotes foram acondicionados em caixas, separados por gênero, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*. Noventa dias após o nascimento (PN90), os filhotes de ambos os grupos foram anestesiados com Isoflurano por inalação (<20 segundos) e decapitados<sup>143</sup>. Tal método de eutanásia se fez necessário em função das demais técnicas induzirem aumento de estresse oxidativo (por exemplo, pela ação de anestésicos administrados por vias, intravenosa (iv) ou intraperitoneal (ip)<sup>152-154</sup>. Foram coletados diversos órgãos com o coração, cérebro, rins e fígado e congelados à -80C para análises futuras. Neste estudo foi utilizado apenas o coração, que foi dissecado para obtenção do ventrículo esquerdo, objeto de análises de expressão gênica.

#### 3.2.2 Biomarcadores

Um total de 17 genes previamente selecionados de acordo com sua participação em vias de transdução de sinais (VTS) relacionadas à disfunção cardiovascular foram analisados<sup>139</sup> (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Genes selecionados para análises moleculares (Adaptado<sup>139</sup>)

VTS	Nº	Poço	Código	Nome do Gene
-----	----	------	--------	--------------

<i>Apoptose</i>	g3	C 2/8	Bax	Proteína X associada a BCL2
	g4	D 5/11	Fas	Receptor de morte de superfície celular Fas
	g5	H 4/10	Mapk1	Proteína Quinase 1 ativada por mitogênio
	g6	D 4/10	Mapk14	Proteína Quinase 14 ativada por mitogênio
	g7	F 2/8	Tp53	Proteína Tumoral P53
<i>Cinética do Cálcio</i>	g8	D 6/12	Atp2a2	ATPase, transporte de Ca ++, músculo cardíaco, contração lenta
	g9	G 1/7	Casq2	Calsequestrina 2
	g10	C 6/12	Pln	Fosfolamban
	g11	E 3/9	RyR-2	Receptor 2 de Rianodina (Cardíaco)
<i>Glutaciona Peroxidase 4 oxidativo</i>	g12	F 1/7	Slc8a1	Família de trocadores de soluto (Na-Ca) 8, membro A1
	g13	B 4/10	Cat	Catalase
	g14	B 3/9	Gpx4	
	g15	E 1/7	Hspa1a/b	Membros 1A e 1B da família de proteínas de choque térmico (Hsp70)
<i>Inflamação</i>	g16	G 6/12	Sod1	Superóxido Dismutase 1
	g33	G 3/9	IL-6	Interleucina 6
	g34	G 4/10	Tnfrsf1a	Membro da Superfamília do Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1A
	g35	G 2/8	TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
	– Via de Transdução de Sinal.			

### 3.2.3 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, verificase 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 de ambos os grupos foram

homogeneizadas em 1 ml de Trizol<sup>®</sup> 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 dietilpirocarbonato, 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 e 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 (A260/A230 ~1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8 – 2,0). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1µg 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 contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl<sub>2</sub> 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)<sub>20</sub> 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<sup>149</sup>. 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.

A reação de qPCR seguirá 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, perfazendo 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 s, e passarão por 40 ciclos térmicos a 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s.

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, correspondeu ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atingisse o limiar de detecção.

Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pelo nível de expressão do gene *housekeeping* subunidade 18S do RNA ribossomal, cuja expressão mostra-se praticamente 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  $\Delta CT$  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* 18S rRNA. O parâmetro  $2^{-\Delta CT}$  foi utilizado para representar os dados de expressão relativos.

### 3.3 Análise estatística

Os dados murinométricos dos animais e dados 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). Para comparação entre grupos foi realizada ANOVA de duas vias e, quando necessário, teste *ad hoc* de Bonferroni. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo e os resultados foram expressos como média  $\pm$  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

Nossos resultados evidenciaram que a PAE modulou a expressão de RNAm de 16 (16/17) genes avaliados. Destes, 14 apresentaram aumento significativo da expressão de RNAm e 2 deles apresentaram diminuição da expressão de RNAm no ventrículo esquerdo de machos e fêmeas adultos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Expressão de RNAm dos grupos controle macho e fêmea (A e B) e grupos de exposição pré-natal ao álcool macho e fêmea (C e D)

Gene	EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO			
	CONTROLE		ÁLCOOL	
	MACHO (A)	FÊMEA (B)	MACHO (C)	FÊMEA (D)
Gpx4	1,10 ± 0,232	1,01± 0,055	2,73± 0,112*	2,03± 0,179*#
Cat	1,01± 0,068	1,05± 0,161	2,66± 0,221*	1,77± 0,268
Hspa1a/b	1,30± 0,468	1,14± 0,242	3,88± 0,520*	2,18± 0,245
Sod1	1,06± 0,182	1,01± 0,082	2,30± 0,074*	2,44± 0,064*
IL-6	1,01± 0,064	1,00± 0,013	3,10± 0,260*	3,07± 0,185*
Tnfrsf1a	1,01± 0,051	1,00± 0,014	3,27± 0,136*	2,34± 0,045*#



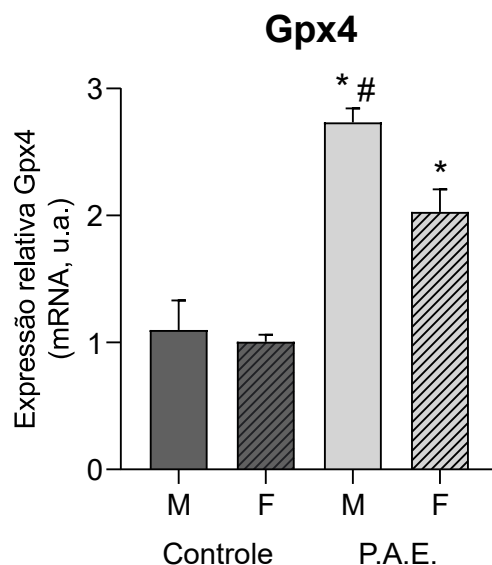
Tnf- $\alpha$	1,00 $\pm$ 0,024	1,00 $\pm$ 0,028	2,25 $\pm$ 0,067*	2,18 $\pm$ 0,162*
Bax	1,00 $\pm$ 0,025	1,00 $\pm$ 0,003	2,75 $\pm$ 0,083*	2,59 $\pm$ 0,054*
Fas	1,025 $\pm$ 0,110	1,02 $\pm$ 0,105	1,05 $\pm$ 0,053	1,17 $\pm$ 0,092
Mapk1	1,01 $\pm$ 0,049	1,00 $\pm$ 0,044	2,16 $\pm$ 0,086*	2,30 $\pm$ 0,070*
Mapk14	1,00 $\pm$ 0,028	1,01 $\pm$ 0,073	2,34 $\pm$ 0,112*	2,48 $\pm$ 0,053*
Tp53	1,01 $\pm$ 0,060	1,02 $\pm$ 0,092	1,69 $\pm$ 0,056*	1,90 $\pm$ 0,046*
Atp2a2	1,00 $\pm$ 0,040	1,01 $\pm$ 0,084	3,45 $\pm$ 0,019*	3,69 $\pm$ 0,099*
Casq2	1,06 $\pm$ 0,196	1,03 $\pm$ 0,124	0,39 $\pm$ 0,013	0,34 $\pm$ 0,032*
Pln	1,06 $\pm$ 0,168	1,06 $\pm$ 0,197	2,51 $\pm$ 0,050*	2,93 $\pm$ 0,204*
Slc8a1	1,00 $\pm$ 0,021	1,00 $\pm$ 0,025	0,51 $\pm$ 0,040*	0,35 $\pm$ 0,043*
RyR-2	1,02 $\pm$ 0,085	1,02 $\pm$ 0,100	3,83 $\pm$ 0,046*	3,53 $\pm$ 0,245*

Média  $\pm$  Desvio Padrão, ANOVA. Genes de Estresse Oxidativo: Gpx4, Cat, Hspa1a/b, Sod1; Genes de inflamação: Il-6, Tnfrsf1a, Tnf- $\alpha$ ; Genes de Apoptose: Bax, Fas, Mapk1, Mak14, Tp53; Genes de cinética do cálcio: Atp2a2, Casq2, Pin, Slc8a1, RyR-2. Significância: \*p<0,05 PAE vs. Controle; #p<0,05 Macho vs. Fêmea no grupo PAE.

#### **4.1 Expressão de RNA mensageiro (RNAm) do gene Glutathiona Peroxidase 4 (Gpx4) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE**

A (Figura 7) representa os resultados de expressão de RNAm de Gpx4. Nossos resultados evidenciaram um aumento significativo na expressão de RNAm em machos e fêmeas dos grupos PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação aos grupos controle. Os machos do grupo PAE apresentaram aumento significativo da expressão de RNAm de Gpx4 em relação às fêmeas expostas ao álcool durante a gestação. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de Gpx4 quando comparados.

**Figura 7** – Expressão de RNAm do gene Gpx4 em camundongos macho e fêmea.

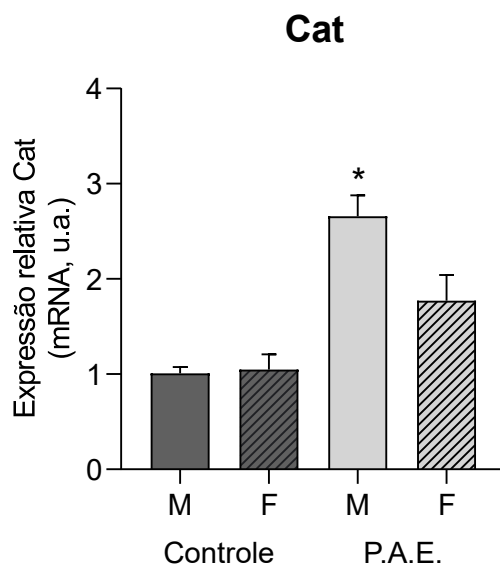


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool). \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F, # $p < 0,05$  vs. F PAE.

#### 4.2 Expressão de RNA mensageiro (RNAm) do gene Cat (Catalase) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A expressão de RNAm de catalase apresentou aumento significativo em machos do grupo PAE em relação aos machos do grupo Controle. Em relação ao grupo de fêmeas com PAE, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e nem entre o grupo de machos PAE (Figura 8). Não verificamos diferenças de expressão de RNAm de catalase entre os grupos M e F controles

**Figura 8** - Expressão de RNAm de Catalase em camundongos machos e fêmeas com PAE.



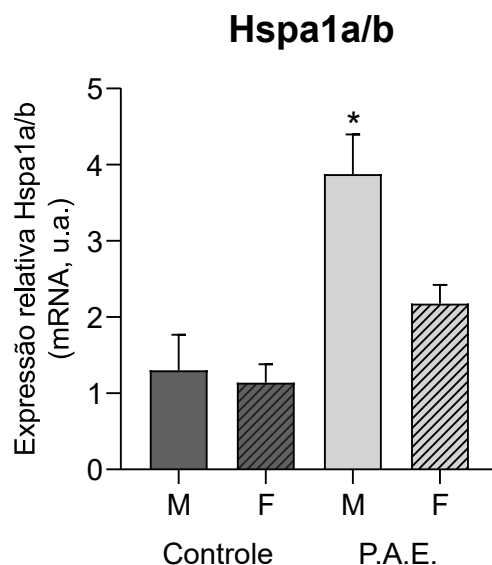
Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool). \* $p < 0,05$  vs. Controle M.

#### 4.3 Expressão de RNAm de membros 1A e 1B da família de proteínas de choque térmico (Hsp70) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A Figura 9 representa os resultados de expressão de RNAm do gene Hspa1a/b. Verificamos um aumento significativo na expressão gênica de machos do grupo PAE em relação aos machos do grupo Controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos com PAE e nem entre fêmeas PAE e controle.

Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de Hspa1a/b entre eles.

**Figura 9** - Expressão de RNAm do gene Hspa1a/b em camundongos machos e fêmeas com PAE.

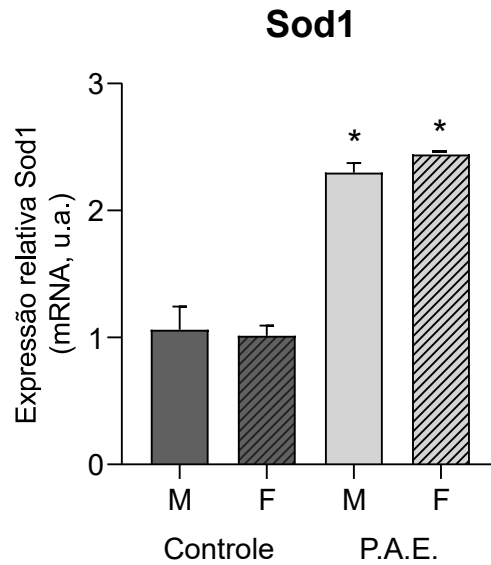


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool). \* $p < 0,05$  vs. Controle M.

#### 4.4 Expressão de RNAm de Superóxido Dismutase 1 (Sod1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à EPA

Observamos um aumento significativo na expressão de Sod1 em machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle (Figura 10). Não verificamos diferenças entre machos e fêmeas nos grupos controle e nem entre fêmeas PAE e controle F. Não verificamos diferenças de expressão de RNAm de Sod1 entre os grupos M e F controles.

**Figura 10** - Expressão de RNAm do gene Sod1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

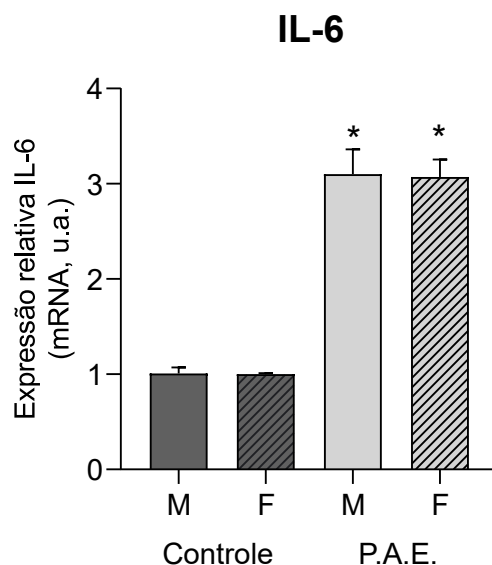


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### 4.5 Expressão de RNAm de Interleucina 6 (IL-6) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Nossos resultados evidenciaram aumento significativo na expressão de RNAm de IL-6 no miocárdio de machos e fêmeas do grupo PAE em relação ao grupo Controle (Figura 11). Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de IL-6 quando comparados.

**Figura 11** - Expressão de RNAm do gene IL-6 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

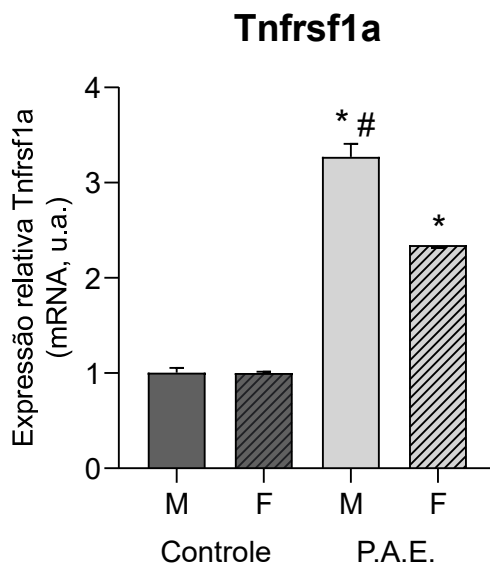


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### **4.6 Expressão de RNAm de Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1a (Tnfrsf1a) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE.**

A Figura 12 mostra os resultados da expressão de RNAm de Tnfrsf1a. Verificamos aumento significativo na expressão de Tnfrsf1a em machos e fêmeas do grupo PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Além disso, os machos do grupo PAE apresentaram aumento significativo de expressão de Tnfrsf1a em relação às fêmeas do grupo PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de Tnfrsf1a quando comparados.

**Figura 12** – Expressão de RNAm do gene *Tnfrsf1a* em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

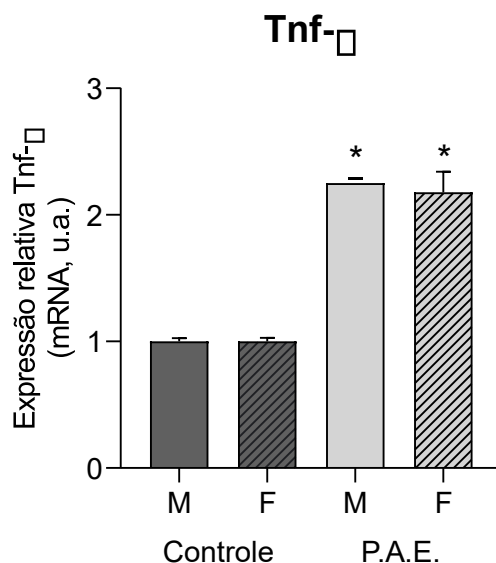


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F, # $p < 0,05$  vs. PAE F.

#### 4.7 Expressão de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Em relação ao TNF $\alpha$ , verificamos um aumento significativo na expressão de RNAm no miocárdio de machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Entretanto, não observamos diferenças entre machos e fêmeas entre animais com PAE e nem entre controles (Figura 13). Não verificamos diferenças de expressão de RNAm de TNF $\alpha$  entre os grupos M e F controles.

**Figura 13** - Expressão de RNAm do gene *Tnf- $\alpha$*  em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.



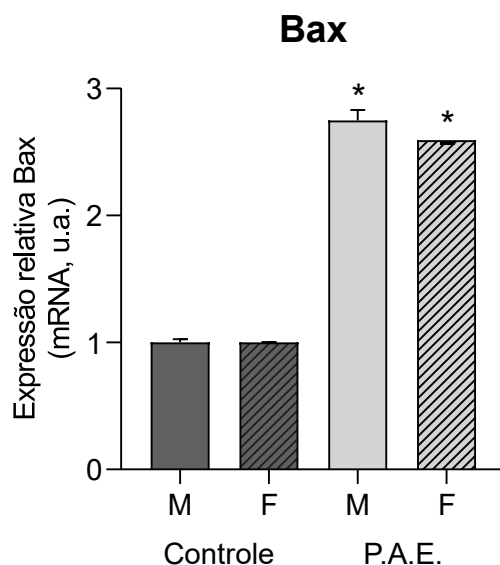
Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### 4.8 Expressão de Proteína X associada a BCL2 (BAX) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A PAE induziu um aumento de expressão de BAX no miocárdio de machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Não verificamos diferenças de expressão de BAX entre os animais dos grupos PAE e nem entre os grupos controle (Figura 14). Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de Bax quando comparados.

**Figura 14** - Expressão de RNAm do gene Bax em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.





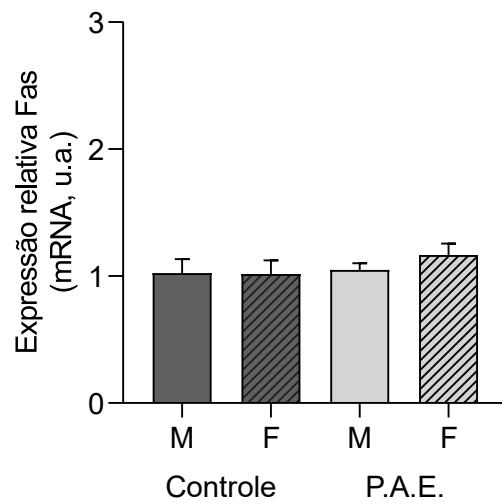
Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### 4.9 Expressão de RNAm de Receptor de morte de superfície celular Fas no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Dentre todos os genes analisados, a expressão de RNAm de Fas foi a única que não foi modulada pela PAE (Figura 15). Não observamos diferenças na expressão de RNAm de Fas entre machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) e nem em relação ao grupo Controle.

**Figura 15** - Expressão de RNAm do gene Fas em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

**Fas**

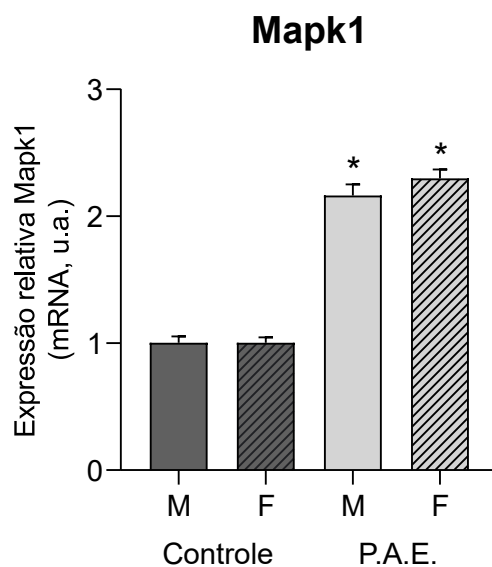


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool).

### Expressão 4.10 de RNAm de Proteína Quinase 1 ativada por mitogênio (Mapk1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Em relação à expressão de RNAm de Mapk1 observamos aumento significativo na expressão de Mapk1 em machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo controle, conforme mostrada na Figura 16. Não observamos diferenças entre os grupos de animais PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de Mapk1 quando comparados.

**Figura 16** - Expressão de RNAm do gene Mapk1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE

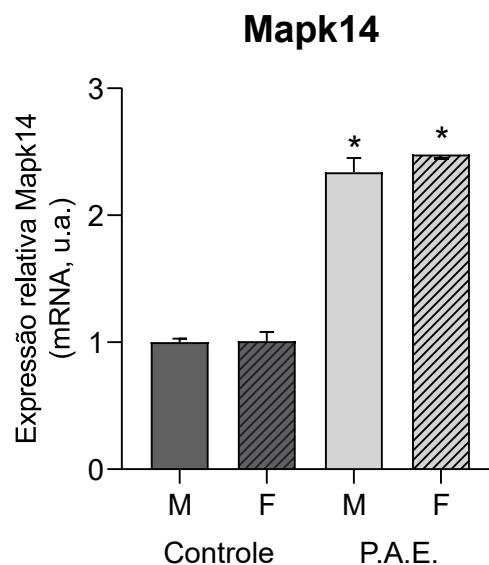


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

**Expressão**  
**4.11 de RNAm de Proteína Quinase 14 ativada por mitogênio**  
**(Mapk14) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à**  
**PAE**

Na Figura 17 observamos aumento significativo na expressão de Mapk14 em machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Entre animais expostos à PAE não observamos diferenças entre machos e fêmeas e nem entre os grupos controles.

**Figura 17** - Expressão de RNAm do gene Mapk14 em camundongos machos e fêmeas

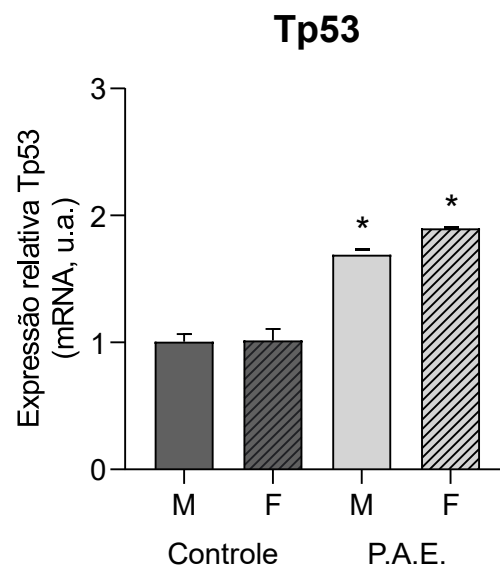


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

### Expressão 4.12 de RNAm de Proteína Tumoral P53 (Tp53) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Verificamos um aumento significativo na expressão de RNAm de Tp53 no miocárdio de machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle (Figura 18). Entre machos e fêmeas PAE não verificamos diferença de expressão gênica de Tp53. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de Tp53 quando comparados.

**Figura 18** - Expressão de RNAm do gene Tp53 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.



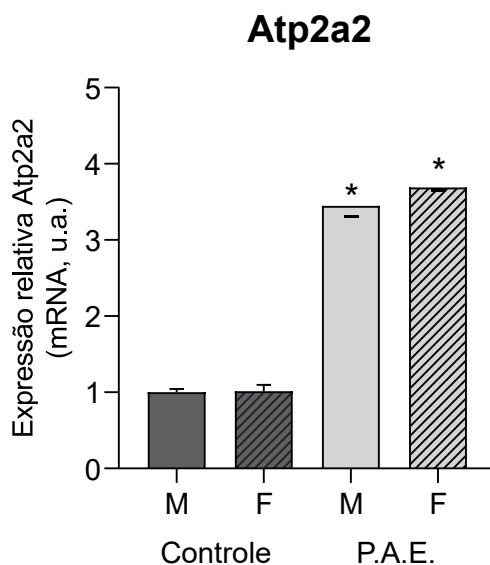
Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

## Expressão

### 4.13 de RNAm de ATPase de músculo cardíaco de contração lenta 2 (Atp2a2) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Observamos aumento significativo na expressão miocárdica de RNAm de Atp2a2 em camundongos machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle (Figura 19). Não verificamos diferença de expressão gênica entre os animais machos e fêmeas do grupo PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de Atp2a2 quando comparados.

**Figura 19** - Expressão de RNAm do gene Atp2a2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.



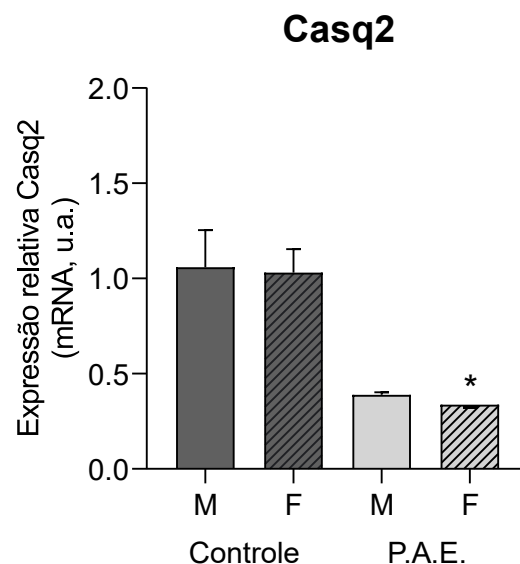
Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

## Expressão

### 4.14 de RNAm de Calsequestrina 2 (Casq2) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

Conforme observado na Figura 20, a expressão de RNAm de Casq2 apresentou diminuição significativa em fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Não verificamos diferença entre machos e fêmeas do grupo PAE. Não verificamos diferenças de expressão de RNAm de Casq2 entre os grupos M e F controles.

**Figura 20** - Expressão de RNAm do gene Casq2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.



Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle F.

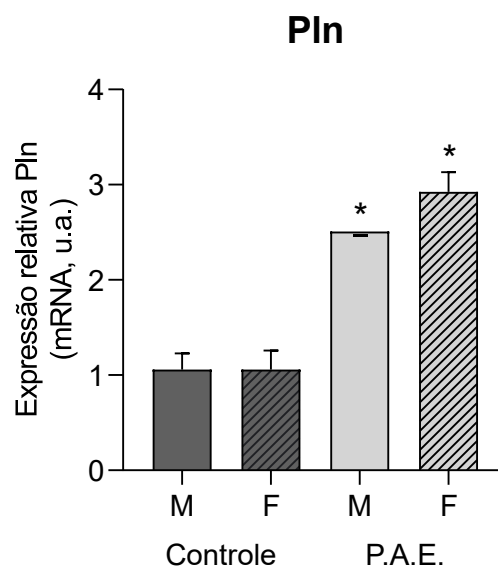
## Expressão



#### 4.15 Expressão de RNAm de Fosfolamban (Pln) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A expressão de RNAm de Pln foi aumentada em machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle (Figura 21). Não foi observado diferença entre animais dos grupos PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de Pln quando comparados.

**Figura 21** - Expressão de RNAm do gene Pln em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

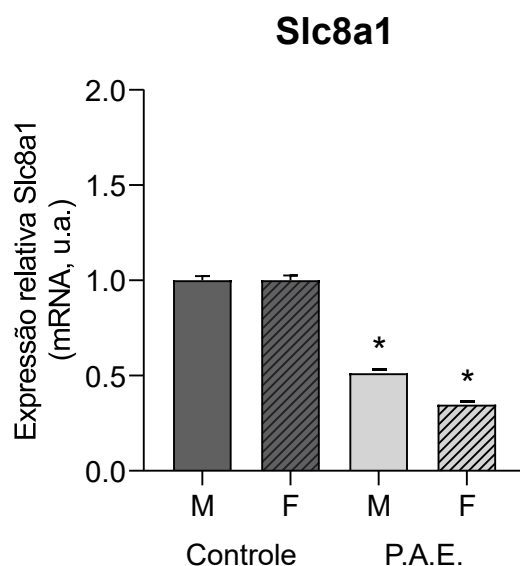


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### 4.16 Expressão de RNAm de trocadores de soluto (Na-Ca) 8, membro A1 (Slc8a1) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A Figura 22 mostra os resultados de expressão de RNAm do gene Slc8a1. Os resultados demonstram uma diminuição significativa na expressão gênica de machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Não observamos diferença entre os animais dos grupos PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de Slc8a1 quando comparados.

**Figura 22** - Expressão de RNAm do gene Slc8a1 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.

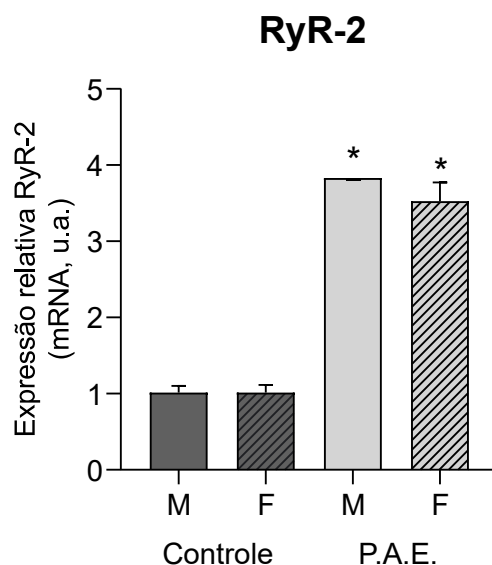


Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

#### 4.17 Expressão de RNAm Receptor 2 de Rianodina Cardíaco (RyR-2) no miocárdio de camundongos machos e fêmeas submetidos à PAE

A Figura 23 mostra os resultados de expressão de RNAm do gene RyR2. Os resultados demonstram um aumento significativo na expressão gênica de machos e fêmeas do grupo de PAE (Exposição pré-natal ao álcool) em relação ao grupo Controle. Não observamos diferença entre os animais dos grupos PAE. Animais dos grupos controles não apresentaram diferenças de expressão de RNAm de RyR-2 quando comparados.

**Figura 23** - Expressão de RNAm do gene RyR-2 em camundongos machos e fêmeas expostos à PAE.



Valores em média  $\pm$  EPM, ANOVA; M (machos), F (Fêmeas); PAE (Exposição pré-natal ao álcool) \* $p < 0,05$  vs. Controle M e F.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a hipótese de que a exposição pré-natal ao álcool poderia alterar a expressão de RNAm de componentes das vias de cinética do cálcio, inflamação, apoptose e estresse oxidativo em cardiomiócitos de camundongos.

Nosso objetivo foi estudar os efeitos na expressão de RNAm no miocárdio de animais cujos pais que consumiram álcool durante a gestação e também no período da amamentação <sup>126</sup>.

Para mimetizar a PAE, utilizamos um modelo experimental de gestação murina com camundongos C57Bl/6 que é o modelo mais indicado para este estudo, por ser mais suscetível ao consumo de álcool <sup>93</sup>.

Embora existam estudos que demonstram cardiopatias congênitas em recém-nascidos após PAE, analisar a expressão de RNAm é uma via para elucidação de mecanismos destas alterações cardíacas causadas pelo álcool<sup>101</sup>.

O consumo de álcool por mulheres tem aumentado devido às mudanças no estilo de vida ocorridas nas últimas décadas, estas possuem características fisiológicas diferentes dos homens, como uma menor quantidade de água e de enzimas que metabolizam a substância, deixando-a por mais tempo e em maior concentração em seu organismo <sup>9</sup>.

O consumo de álcool é considerado inaceitável se a mulher estiver tentando engravidar, estiver grávida ou amamentando <sup>4</sup>. Estudos no Brasil tentaram mensurar o consumo de álcool em gestantes e apresentaram estimativas que variam de 10 a 40% das gestantes participantes <sup>57</sup>.

O consumo de álcool durante a morfogênese, pode causar alterações celulares em sua forma, tamanho, posição, número e adesividade modificando o desenvolvimento fetal <sup>25,26</sup>.

Em nosso modelo experimental de PAE utilizamos uma solução alcoólica de água + EtOH álcool (X%) e sacarina (0,1%) em 250ml, com concentração alcoólica aumentando gradualmente até a proporção final de 10% da solução total (2%, 5% e 10%). Escolhemos este protocolo porque se assemelha a um consumo baixo a moderado de álcool <sup>77,93</sup>.

Os resultados deste protocolo evidenciam alguns achados comuns na literatura. Nossos resultados mostraram um aumento significativo na expressão de RNAm de todos os genes estudados de estresse oxidativo nos machos do grupo PAE em relação ao grupo controle. As fêmeas do grupo PAE não apresentaram aumentos significativos de expressão de RNAm de Cat, Hspa1 a/b, entretanto, foram significativos os aumentos para Gpx4 e Sod1 <sup>155</sup>.

A enzima GPX4 citosólica é uma glutationa indispensável para o desenvolvimento embrionário <sup>156</sup>. O aumento de Gpx4 nos machos do grupo PAE foi significativamente maior do que fêmeas.

A proteína codificada por este gene tem a capacidade de servir de funções duplas como peroxidase e como proteína estrutural em espermatozoides maduros <sup>157</sup>. O aumento na expressão deste RNAm leva à codificação da proteína para a defesa antioxidante do tecido cardíaco segundo Wang *et al.* <sup>158</sup>.

A enzima catalase, denominada hidroperoxidase, produzida pelo gene Cat, é a principal proteína para decompor peróxido de hidrogênio <sup>159</sup>. Este está relacionado com diversas patologias ligadas ao stress oxidativo, como é tóxico para as células, o peróxido tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua <sup>160</sup>.

A catalase tem o mais alto número de *turnover* (*kcat*) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo tornando-a uma enzima importante para a desintoxicação desta substância <sup>159</sup>.

O aumento da expressão de RNAm de Cat em machos sugere uma maior ativação de atividades antioxidantes contra o estresse oxidativo, deixando as células cardíacas menos vulneráveis ao dano causado pelo álcool como encontrado por Undyala *et al.* onde cardiomiócitos que sofreram hipóxia a catalase inibiu potentemente o estresse oxidativo <sup>161</sup>.

A expressão de mRNA Hspa 1 a/b não apresentou aumento significativo em fêmeas do grupo PAE quando comparados com fêmeas controle e machos do grupo PAE.

O gene Hspa1 a/b sintetiza a proteína 1 de choque térmico (HSP) envolvida no reparo do DNA <sup>162</sup>. Suas funções contribuem para os processos

biológicos, incluindo transdução de sinal , apoptose, homeostase de proteínas de crescimento e diferenciação celular <sup>162</sup>.

Esta proteína está associada a um grande número de doenças degenerativas, envelhecimento celular e inflamação <sup>163</sup>.

A expressão de proteínas do choque térmico aumenta muito sob estresse, protegendo as células de efeitos adversos em vários estados patológicos <sup>163</sup>. Alternativamente, a superexpressão de HSP pode mitigar os danos de isquemia - reperfusão em um músculo cardíaco <sup>162,163</sup>.

Este dado sugere uma maior ativação de cardioproteção nos cardiomiócitos de machos do grupo PAE.

Doenças isquêmicas do coração, resultado da oclusão de uma das artérias coronárias, é atualmente a principal causa de morbidade e mortalidade da sociedade ocidental <sup>165</sup>.

Durante a reperfusão de isquemia, a liberação de EROs contribui substancialmente para o dano celular e morte por meio de um efeito direto na célula, bem como por meio de sinais apoptóticos <sup>166</sup>.

A enzima SOD1 possui a capacidade de limitar os efeitos prejudiciais de EROs , essa proteína é encontrada na membrana mitocondrial externa e inibe a apoptose ao interagir com proteínas BCL-2 ou a própria mitocôndria <sup>167</sup>.

Durante a liberação de EROs, SOD1 desempenha um papel importante, regulando a sinalização apoptótica e a morte célula <sup>165</sup>.

A expressão de RNAm de SOD1 apresentou aumento significativo em machos e fêmeas do grupo PAE em relação ao controle, sugerindo uma resposta ao dano tecidual gerado pelo álcool.

O estresse oxidativo no sistema cardiovascular predispõe os cardiomiócitos e vasos cardíacos à lesões graves, alterando os mecanismos de contração e relaxamento, tendo como consequência sua desadaptação e déficit de função <sup>168, 169</sup>.

Em conjunto, nossos resultados de expressão de genes de estresse oxidativo demonstraram uma resposta defensiva contra o estresse oxidativo desencadeado pela exposição pré-natal ao álcool, especialmente em machos.

Em relação à ativação da inflamação, os machos e fêmeas do grupo PAE apresentaram um aumento de mRNA de IL-6 de 207,43% e 206,98%, sinalizando

dano tecidual, e pelo tempo de exposição, pode ser considerada uma inflamação crônica desencadeada pelo álcool.

O gene IL-6 sintetiza a proteína de mesmo nome que é produzida principalmente em locais de inflamação aguda e crônica, onde é secretada no soro e induz uma resposta pró-inflamatória <sup>170</sup>. A expressão desse gene está implicada em uma ampla variedade de doenças associadas à inflamação <sup>171</sup>.

O gene Tnrf1 a/b codifica uma proteína Tnrfsf1a que é um dos principais receptores do fator de necrose tumoral alfa, este receptor, quando ativado, pode ativar o fator de transcrição Nf-KB, mediar a apoptose e funcionar como regulador da infamação <sup>172</sup>.

O significativo aumento na expressão de RNAm deste gene no grupo PAE em relação ao controle foi cerca de 200%. Este aumento sugere que o álcool pode gerar inflamação tecidual. Também verificamos aumento significativo entre machos e fêmeas do grupo PAE, sugerindo que machos apresentam maior potencial de inflamação que fêmeas.

O Tnf- $\alpha$  é uma citocina capaz de provocar a morte de células (apoptose) tumorais e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias, o mesmo é secretado principalmente por macrófagos e seu principal efeito fisiológico é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los <sup>173</sup>.

Em nosso estudo, a expressão de RNAm de Tnf- $\alpha$  aumentou significativamente em machos e fêmeas do grupo PAE, sugerindo, conjuntamente com o aumento de expressão do receptor, ativação de processo inflamatório desencadeado pelo álcool.

A liberação de TNF- $\alpha$  resulta no aparecimento de vários efeitos, hipotensão arterial, maior necessidade de drogas vasoativas e alterações da barreira endotelial ocasionada pela degradação de neutrófilos, resultando no aumento de líquido intersticial levando a alterações da coagulação e comprometimento principalmente da função cardíaca e pulmonar <sup>174</sup>.

No coração, o aumento de TNF- $\alpha$  pode ocasionar uma menor contratilidade do miocárdio, redução da perfusão tissular, relaxamento da musculatura vascular, diminuição da pressão sanguínea e aumento do risco de coagulação intravascular disseminada <sup>174</sup>.

Os níveis de TNF- $\alpha$  estariam associados a eventos recorrentes coronarianos em pacientes após infarto agudo do miocárdio (IAM) por depressão direta da contratilidade e pela indução de apoptose do miócito <sup>175</sup>.

Concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  têm sido encontradas em alguns pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, particularmente associadas a uma maior severidade dos aspectos clínicos <sup>171</sup>.

A ativação da BAX é estimulada por fatores variados, incluindo calor, peróxido de hidrogênio, níveis de pH e remodelamento da membrana mitocondrial, sendo ativado por p53 <sup>176</sup>.

O regulador apoptótico BAX é codificado pelo gene BAX em humanos e está estritamente relacionado à proteína p53, que também realiza um papel fundamental no processo de morte celular por apoptose <sup>177</sup>.

Machos e fêmeas do grupo PAE apresentaram aumento de RNAm de BAX e TP53, indicando uma potencial ativação da resposta apoptótica em função do álcool.

A proteína p53, também conhecida como supressor tumoral, é um regulador de transcrição que regula a expressão de diversos genes, incluindo BAX <sup>178</sup>. As proteínas da família BCL-2 abrem o canal iônico mitocondrial dependente de voltagem, para que o citocromo c possa sair da organela em direção ao citoplasma e, dessa forma, haja continuidade do processo de apoptose <sup>179</sup>.

Nossos achados indicam que a PAE pode ocasionar aumento de apoptose celular devido à exposição pré-natal ao álcool.

A proteína codificada pelo gene Fas é membro da superfamília do receptor de TNF, sendo demonstrado que desempenha um papel central na regulação fisiológica da morte celular programada e está implicado na patogênese de várias doenças malignas do sistema imunológico <sup>180</sup>.

A interação desse receptor com seu ligante permite a formação de um complexo de sinalização indutor de morte que inclui a proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD), caspase 8 e caspase 10 <sup>181</sup>.

Não observamos diferença de expressão de RNAm de Fas no grupo PAE em relação ao controle, indicando que o mecanismo de apoptose desencadeado



pelo álcool seja mais a ativação da via intrínseca, com ativação de proteínas mitocondriais, p53 e estresse oxidativo.

Durante a maturação de cardiomiócitos de camundongo recém-nascido, a atividade de MAPK pode regular a citocinese dos miócitos e promover a saída do ciclo celular, enquanto a inibição da atividade de MAPK leva à indução de mitose em cardiomiócitos adultos e fetais <sup>182, 183</sup>.

As proteínas codificadas por estes genes são membro da família das MAP quinases, também conhecidas como quinases extracelulares reguladas por sinal (ERKs) <sup>184</sup>.

Estas proteínas agem como um ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação da transcrição e desenvolvimento <sup>183</sup>.

A ativação destas quinases requer fosforilação por quinases em cascata. Após ativação, as quinases se translocam para o núcleo das células estimuladas, onde fosforilam alvos nucleares, ativando a transcrição de vários genes <sup>182</sup>.

Machos e fêmeas do grupo PAE apresentaram aumento significativo de RNAm de Mapk1 e Mapk 14 evidenciando a ativação de apoptose devido o dano tecidual causado pelo álcool.

A expressão de RNAm da enzima ATP2A2 apresentou aumento significativo no grupo PAE em relação ao controle, sugerindo impacto da exposição pré-natal ao álcool na contratilidade cardíaca.

O gene ATP2A2 codifica uma enzima chamada sarco (endo) retículo plasmático cálcio-ATPase 2 SERCA2, a qual pertence à família de enzimas ATPase que controlam o nível de átomos de cálcio carregados positivamente (íons de cálcio) dentro das células <sup>185</sup>.

Dentro da célula, a SERCA2 é encontrada no retículo endoplasmático e uma estrutura relacionada nas células musculares chamada retículo sarcoplasmático <sup>186</sup>.

O ciclo do íon cálcio  $Ca^{2+}$  desempenha um papel crucial na contração e relaxamento dos cardiomiócitos. O retículo sarcoplasmático (RS) atua como uma organela para armazenar  $Ca^{2+}$ , que medeia a liberação e recaptção de  $Ca^{2+}$

durante a contração e relaxamento. Os distúrbios da função RS levam à disfunção do ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  e da função das células miocárdicas. Os íons de cálcio atuam como sinais para um grande número de atividades que são importantes para o desenvolvimento normal e o funcionamento das células<sup>187,188</sup>.

O gene CASQ2 codifica uma proteína chamada calsequestrina 2, a qual é encontrada nos cardiomiócitos, no retículo sarcoplasmático, juntamente com o receptor rianodina RYR, está envolvida no armazenamento e transporte de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  para fora do retículo sarcoplasmático<sup>189</sup>.

Em miócitos cardíacos, as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  alternam entre níveis elevados durante a contração e níveis baixos durante o relaxamento, o aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a contração é principalmente devido à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques<sup>190,191</sup>

Em nosso estudo, verificamos uma diminuição de expressão de RNAm de CASQ2 apenas em fêmeas PAE em relação ao controle. Resultado que pode ter ligação com os receptores de estrógeno presentes em cardiomiócitos, os quais, podem afetar a estrutura ou função cardíaca como descrito em um estudo feito por Haddad et al.<sup>192</sup>.

O  $\text{Ca}^{2+}$  também entra na célula através do sarcolema (membrana plasmática), durante o relaxamento, o  $\text{Ca}^{2+}$  é sequestrado nas reservas intracelulares. Para evitar a sobrecarga dos estoques intracelulares, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entrou através do sarcolema deve ser expulso da célula<sup>191</sup>.

O trocador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  é o principal mecanismo pelo qual o  $\text{Ca}^{2+}$  é expulso da célula durante o relaxamento, no coração o trocador pode desempenhar um papel fundamental na ação dos digitálicos, pois é o mecanismo dominante no retorno do miócito cardíaco ao seu estado de repouso após a excitação<sup>192</sup>.

E, em nosso estudo verificamos a diminuição de expressão de RNAm do trocador de soluto (Na-Ca) 8, membro A1 (Slc8a1) em animais com PAE. Em um estudo realizado por Guo *et al.* foi observado que lncRNA SLC8A1-AS1, ao regular negativamente SLC8A1 e ativando a via de sinalização cGMP-PKG, alivia o dano miocárdico, inibe a liberação de fatores pró-inflamatórios e reduz o tamanho do infarto, em última análise, protegendo contra o dano miocárdico<sup>193</sup>.

A expressão de RNAm de RyR2 é encontrada principalmente no músculo cardíaco e funciona como o principal componente de um canal de cálcio localizado no retículo sarcoplasmático que fornece íons ao músculo cardíaco durante a sístole<sup>194</sup>.

Para permitir a contração do músculo cardíaco, o influxo de cálcio por meio dos canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem na membrana plasmática permite que os íons de cálcio se liguem ao RYR2 localizado no retículo sarcoplasmático, essa ligação causa a liberação de cálcio através do RYR2 do retículo sarcoplasmático para o citosol, onde se liga ao domínio C da troponina, que desloca a tropomiosina e permite que a miosina ATPase se ligue à actina, permitindo a contração do músculo cardíaco<sup>195</sup>.

Estudos demonstram que RyR-2 desempenha um papel vital na regulação da função contrátil do miocárdio e hipertrofia cardíaca<sup>196,197</sup>. Verificamos um aumento da expressão de RNAm de RyR2 após PAE em machos e fêmeas o que pode sugerir uma hipertrofia cardíaca causada pela PAE.

As evidências indicam que várias vias de sinalização envolvidas na indução de doença cardíaca e insuficiência cardíaca estão associadas ao manuseio anormal do cálcio pelas proteínas do retículo sarcoplasmático: bomba de cálcio-ATPase e fosfolambam<sup>198</sup>.

A insuficiência cardíaca é caracterizada por remoção prejudicada do cálcio citosólico, carga reduzida do retículo sarcoplasmático cardíaco e liberação de cálcio defeituosa, culminando no comprometimento da função diastólica e sistólica cardíaca<sup>199</sup>.

A proteína PLN (phospholamban), é um gene expresso em doenças cardíacas que incluem cardiomiopatia dilatada e cardiomiopatia familiar, consequentemente, um fator de regulação chave do funcionamento cardíaco diastólico<sup>200</sup>.

Em nosso estudo, animais expostos ao álcool apresentaram aumento da expressão de RNAm de PLN, sugerindo uma possível alteração da função cardíaca nestes animais no futuro.

Analisando em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o miocárdio da prole com exposição pré-natal ao álcool

apresentou aumento significativo de RNAm de genes ligados à lesão de cardiomiócitos, possivelmente devido à ação tóxica do álcool. A partir dos nossos resultados, podemos sugerir que as maiores alterações ocorreram em maior número e intensidade em machos que fêmeas PAE. A presença do estrógeno, que atenua o desenvolvimento de cardiopatias, pode ter sido fundamental para a maior proteção observada em fêmeas expostas ao álcool em comparação com machos PAE.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em nosso modelo experimental, a PAE evidenciou que o consumo de álcool durante a gestação, mesmo em concentrações baixas a moderadas resultou no aumento da expressão de diversos genes relacionados à disfunções cardíacas.

A ativação da transcrição de genes específicos e uma possível repercussão da tradução destes RNA mensageiros evidenciam o efeito deletério silencioso do álcool na homeostase e suscetibilidade às doenças cardíacas.

Dessa forma, os resultados apresentados por este estudo evidenciaram que a prole de machos e fêmeas PAE apresentaram aumento significativo da maioria de RNAm de genes que estão relacionados à lesão miocárdica. As fêmeas PAE parecem apresentar maior proteção em comparação aos machos provavelmente pela presença do estrógeno que age como protetor de cardiopatias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO) Management of Substance Abuse Unit. Global Status Report on Alcohol and Health. WHO; Geneva, Switzerland: 2014
2. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018 [internet]. Geneva: World Health Organization; 2018
3. Tonigan JS, Connors GJ, Miller WR. Special populations in alcoholics anonymous. *Alcohol Health Res World*. 1998;22: 281-285
4. Andrade, AG. *Álcool e a Saúde dos Brasileiros: Panorama 2020*. São Paulo: Centro de Informações sobre Saúde e Álcool- CISA, 20
5. ARCR - Alcohol Research: Current Reviews Editorial Staff. Drinking patterns and their definitions. *Alcohol Res*. 2018;39:17–18.
6. GBD 2016 Alcohol Collaborators. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990- 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*: 2018;392:1015–1035.
7. Bratberg GH, Wilsnack SC, Wilsnack R, Håvås Haugland S, Krokstad S, Sund ER et al. Gender differences and gender convergence in alcohol use over the past three decades (1984-2008). *The HUNT Study, Norway. BMC Public Health*. 2016;16:723.
8. Manthey J, Shield KD, Rylett M, Hasan OSM, Probst C, Rehm J. Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study. *Lancet*. 2019;393(10190):2493–2502.

9. Erol A, Karpyak VM. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: contemporary knowledge and future research considerations. *Drug Alcohol Depend.* 2015;156:1-13.
10. Massaro LTS, Abdalla RR, Laranjeira R, Caetano R, Pinsky I, Madruga CS. Alcohol misuse among women in Brazil: recent trends and associations with unprotected sex, early pregnancy, and abortion. *Braz J Psychiatr.* 2019; 41:131-7
11. Gigliotti M et al. (2008). Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. *Clín.-Científ. Recife*, 7(2), pp. 107-112.
12. Cederbaum, A.I., 1991. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol and Alcoholism (Suppl 1)*, 291–296.
13. Kukielka, E., Dicker, E., Cederbaum, A.I., 1994. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 309 (2), 377–386.
14. Das, S.K., Nayak, P., Vasudevan, D.M., 2003. Biochemical markers for alcohol consumption. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 18 (2), 111–118.
15. Mantle, D., Preedy, V.R., 1999. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* 18 (4), 235–252.
16. Salmela, K.S., Kessova, I.G., Tsyroly, I.B., Lieber, C.S., 1998. Respective roles of cytochrome P450 2E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 22, 2125–2132.
17. Nordmann, R, Rouach, H. Alcohol and free radicals: from basic research to clinical prospects. *Annales de Gastroentérologie et d'hépatologie* 1996; 32 (3), 128–133 (discussion 133–134).
18. Mello, MLM, Barrias J, Breda J. Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal, Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, 2001; 120.
19. Coleman, W.B., Cunningham, C.C., 1991. Effect of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial transcription and translation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1058, 178–186.

20. Junior AA et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, Ribeirão Preto, 31: 434-449, jul./set. 1998.
21. Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev.* 2004;36(3-4):511-529. doi:10.1081/DMR-200033441.
22. Matos LC. Doença Hepática Alcoólica (DHA). *Revista Sociedade Portuguesa Medicina Interna*, 2003 Vol. 13, nº3, pp.307-216 Ward RJ, Jutla J, Peters TJ. Antioxidants status in alcoholic liver disease. *Adv Biosci.* 1989; 76(5): 343-51.
23. Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 2007; 81(3):177-87.
24. Sulik KK. Fetal alcohol spectrum disorder: pathogenesis and mechanisms. *Handb Clin Neurol.* 2014;125:463-475. doi:10.1016/B978-0-444-62619-6.00026-4.
25. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. Gestational Alcohol Exposure Altered DNA Methylation Status in the Developing Fetus. *Int. J. Mol. Sci.* 2017b;18(7):1386-1400. doi:10.3390/ijms1807138.
26. Warren KR, Hewitt BG, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Research Challenges and Opportunities. *Alcohol Res Health.* 2011;34(1):4-14. PMID: 23580035.
27. Randall, C. L.: Alcohol as a teratogen: a decade of research in review. In *Advances in biomedical alcohol research: Third Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Alcohol and Alcoholism Supplement No. 1, 1987. Helsinki, Finland, June 8-13, 1986. Pergamon Press, 1987, pp. 125-132.*]
28. Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG. Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem Cell Biol.* 2018;96(2):131-147. doi:10.1139/bcb-2017-0280
29. May PA, Hasken JM, Blankenship J, Marais AS, 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;63:13–21. doi:10.1016/j.reprotox.2016.05.002.

30. Spahn JM, Callahan EH, Spill MK, Wong YP, Benjamin-Neelon SE, Birch L 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;109(Suppl 1):1003S-1026S. doi:10.1093/ajcn/nqy240.
31. Segre CAM. Efeitos do álcool na gestante, no feto e no recém-nascido. São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo. 2010.
32. Mennella J. Alcohol's effect on lactation. *Alcohol Res Health*. 2001;25(3):230–234. PMID:11810962.
33. 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;138(2):e20154256. doi:10.1542/peds.20154256
34. Idrus NM, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Experimental Treatments and Strategies for Intervention. *Alcohol Research & Health*. 2011;34(1):76-85. PMID: 23580044.
35. 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 Journal*. 2015;49(3):207-217. doi:10.1016/j.alcohol.2015.01.005.
36. 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 Research*. 2019;111(12):775-788. doi:10.1002/bdr2.1458.
37. 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. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2000;24:213-219. doi:10.1111/j.1530-0277.2000.tb04593.x.
38. 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;57:116-131. doi:10.1111/jcpp.12451.



39. 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;171(10):948956. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.1919.
40. Zhang Y, Wang H, Li Y, Peng Y. A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress, *Int. J. Developmental Neuroscience.* 2018;71:140-145. doi:10.1016/j.ijdevneu.2018.09.001.
41. Reidpath DD, Allotey P. Infant mortality rate as an indicator of population health. *J. Epid. Com. Health.* 2003;57:344-346. doi:10.1136/jech.57.5.344.
42. Jones KL. The Effects of Alcohol on Fetal Development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2011;93(1):3-11. doi:10.1002/bdrc.20200.
43. 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;19(3):364-368.
44. Fontoura FC, Cardoso MVLML. Associação das malformações congênitas com variáveis neonatais e maternas em unidades neonatais numa cidade do nordeste brasileiro. *Texto & Contexto Enf.* 2014;23(4):907-914. doi:10.1590/0104-07072014002320013.
45. Bailey BA, Sokol RJ. Prenatal Alcohol Exposure and Miscarriage, Stillbirth, Preterm Delivery, and Sudden Infant Death Syndrome. *Alcohol Research & Health.* 2011;34(1):86-91. PMID:23580045.
46. BRASIL. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. ISBN 978-85-334-2701-3.
47. Mendes IC, Jesuino RSA, Pinheiro DS, Rebelo ACS. Anomalias congênitas e suas principais causas evitáveis: uma revisão. *Revista Médica de Minas Gerais.* 2018;28(e-1977):2-6. doi:10.5935/22383182.20180011.
48. Oliveira-Brancati CIF, Ferrarese VCC, Costa AR, Fett-Conte AC. [PROVISIONAL] Birth defects in Brazil: Outcomes of a population-based

- study. *Genet. Mol. Biol.* 2019;Epub. doi:10.1590/1678-4685-gmb-20180186.
49. 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](http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade).
50. 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;35(1):33-38. doi: 10.1590/1984-0462/;2017;35;1;00002.
51. 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;5(3):PE290-PE299. doi:10.1016/S2214-109X(17)30021-9.
52. Passini Junior R. Alcohol consumption during pregnancy. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2005;27(7):373-375. doi:10.1590/S010072032005000700001.
53. Fiorentin CF, Vargas D. O uso de álcool entre gestantes e os seus conhecimentos sobre os efeitos do álcool no feto. *SMAD, Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.* 2006;2(2):1-13.
54. 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.
55. Kaup ZOL, Merighi MAB, Tsunehiro MA. Avaliação do consumo de bebida alcoólica durante a gravidez. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2001;23(9):575-80. doi:10.1590/S0100-72032001000900005.
56. 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 Medical Journal.* 2016;134(2):146-152. doi:10.1590/1516-3180.2015.02040211.

57. Ernhart CB, Morrow-Tlucak M, Sokol RJ, Martier S. Underreporting of alcohol use in pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res*. 1988;12(4):506-511. doi:10.1111/j.1530-0277.1988.tb00233.x.
58. Burns L, Mattick RP, Wallace C. Smoking patterns and in a population of pregnant women with other substance use disorders. *Nicotine Tob Res*, (2008)10:969-974.
59. Guttlein L, Macchione AF, Hernández-Fonseca K, Haymal OB, Molina JC, Ubach MM, Abate P. Maternal manipulation during late gestation (GDs 1720) enhances ethanol consumption and promotes changes and opioid mRNA expression in infant rats. *Behavioural Brain Research*. 2019;368: 111908. doi: 10.1016/j.bbr.2019.111908.
60. Morgan DJ. Drug disposition in mother and foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1997) 24:869–873.
61. Tran MN, Wu AH, Hill DW (2007) Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: potential influence on neonatal alcohol metabolism. *Toxicol Lett* 169:245–252.]
62. Wagner JG, Wilkinson PK, Sedman AJ, Kay DR, Weidler DJ (1976) Elimination of alcohol from human blood. *J Pharm Sci* 65:152–154
63. Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O (2005) Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 26:361–371.
64. Zelner I, Koren G (2013) Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 20:e259–e265.
65. Siler-Khodr TM, Yang Y, GraysonMH, Henderson GI, LeeM, Schenker S(2000) Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol* 21:169–180.
66. Ernhart, C. B., et al.: Alcohol teratogenicity in the human: a detailed assessment of specificity, critical period, and threshold. *Am J Obstet Gynecol* 156: 33-39 (1987).
67. Warren\_K\_ R., Bast\_R\_ J. Alcohol-related birth defects: an update. *Public Health Rep*. 1988 Nov-Dec; 103(6): 638–642.
68. Coffey, T. G.: Beer Street: Gin Lane: some views of 18th century drinking. *Q J Stud Alcohol* 27: 669-692 (1966).

69. Warner, R. H., and Rosett, H. L.: Effects of drinking on offspring: an historical survey of the American and British literature. *J Stud Alcohol* 36: 1395-1420 (1975).
70. Sullivan, W. C.: A note on the influence of maternal inebriety on the offspring. *J Ment Sci* 45: 489-503 (1899).
71. Jones, K. L., Smith, D. W., Ulleland, C. N., and Streissguth, A. P.: Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* No. 7815: 1267-1271, June 9, 1973]
72. Rosett, H. L.: Clinical perspective of the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism* 4: 119-122 (1980).]
73. Farag M (2014) Diagnostic issues affecting the epidemiology of fetal alcohol spectrum disorders. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 21:e153–e158.
74. Goh YI, Chudley AE, Clarren SK, Koren G, Orrbine E, Rosales T, Rosenbaum C, Taskforce for Development of FASD Screening Tools (2008) Development of Canadian screening tools for fetal alcohol spectrum disorder. *Can J Clin Pharmacol* 15:e344–e366.
75. Abel, E. L., and Sokol, R. J.: Fetal alcohol syndrome is now leading cause of mental retardation. *Lancet* No. 8517: 1222, Nov. 22, 1986.
76. 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 and Behavior*. 2018;e12484:1-13. doi:10.1111/gbb.12484.
77. 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;19(5)389-400. doi:10.1007/s12012-018-09503-8.
78. May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res Health*. 2001;25(3):159–167. PMID:11810953.
79. Riley EP, Infante MA, Warren KR (2011) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev* 21:73–80]

80. Bertrand J, Floyd LL, Weber MK; Fetal Alcohol Syndrome Prevention Team, Division of Birth Defects and Developmental Disabilities, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005) Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. *MMWR Recomm Rep* 54 (RR-11):1–14.
81. Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Les enfants des parents alcooliques: anomalies observées à propos de 127 cas. *Quest Medical*. 1968;25:476–482. doi:10.1097/00007691-200304000-00002.
82. 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.
83. Pinson MR, Miranda RC. Noncoding RNAs in development and teratology, with focus on effects of cannabis, cocaine, nicotine, and ethanol. *Birth Defects Research*. 2019;111:1308–1319. doi:10.1002/bdr2.1559.
84. Amaral AO. *Violência e criminalidade: A Síndrome Alcoólica Fetal como um dos fatores para o seu crescimento. Uma abordagem jurídico-social*. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso em Direito.
85. 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. *Ver. Bras. Saúde Mat. Inf.* 2017;17(2):271-279. doi:10.1590/1806-93042017000200004.
86. O'Leary, C.M., Elliott, E.J., Nassar, N. and Bower, C. (2013), 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;97(7):497-504. doi:10.1002/bdra.23142.
87. Jones K, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth AP. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *The Lancet*. 1973;301(7815):1267-1271. doi:10.1016/S0140-6736(73)91291-9.
88. 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;44(7-8):635-641. doi:10.1016/j.alcohol.2009.08.005.
89. Burd L, Deal E, Rios R, Adickes E, Wynne J, Klug MG. Congenital heart defects and fetal alcohol spectrum disorders. *Congenit Heart Dis*. 2007;2(4):250–255. doi:10.1111/j.1747-0803.2007.00105.x.
90. 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;37(3):452-62. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01940.x.
91. 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;48(5):359369. doi:10.1708/1356.15062.
92. Akers KG, Kushner SA, Leslie AT, Clarke L, Van der Kooy E, Lerch JP, Franklan PW. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. *Molecular Brain*. 2011;4(29):2-15. doi:10.1186/1756-6606-4-29.
93. 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;160(7):661–7. doi:10.1093/aje/kwh259.
94. Kesmodel U, Schiøler Kesmodel P. Drinking During Pregnancy: Attitudes and Knowledge Among Pregnant Danish Women, 1998. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(10):1553-1560. doi:10.1111/j.1530-0277.2002.tb02455.x.
95. Patra J, Taylor B, Irving H, Roerecke M, Baliunas D 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;10,258. doi:10.1186/1471-2458-10-258.
96. 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<sup>2+</sup>: relevance to fetal alcohol syndrome. *European J. Pharmacology*. 1996;314(3):R9-R11. doi:10.1016/S0014-2999(96)00739-X.

97. 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*. 2006;231(8):1379–1397.
98. 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;118(6):e1734-e1738. doi:10.1542/peds.2006-1037.
99. Wilson SEDVM, Cudd, TADVM. Focus On: The Use of Animal Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Research & Health*. 2011;34(1):92-98.
100. Chudley A, Conry J, Cook JL, Looock C, Rosales T, LeBlanc N. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *CMAJ*. 2005;172(5 Suppl):S1-S21. doi:10.1503/cmaj.1040302.
101. Löser H, Pfefferkorn JR, Themann H. Alkohol in der Schwangerschaft und kindliche Herzschiäden [Alcohol in pregnancy and fetal heart damage]. *Klin Padiatr*. 1992 Sep-Oct;204(5):335-9. German. doi: 10.1055/s-20071025368. PMID: 1405419.
102. Rojmahamongkol P, Cheema-Hasan A, Weitzman C. Do pediatricians recognize fetal alcohol spectrum disorders in children with developmental and behavioral problems? *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*. 2015;36(3):197-202. doi:10.1097/DBP.0000000000000146.
103. Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? *Am J Physiology: Heart and Circul Phys*. 2006;291(3):H1015-1026. doi:10.1152/ajpheart.00023.2006.
104. Gu Y, Jayatilak PG, Parmer TG, Gauldie J, Fey GH, Gibori G. Alpha 2macroglobulin expression in the mesometrial decidua and its regulation by decidual luteotropin and prolactin, *Endocrinology*. 1992;131(3):1321–1328. doi:10.1210/endo.131.3.1380439.
105. Linask KK, Huhta JC. Use of Doppler echocardiography to monitor embryonic mouse heart function. *Methods Mol Bio*. 2000;135:245–252. PMID: 10791321.

106. Parkington HC, Coleman HA, Wintour EM, Tare M. Prenatal alcohol exposure: Implications for cardiovascular function in the fetus and beyond. *Clin Exp Pharm Phys.* 2010;37(2):e91–98. doi:10.1111/j.14401681.2009.05342.x.
107. 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 Society Nephrology.* 2010;21(11):1891-1902. doi:10.1681/ASN.2010040368.
108. 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;26(2):75-81. doi:10.1016/s0741-8329(01)00198-7.
109. 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. *Toxicology Letters.* 2015;233(3):267-277. doi:10.1016/j.toxlet.2014.12.018.
110. Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast: A new hope. *Circ. J.* 2016;80(11):2269-76. doi:10.1253/circj.CJ-16-1003.
111. Deb A, Ubil E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J Mol Cell Card.* 2014;70:47-55. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.017.
112. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circ Res.* 2009;105(12):1164-1176. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209809.
113. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010;106(11):1675-80. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217737.
114. 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. *Jour. Bras. Patol. e Med. Labor.* 2003;39(3):203-206.
115. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabol.* 1987;36:458-462. doi:10.1016/0026-0495(87)90043-6.



116. Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DA. Hiper-Homocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. *Arquivos Bras Cardiologia*. 1998;71(1):69-76. doi:10.1590/S0066-782X1998000700013.
117. Kobor MS, Weinberg J. Focus On: Epigenetics and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Alc Res Health*. 2011;34(1):29-37. PMID:23580038.
118. Kolling J, Scherer EB, Cunha AA, Cunha MJ, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol*. 2011;11(1):67-73. doi:10.1007/s12012-010-9094-7.
119. Sprince H, Parker CM, Smith GG, Gonzales LJ. Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2methylthiazolidine-4-carboxylic acid. *Agents Actions*. 1974;4(2):125-130. doi:10.1007/BF01966822.
120. 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;8(1355):151-64. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.071.
121. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2004;40(5):311-20.
122. Lander ES, Weinberg, RA. Genomics: journey to the center of biology. *Science*. 2000;287(5459):1777-1782. doi:10.1126/science.287.5459.1777.
123. 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;2(7):pii:e12087. doi:10.14814/phy2.12087.
124. 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;10(1):1-12. doi:10.1186/s13293-019-0235-9.
125. 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.

126. 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;10:961-971. doi:10.1038/sj.mp.4001694.
127. 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
128. Levine JE. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. 2015; Em: Plant TM, Zeleznik A. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol. 2. 4. ed. Londres: Academic Press; 2015. ISBN:0123971756.
129. Santos BF. Criação e Manejo de Camundongos. Em: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2002. ISBN: 85-7541-015-6. [acesso em: 10 jul 2019]. Disponível em SciELO Books.
130. 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;57(2):122-132. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00452.x.
131. Gilbert-Barness E. Review: Teratogenic Causes of Malformations. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2010;40(2):99-114.
132. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(8):2428-37. doi:10.1093/nar/gkl287.
133. Brown TA. *Genomes*. 2. ed. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Chapter 1, The Human Genome. [acesso em 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>.
134. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P; Baltimore D, Darnell J. *The Three Roles of RNA in Protein Synthesis*. *Molecular Cell Biology*. 4. ed. New York: W. H. Freeman; 2000. [acesso em 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.

135. 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;291(5507):1289-1292. doi:10.1126/science.1056794.
136. Alberts B, Bray D, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al. *Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2005.
137. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci*. 2006;51(2):253-65. doi 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.
138. Aronson JK, Ferner, RE. Biomarkers-A general review. *Current Protocols in Pharmacology*. 2017;76:9.23.1-9.23.17. doi:10.1002/cpph.19.
139. Feliciano RS. *Ação da laserterapia no infarto do miocárdio induzido por oclusão da artéria coronária em ratas: Análise do perfil de expressão gênica*. Universidade Nove de Julho: São Paulo, 2015. [dissertação de mestrado em Medicina].
140. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113:2335–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570.
141. Nuñez SC, Roussotte F, Sowell ER. Focus On: Structural And Functional Brain Abnormalities In Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Res Health* 2011;34(1):121-132. PMID:23580049.
142. 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;177:258–267. doi:10.1016/j.drugalc dep. 2017. 04. 010.
143. 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. *Behavioral Brain Research*. 2014;274:194-204. doi:10.1016/j.bbr.2014.08.022.

144. Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD. Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat Reviews Neurosci.* 2009;10:303-312. P MID:19277053.
145. Mendes CQS, Avena MJ, Mandetta MA, Balieiro MMFG. Prevalência de nascidos vivos com anomalias congênitas no município de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Enf. Pediatras.* 2015;15(1):7-12.
146. Kalter H. Teratology in the 20th century: Environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. *Neurotoxicology and Teratology.* 2003;25(2):131-282. doi:10.1016/S08920362(03)00010-2.
147. ONU Brasil. OPAS: anomalias congênitas são 2ª causa de morte de recém-nascidos e crianças com menos de 5 anos. Cidade: ONUBR; 2016. [acesso em 18 fev 2019]. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/opasanomalias-congenitas>.
148. 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.
149. Sebikari D, Farhad M, Fenton T, Owor M, Stringer JS, Qin M et al. Risk Factors for Adverse Birth Outcomes in the PROMISE 1077BF/1077FF Trial. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2019;81(5):521–532. doi:10.1097/QAI.0000000000002072.
150. 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. *Neurob Learn Mem.* 2018;156:1-16. doi:10.1016/j.nlm.2018.10.002.
151. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit.* 1. ed. Londres: CRC Press; 1988.
152. Abate P, Reyes-Guzmán AC, Hernández-Fonseca K, Méndez M. Prenatal ethanol exposure modifies locomotor activity and induces selective changes in Met-enk expression in adolescent rats. *Neuropeptides.* 2016;62:45-56. doi:10.1016/j.npep.2016.11.006.
153. 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;356:127136. doi:10.1016/j.bbr.2018.08.018.
154. Nanni L, Romualdi C, Maseri A, Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:934-48. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.08.009.
155. Jung ME, Metzger DB. A sex difference in oxidative stress and behavioral suppression induced by ethanol withdrawal in rats. *Behav Brain Res.* 2016 Nov 1;314:199-214. doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.054. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27503149; PMCID: PMC5002225.
156. Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabé de Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.* 2009 Sep;23(9):3233-42. doi: 10.1096/fj.09-132795. Epub 2009 May 5. PMID: 19417079.
157. Esworthy RS, Doan K, Doroshov JH, Chu FF. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene.* 1994 Jul 8;144(2):317-8. doi: 10.1016/0378-1119(94)90400-6. PMID: 8039723.
158. Wang C, Yuan W, Hu A, Lin J, Xia Z, Yang CF, Li Y, Zhang Z. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury. *Mol Med Rep.* 2020 Jul;22(1):175-184. doi: 10.3892/mmr.2020.11114. Epub 2020 May 4. PMID: 32377745; PMCID: PMC7248514.
159. Bai J, Cederbaum AI. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept.* 2001 May-Aug;10(3-4):189-99. doi: 10.1159/000046887. PMID: 11351128.
160. Rapti K, Diokmetzidou A, Kloukina I, Milner DJ, Varela A, Davos CH, Capetanaki Y. Opposite effects of catalase and MnSOD ectopic expression on stress induced defects and mortality in the desmin deficient cardiomyopathy model. *Free Radic Biol Med.* 2017 Sep;110:206-218. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.010. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28629836.

161. Undyala V, Terlecky SR, Vander Heide RS. Targeted intracellular catalase delivery protects neonatal rat myocytes from hypoxia-reoxygenation and ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2011 Sep-Oct;20(5):27280. doi: 10.1016/j.carpath.2010.06.011. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20708413; PMCID: PMC2988098.
162. Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(6), 670–684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
163. Mansilla MJ, Comabella M, Río J, Castilló J, Castillo M, Martin R, Montalban X, Espejo C. Up-regulation of inducible heat shock protein-70 expression in multiple sclerosis patients. *Autoimmunity.* 2014 Mar;47(2):127-33. doi: 10.3109/08916934.2013.866104. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24328534.
164. Henstridge DC, Whitham M, Febbraio MA. Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. *Mol Metab.* 2014;3(8):781-793. Published 2014 Aug 30. doi:10.1016/j.molmet.2014.08.003.
165. Kaplán P, Tatarková Z, Lichardusová L, Kmeťová Sivoňová M, Tomašcová A, Račay P, Lehotský J. Age-Associated Changes in Antioxidants and Redox Proteins of Rat Heart. *Physiol Res.* 2019 Dec 30;68(6):883-892. doi: 10.33549/physiolres.934170. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31647296.
166. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Jul 11;70(2):212-229. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.035. PMID: 28683969; PMCID: PMC5663297.
167. Zuo L, Chuang CC, Hemmelgarn BT, Best TM. Heart failure with preserved ejection fraction: Defining the function of ROS and NO. *J Appl Physiol (1985).* 2015 Oct 15;119(8):944-51. doi: 10.1152/jappphysiol.01149.2014. Epub 2015 May 14. PMID: 25977452.
168. Akhmedov AT, Rybin V, Marín-García J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev.*

- 2015 Mar;20(2):227-49. doi: 10.1007/s10741-014-9457-4. PMID: 25192828.
169. Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, Nicolaidis KH, Ruíz A, Domínguez C, Sánchez-de-Toledo J, García-García B, Soro G, Arévalo S, Goya M, Suy A, Pérez-Hoyos S, Alijotas-Reig J, Carreras E, Cabero L. Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J*. 2014 Mar;35(11):701-7. doi: 10.1093/eurheartj/eh389. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24159191.
170. Oikonomou E, Zografos T, Papamikroulis GA, Siasos G, Vogiatzi G, Theofilis P, Briasoulis A, Papaioannou S, Vavuranakis M, Gennimata V, Tousoulis D. Biomarkers in Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Curr Med Chem*. 2019;26(5):873-887. doi: 10.2174/0929867324666170830100424. PMID: 28875838.
171. Hanna A, Frangogiannis NG. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020 Dec;34(6):849-863. doi: 10.1007/s10557-020-07071-0. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32902739; PMCID: PMC7479403.
172. Cappola TP, Burke MF. Studying Heart Failure Through the Lens of Gene Regulation. *Circ Heart Fail*. 2020 Oct;13(10):e007647. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007647. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32993370; PMCID: PMC7577926.
173. Chouvarine P, Legchenko E, Geldner J, Riehle C, Hansmann G. Hypoxia drives cardiac miRNAs and inflammation in the right and left ventricle. *J Mol Med (Berl)*. 2019 Oct;97(10):1427-1438. doi: 10.1007/s00109-01901817-6. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31338525.
174. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:81-101. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142249. Epub 2002 May 1. PMID: 12500970.
175. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag*. 2019 Jan 17;15:1-10. doi: 10.2147/VHRM.S166157. PMID: 30697054; PMCID: PMC6340361.

176. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1010-4. doi: 10.1126/science.1092734. PMID: 14963330.
177. Wu X, Deng Y. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci*. 2002 Jan 1;7:d151-6. doi: 10.2741/A772. PMID: 11779719.
178. Patel S, George R, Autore F, Fraternali F, Ladbury JE, Nikolova PV. Molecular interactions of ASPP1 and ASPP2 with the p53 protein family and the apoptotic promoters PUMA and Bax. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(16):5139-51. doi: 10.1093/nar/gkn490. Epub 2008 Aug 2. PMID: 18676979; PMCID: PMC2532732.
179. Carpenter R, Brady MF. BAX Gene. 2021 Feb 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 32310387.
180. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):36-44. doi: 10.1038/sj.cdd.4401179. PMID: 12655294.
181. Menendez JA, Decker JP, Lupu R. In support of fatty acid synthase (FAS) as a metabolic oncogene: extracellular acidosis acts in an epigenetic fashion activating FAS gene expression in cancer cells. *J Cell Biochem*. 2005 Jan 1;94(1):1-4. doi: 10.1002/jcb.20310. PMID: 15523670.
182. Zhu Y, Yang T, Duan J, Mu N, Zhang T. *MALAT1/miR-15b-5p/MAPK1* mediates endothelial progenitor cells autophagy and affects coronary atherosclerotic heart disease via mTOR signaling pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019 Feb 21;11(4):1089-1109. doi: 10.18632/aging.101766. PMID: 30787203; PMCID: PMC6402525.
183. Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, Jin X, Aihara M, Saigusa T, Kang D, Kanki T. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. *Autophagy*. 2015;11(2):332-43. doi: 10.1080/15548627.2015.1023047. PMID: 25831013; PMCID: PMC4502654.



184. Ricard N, Zhang J, Zhuang ZW, Simons M. Isoform-Specific Roles of ERK1 and ERK2 in Arteriogenesis. *Cells*. 2019 Dec 21;9(1):38. doi: 10.3390/cells9010038. PMID: 31877781; PMCID: PMC7017123.
185. Greenberg B. Gene therapy for heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2017 Apr;27(3):216-222. doi: 10.1016/j.tcm.2016.11.001. Epub 2016 Nov 5. PMID: 28063800.
186. Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R, Enouf J. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Apr;48(4):633-44. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.012. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19962989.
187. Zhihao L, Jingyu N, Lan L, Michael S, Rui G, Xiyun B, Xiaozhi L, Guanwei F. SERCA2a: a key protein in the Ca<sup>2+</sup> cycle of the heart failure. *Heart Fail Rev*. 2020 May;25(3):523-535. doi: 10.1007/s10741-019-09873-3. PMID: 31701344.
188. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007 Apr;35(4):430-42. doi: 10.1002/mus.20745. PMID: 17286271.
189. Wleklinski MJ, Kannankeril PJ, Knollmann BC. Molecular and tissue mechanisms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Physiol*. 2020 Jul;598(14):2817-2834. doi: 10.1113/JP276757. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32115705; PMCID: PMC7699301.
190. Zarain-Herzberg A, Fragoso-Medina J, Estrada-Avilés R. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life*. 2011 Oct;63(10):847-55. doi: 10.1002/iub.545. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21901815.
191. Zarain-Herzberg A, Estrada-Avilés R, Fragoso-Medina J. Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and calsequestrin gene expression in the heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Aug;90(8):1017-28. doi: 10.1139/y2012-057. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22784385.
192. Haddad R, Kasneci A, Sebag IA, Chalifour LE. Cardiac structure/function, protein expression, and DNA methylation are changed in adult female mice exposed to diethylstilbestrol in utero. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013

- Sep;91(9):741-9. doi: 10.1139/cjpp-2013-0014. Epub 2013 Apr 24. PMID: 23984849.
193. Guo GL, Sun LQ, Sun MH, Xu HM. LncRNA SLC8A1-AS1 protects against myocardial damage through activation of cGMP-PKG signaling pathway by inhibiting SLC8A1 in mice models of myocardial infarction. *J Cell Physiol.* 2019 Jun;234(6):9019-9032. doi: 10.1002/jcp.27574. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30378115.
  194. Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1990 Aug 15;265(23):13472-83. PMID: 2380170.
  195. Ding Z, Yuan J, Liang Y, Wu J, Gong H, Ye Y, Jiang G, Yin P, Li Y, Zhang G, Yang C, Guo J, Chen Z, Wang X, Weng L, Zou Y. Ryanodine Receptor Type 2 Plays a Role in the Development of Cardiac Fibrosis under Mechanical Stretch Through TGF $\beta$ -1. *Int Heart J.* 2017 Dec 12;58(6):957961. doi: 10.1536/ihj.16-572. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29162778.
  196. van Oort RJ, Respress JL, Li N, et al. Accelerated development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in an RyR2-R176Q knockin mouse model. *Hypertension* 2010; 55: 932-8
  197. Zou Y, Liang Y, Gong H, et al. Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressureoverload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2011; 58: 1099-110.
  198. Rodriguez P, Kranias EG. Phospholamban: a key determinant of cardiac function and dysfunction. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005 Dec;98(12):123943. PMID: 16435604.
  199. Haghighi K, Gregory KN, Kranias EG. Sarcoplasmic reticulum CaATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 1;322(4):1214-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.164. PMID: 15336969.
  200. H.K. Simmerman, J.H. Collins, J.L. Theibert, A.D. Wegener, L.R. Jones, Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation

sites and two major structural domains, J. Biol. Chem. 261 (1986) 13333–13341.

## **ANEXOS**

### 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