

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

JOSE ALMIR ALVES DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR NO
MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL**

**São Paulo
2021**

JOSE ALMIR ALVES DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR NO
MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL**

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

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

São Paulo

2021

Silva, José Almir Alves da.

Análise da expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo e sobrevivência celular no miocárdio de camundongos machos e fêmeas adultos submetidos à exposição pré-natal ao álcool. / José Almir Alves da Silva. 2021.

83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Álcool. 2. Expressão gênica. 3. Miocárdio. 4. Metabolismo. 5. Sobrevivência celular.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616

São Paulo 16 de dezembro de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **JOSÉ ALMIR ALVES DA SILVA**

Titulo da dissertação: **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS ADULTOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL.**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR *Jose A Silva Junior*

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI *Maria Aparecida Dalboni*

Membro: PROFA. DRA. LUCIANA APARECIDA CAMPOS BALTATU *Luciana Campos Baltatu*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, à Deus e a seu filho unigênito Jesus Cristo, ao Imaculado coração de Maria, por me guiarem durante minha jornada acadêmica.

À minha mãe Luci Vagna Feitosa e ao meu pai Antenor Alves.

Aos meus irmãos Ariane, Antenor Junior e Djally

À minha sobrinha Maria Antonella

À minha Vó Dalva Alves e a todos familiares.

Aos meus avós Maria Lucia, Valdemir Francelino e Amarílio Batista. (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita misericórdia e por ser luz em meu caminho. À minha mãe, Luci Vagna Feitosa, por ter me proporcionado uma boa educação através de muito esforço. Por todas as orações, todo amor, e carinho, mesmo estando distante.

Ao meu pai Antenor Alves da Silva, por ser um pai presente na minha vida. Ao meu tio José Bertoso, por ter me apoiado fielmente em minha estadia em São Paulo.

À minha tia Lucivan e prima Fátima, por terem me acolhido durante meus estudos.

À minha querida amiga Ana Carla Barbosa de Moura Silva, que é um porto seguro nos momentos em que mais preciso, e sempre esteve ao meu lado. Ao meu orientador Dr. José Antônio Silva Júnior, por ter me dado a oportunidade e a honra de fazer parte deste belíssimo trabalho, por toda orientação, ensinamento e paciência.

À Dra. Maria Aparecida Dalboni, pela gentileza e profissionalismo pelo qual passou seus conhecimentos durante todo o processo.

À Dra. Stella Regina Zamuner, por todo apoio e ensinamentos passados durante as disciplinas do mestrado.

À Dra. Marisa Passarelli, por todo carinho e atenção durante as aulas do mestrado.

A todos professores e orientadores do programa de pós-graduação mestrado e doutorado em Medicina da Universidade Nove de Julho.

A todos funcionários, secretários e toda equipe que nos auxiliaram nos laboratórios de pesquisa.

Aos meus colegas, gestores e diretores do Instituto Butantan por todo apoio e pelas portas que se abriram através do mestrado.

A minha querida amiga e companheira de pesquisa Danila Marques de Oliveira, que demonstrou através da sua delicadeza ser uma grande amiga e uma grande pessoa.

Ao meu querido amigo Érico Gustavo da Silva Ruiz, pela gentileza e o companheirismo durante o período de pesquisa.

Ao colega de pesquisa, Allan Luís Barbosa Atum, por todo apoio, ensinamentos e dedicação durante todo projeto.

RESUMO

A exposição ao álcool no período gestacional (EPA) é um problema de saúde pública mundial. Acredita-se que o álcool favoreça a formação de teratogênias induzidas por morte celular em decorrência de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes endógenos. Poucos estudos têm avaliado o impacto e os mecanismos celulares a longo prazo envolvidos em indivíduos portadores das Desordens do Espectro Alcoólico Fetal (FASD). Desta forma, faz-se necessário novos estudos que avaliem as alterações moleculares causadas pelo EPA. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de genes participantes das vias do metabolismo e sobrevivência celular no miocárdio. Desta forma, utilizando 10 camundongos isogênicos C57Bl/6 expostos ao álcool a 10% (v/v), foram analisadas as expressões de RNAm de genes componentes de vias de sobrevivência e metabolismo celular (AKT-1, VEGFA, GAPDH, HK1, NDUFA3, PFKM, SLC2A1, TAZ e UCP2) no miocárdio de animais machos e fêmeas com exposição pré-natal ao álcool. A EPA modulou a expressão de todos os genes analisados, inclusive do GAPDH que é reconhecido gene endógeno de controle em reações moleculares. Entre machos e fêmeas, não houve diferença de expressão entre 2 genes (HK1 e TAZ), entretanto todos os outros apresentaram diferenças nas expressões de genes relacionados à angiogênese, metabolismo e sobrevivência celular entre machos e fêmeas com EPA. Em conclusão, nossos dados sugerem que a EPA resultou em modificações transcricionais que persistiram no miocárdio na fase adulta, sendo mais pronunciadas em machos que em fêmeas. Observamos também que, em fêmeas EPA, parece haver maior ativação de cardioproteção em relação ao estresse oxidativo gerado pelo álcool.

Palavras-chave: Álcool, expressão gênica, miocárdio, metabolismo, sobrevivência celular.

ABSTRACT

Exposure to alcohol during pregnancy (EPA) is a worldwide public health problem. It is believed that alcohol favors the formation of cell death-induced teratogenicity due to an imbalance between the production of reactive oxygen species and endogenous antioxidants. Few studies have evaluated the long-term impact and cellular mechanisms involved in carriers of Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD). Thus, further studies are needed to assess how molecular changes are caused by EPA. The aim of this study was to analyze the expression of messenger RNA (mRNA) of genes participating in the pathways of metabolism and cell survival in the myocardium. Thus, using 10 inbred C57Bl / 6 mice exposed to 10% alcohol (v / v), they were analyzed as mRNA expressions of component genes of access pathways and cellular metabolism (AKT-I, VEGFA, GAPDH, HK1, NDUFA3, PFKM, SLC2A1, TAZ and UCP2) in the myocardium of male animals and aution with prenatal exposure to alcohol. An EPA module for the expression of all responsible genes, including GAPDH which is recognized as the endogenous control gene in molecular reactions. Between males and betrothed, there was no difference in expression between 2 genes (HK1 and TAZ), however all other differences in gene expression related to angiogenesis, metabolism and cell survival between males and betrothed with EPA. In conclusion, our data found that EPA resulted in transcriptional changes that persisted in the myocardium into adulthood, being more pronounced in males than in the second. We also observed that, separately from EPA, there seems to be greater activation of cardioprotection in relation to the oxidative stress generated by alcohol.

Keywords: Alcohol, gene expression, myocardium, metabolism, cell survival

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Consumo total de álcool <i>per capita</i> (APC) (mais de 15 anos; em litros de álcool puro), 2016 – Adaptado de WHO, 2018.....	19
Figura 2 – Via oxidativa do metabolismo do etanol. ADH.....	21
Figura 4 – Conversão de Etanol em Acetaldeído pelo Sistema de enzimas microsossomais oxidativas (MEOS). CYP2E1 – Citocromo P45.....	22

LISTA DE ABREVIACÕES

Ace – *Angiotensin I Converting Enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1*
Ace2 – *Angiotensin I Converting Enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2*
Acetil-CoA – Acetilcoenzima A
Acta2 - Actina do músculo liso alfa
ad libitum – à vontade
ADH – Álcool desidrogenase 2
AdoMet – S-adenosilmetionina
Agtr1a – *Angiotensin II Receptor Type 1a*
Akt1 – *V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1*
ALDH – Acetaldeído desidrogenase
AMP – Adenosina monofosfato
APC – *Álcool per capita*
ARBD – *Alcohol-related birth defects*
ARND – *Alcohol-related neurodevelopmental disorder*
ATP – Trifosfato de Adenosina
Atp2a2 – *ATPase, Ca⁺⁺ Transporting, Cardiac Muscle*
Bax – *BCL2 Associated X Protein*
DNs – *Birth Defects*
C57Bl/6 – Camundongo isogênico C57 *Black 6*
C₇H₅O₃NS – Sacarina Sódica
Cabin1 – *Calcineurin A*
Casq2 – *Calsequestrin Cat*
– *Catalase*
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Chp2 – *Calcineurin B*
CID10 – Classificação Internacional de Doenças 10
CO₂ – Dióxido de carbono
Col1 – Colágeno Tipo I
Col1a1 – *Collagen, Type I*
Col3 – Colágeno Tipo III
Col3a1 – *Collagen, Type III*
CPK – Creatinofosfoquinase
CT – *Cycle Thredshold*
CYP^{2E1} – Citocromo P450 isoforma IIE1
DASIS – Diretoria de Apoio Administrativo ao Sistema de Saúde do Brasil
DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DEPC – Dietilpirocarbonato
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNAse – Desoxirribonuclease
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados E-C – Acoplamento de contração por excitação
Edn1 – *Endothelin 1*
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH – Álcool/ Etanol
FAEE – Éster etílico de ácidos graxos
FAS – *Fetal Alcohol Syndrome*
FAS – Síndrome Alcoólica Fetal

Fas – *TNF Receptor Superfamily, member 6*
FASD – *Fetal Alcohol Spectrum Disorders*
FASD – Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal
Gapdh – *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*
GD – Período gestacional
Gpx4 – *Guthatione Peroxidase*
H₂O₂ – Hidróxido de hidrogênio (Água Oxigenada)
HCl – Ácido clorídrico
Hcy – Homocisteína
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
Hk1 – *Hexokinase 1*
Hspa1a – *Heat Shock 70kD Protein*
Hspa1b – *Heat Shock 70kD Protein* i.g.
– Intragástrico
i.p. – Intraperitoneal
Igf1 – *Insulin-like Growth Factor 1*
IL-6 - *Interleukin 6*
IM – Infarto do Miocárdio
IOM – Instituto de Medicina dos Estados Unidos da América
KCl – Cloreto de potássio
LDH – Lactato-desidrogenase
Map3k2 – *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase-2*
Mapk1 – *Mitogen-actived Protein Kinase 1*
Mapk14 – *Mitogen-activated Protein Kinase 14*
MAT - Metionina-adenosiltransferase
MEC – Matriz Extra Celular
MEOS – Sistema de enzimas microssomais oxidativas
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio Mmp9 –
Matrix Metalloproteinase 9 mRNA –
Ácido ribonucleico mensageiro Myh6 –
Myosin Heavy Chain, Alpha
Myh7 – *Myosin Heavy Chain, Beta*
NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina oxidada
NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida ou hidrogenada
NADP⁺ – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado
NCOP – Não Classificados (as) em outras patologias
Ndufa3 – *NADH Dehydrogenase (Ubiquinose) 1 Alpha Subcomplex, 3 Nfatc3*
– *Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic, Calcineurindendent*
Nppa – *Natriuretic Peptide A*
Nppb - *Natriuretic Peptide B*
NRC – *National Research Council*
OMICS – Expressão Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica
EPA – Exposição Alcoólica Pré-natal
PAM – Pressão Arterial Média
PCG-1α – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PD – Dia pós-parto pFAS – *partial Fetal Alcohol Syndrome* PfkM –

Phosphofructokinase pH – Potencial Hidrogeniônico
Pln – *Phospholamban*
Prakca – *Protein Kinase C, Alpha*
Prakcb – *Protein Kinase C, Beta 1*
Prakcg – *Protein Kinase C, Gamma*
qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
REL – Retículo endoplasmático liso
ReyR – *Ryanodine Receptor 2, Cardiac*
RNA – Ácido ribonucleico
RNase – Ribonuclease
ROX - Fluoróforo de referência passiva rpm
– Rotações por minuto
rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico
RTqPCR – Reação de transcriptase reversa por PCR em tempo real
Sac – Sacarina Sódica (Imida o-sulfobenzóica)

SIDS – Síndrome da morte súbita do lactente
SINASC – Sistema de Informação de Nascidos Vivos do Brasil
Slc2a1 – *Facilitated Glucose Transporter*
Slc8a1 – *Sarcolemal NA-Ca Exchanger*
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
SOD-1 – Enzima superóxido dismutase
Sod1 – *Superoxide Dismutase*
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil
Taz – *Tafazzin*
Tgfb1 – *Transforming Growth Factor, Beta 1*
Tnc – *Tenascin C*
TNF – Fator de necrose tumoral
Tnfrsf1a – *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1a*
TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha*
Tp53 – *Tumor protein p53*
Tris – *2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol*
tRNA – Ácido ribonucleico transportador Ucp-2
– *Mitochondrial Uncoupling Protein 2*
UCP-2 – Proteína Desacopladora mitocondrial 2
UVA – Radiação Ultra-violeta A UVB –
Radiação Ultra-violeta B v/v – Relação de
volume entre soluto e solvente
Vegfa – *Vascular Endothelial Growth Factor A* WHO
– *World Health Organization*

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	
1.1 Diferenças no gênero e doença cardíaca	32
1.2 Alterações cardíacas e exposição pré-natal ao álcool	35
1.3 Biomarcadores	37
1.4. Características e expressão do gene AKT	38
1.5. Características e expressão do gene VEGFA	39
1.6. Características e expressão do gene GAPDH	40
1.7. Características e expressão do gene HK1	40
1.8. Características e expressão do gene NDUFA3	41
1.9. Características e expressão do gene PFKM	41
1.10. Características e expressão do gene SLC2A1	42
1.11 Características e expressão do gene TAZ	43
1.12 Características e expressão do gene UCP2	43
2 OBJETIVOS	47
2.1 Geral.....	47
2.2 Específicos	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Modelo animal e desenho do estudo	48
3.1.2 Protocolo grupo Controle	49
3.1.3 Protocolo grupo Etanol	50
3.2 Análise da expressão gênica	52
3.2.1 Coleta dos materiais biológicos	52
3.2.2 Biomarcadores	52
3.2.3 Procedimentos – PCR “Array”	53
a. Extração do DNA	53
b. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras	54
c. Síntese de cDNA – Transcrição reversa	54
d. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR	55
3.3 Análise estatística	56
4. RESULTADOS	57
5.1. Expressão de RNAm de Proteína quinase serina/treonina 1 (Akt1)	58
5.2. Análise de expressão de RNAm de Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFa)	59
5.3. Expressão de RNA mensageiro (RNAm) de Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	60

5.4. Expressão de RNAm de Hexoquinase 1 (Hk1)	62
5.5. Análise da expressão de RNAm de Subunidade 3 do complexo alfa da NADH desidrogenase (Ndufa3)	63
5.6. Expressão de RNAm de Fosfofrutoquinase (PfkM)	64
5.7. Expressão de RNAm de Transpostador de glicose 1 (Slc2a1)	66
5.8. Expressão de RNAm de Tafazina (Taz)	67
5.9. Expressão de RNAm de Proteína desacopladora 2 (Ucp2)	69
5. DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

O etanol (EtOH) pertence a uma classe de compostos orgânicos que possuem uma estrutura de grupos hidroxila ligados ao carbono saturado e sua fórmula química é o C_2H_6O (CH_3CH_2OH). O etanol é obtido pelo processo de fermentação de açúcares que procedem de frutas ou sementes pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O álcool possui densidade absoluta, com padrão de pureza de 99,5% e é considerada a mais antiga substância estimulante utilizada pelo homem [1,2].

Em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou dados referentes ao ano de 2016, onde estipulou que 43% da população mundial em idades acima de 15 anos possam ter ingerido bebida alcoólicas nos últimos 12 meses (consumidores ou bebedores atuais), totalizando um consumo médio *per capita* de 6,4 L de álcool puro (**Figura 1**). No Brasil, o consumo *per capita* foi de 7,8 L, ficando abaixo da média americana de (8 L), mas ainda assim superando a média global [3,4]. Segundo pesquisa do DATASUS, o consumo exagerado de álcool por mulheres aumentou entre os anos de 2006 e 2018, com alta de 7,7 para 11%. O consumo de álcool prolongado (crônico) ou de maneira esporádica (agudo) pode contribuir para o surgimento de condições fisiopatológicas sérias que podem afetar redes de órgãos como coração, fígado entre outros [5].

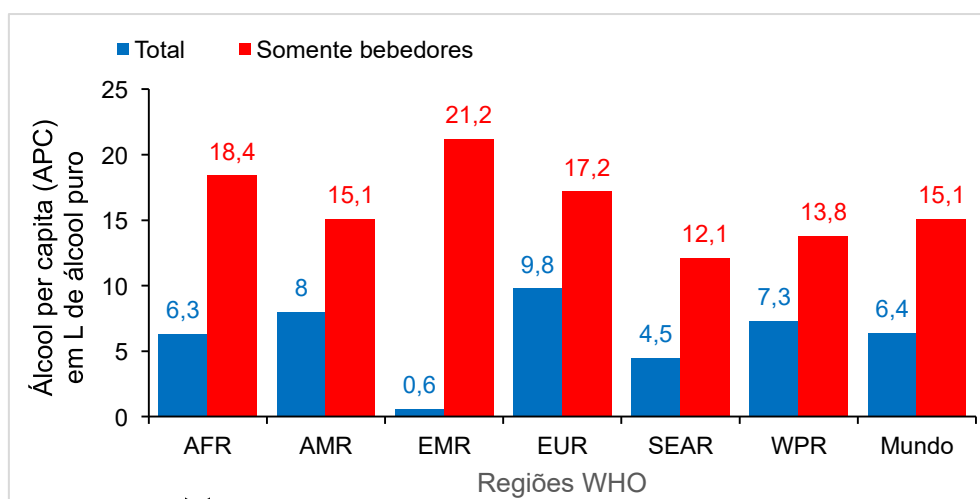


Figura 1. Consumo total de álcool *per capita* (APC) por região WHO (mais de 15 anos; em litros de álcool puro), 2016. Adaptado de WHO, 2018. AFR – África; AMR – Américas; EMR – Mediterrâneo oriental; EUR – Europa; SEAR – Sudeste asiático; WPR – Pacífico ocidental.

O álcool age de maneira diferente em cada pessoa e depende da interação com fatores do ambiente e genética, principalmente se relacionado ao

período de desenvolvimento gestacional [6,8]. Por ser uma molécula hidrossolúvel e por apresentar um baixo peso molecular [11,12], sua absorção é facilitada no estômago e no intestino delgado. O estômago absorve rapidamente 20% de todo volume consumido, com exceção da ingesta em conjunto com alimentos que fazem reduzir a absorção. O intestino delgado pode absorver até 80% independente da ingestão de alimentos, tornando o principal órgão responsável pela absorção do álcool [2,13]. Depois de 90% de absorção, o álcool consumido migra para o fígado por meio do sistema circulatório, onde será metabolizado por meio da via oxidativa ou não oxidativa (pouco ativada). O restante é expelido pelos pulmões, urina e suor [14].

Dentro da via oxidativa (**Figura 2**), que é a principal via desse metabolismo, o álcool é oxidado em acetaldeído devido à ação das álcool desidrogenases (ADH) e também pela forma oxidada da dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD⁺), da via da fosforilação oxidativa [2,5,15]. Em elevadas concentrações de álcool no corpo, ou quando a ingestão é crônica, as enzimas ADH são incapazes de metabolizar sozinhas toda concentração de álcool ingerida e neste caso ativam duas vias como alternativas. A primeira via a ser ativada é o sistema de enzimas microssomais oxidativas (MEOS) no retículo endoplasmático liso (REL) das células hepáticas (hepatócitos). [2,12,16,17]. O citocromo P450 IIE1 (CYP^{2E1}) ativado converterá o EtOH em acetaldeído utilizando moléculas de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamidaadenina hidrogenado (NADPH) e O₂ com gasto de ATP (**Figura 2**) [2,12]. A via das catalases nos peroxissomos é outra via de metabolização que efetua a conversão do álcool em acetaldeído [18].

Desta forma, após a ação das aldeído desidrogenases (ADLH) nas mitocôndrias [2,12] o acetaldeído é convertido em acetato, propiciando sua conversão em acetil coenzima A (Acetil-CoA) por meio das enzimas como AcilCoA sintetase, sendo disponibilizado para todo o organismo via sistema circulatório, podendo ser utilizado como combustível pelas células ou como eixo para moléculas funcionais ao associar-se ao ciclo de Krebs, resultando em dióxido de carbono (CO₂) e H₂O [2].

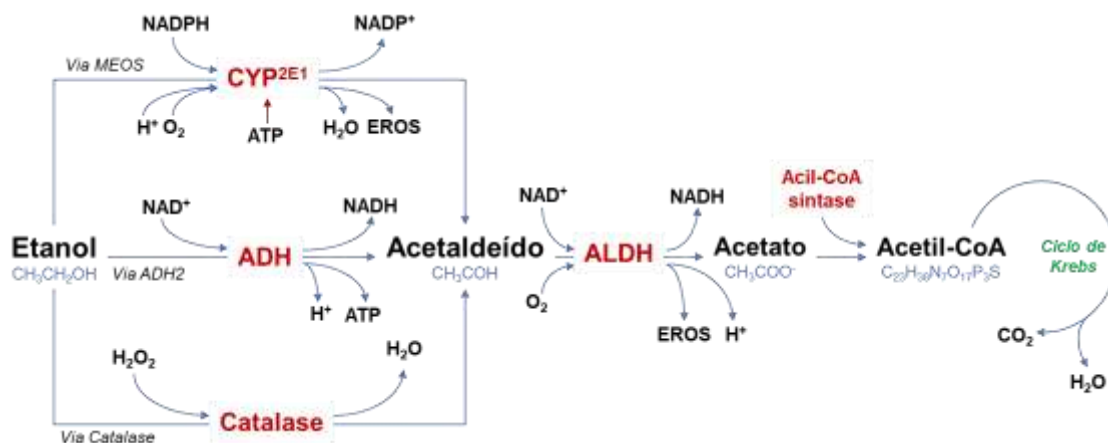


Figura 2. Esquema das 3 vias oxidativas do metabolismo alcoólico. Via principal (ADH2) e as vias complementares ativadas pelo consumo crônico ou excessivo de etanol (via MEOS e catalase). MEOS – Sistema de enzimas microsossomais oxidativas; NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado; NADP⁺ – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina; CYP^{2E1} – 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; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; H₂O – hidróxido de hidrogênio; Acetil-CoA – Acetil coenzima A; H⁺ – hídrion (cátion de hidrogênio); O₂ – Oxigênio; CO₂ – dióxido de carbono. (Adaptado de Atum 2020).

Estas vias podem impedir o metabolismo de ácidos graxos e a síntese de proteínas, além de aumentar a peroxidação lipídica e a formação de EROs [2,12,17,18]. Outro aspecto a se considerar é que mulheres possuem uma produção menor concentração 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, dado como o processo fisiológico mais importante do desenvolvimento humano [19,22]. Na morfogênese, ocorrem diversas mudanças essenciais para o crescimento e desenvolvimento das células e sistemas, com isso as células podem sofrer alterações tanto em forma, tamanho, posição, número e aderência [20,23,25].

É importante salientar sobre a dificuldade de classificar a intensidade da exposição alcoólica pré-natal (EPA) sua força de interação ou até mesmo se existe uma dose segura, pois depende de uma gama de fatores, como tempo de exposição, nível de exposição e o estado nutricional no qual a gestante se encontra [6,8,24,27]. Sabe-se que em torno de 2% do EtOH ingerido pela

gestante durante o período de amamentação é passado de mãe para filho e esse percentual é suficiente para interferir no desenvolvimento neuromotor, ciclo circadiano e processo de aprendizagem [28,31], tornando-o principal fator teratogênico que causa defeitos congênitos evitáveis [8,32,35]. O consumo alcoólico gestacional pode favorecer diversas modificações moleculares, fisiológicas e comportamentais que podem ser irreversíveis [36,38] podendo ocorrer morte celular, atrelada possivelmente, a um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade das células do feto de combater com antioxidantes endógenos [8,23,33,39].

Um fator agravante é relatado em estudos que indicam que mulheres grávidas em condições de baixa renda são mais vulneráveis ao consumo de substâncias teratogênicas como drogas ilícitas e álcool [21,22,40,41]. Além de mulheres com idade superior a 30 anos terem maior probabilidade de desenvolverem problemas gestacionais no feto ao ingerirem álcool durante a gravidez [44], cresce o risco de desenvolver teratogênias ou defeitos do nascimento (DNs) [3,42,43,45].

Descrita como importante causa de mortalidade durante as primeiras quatro semanas de vida em neonatos no mundo, os DNs somam cerca de 303 mil casos por ano [3,42,43,45]. No Brasil, o número de óbitos chega a ser considerado a segunda maior causa de morte infantil (11,2%) e representa 37% das admissões pediátricas hospitalares [3,45,48]. Estudos atuais demonstram que defeitos congênitos no sistema cardiovascular e circulatório foram os responsáveis por tais óbitos no Brasil [47,49] mostrado segundo pesquisa do DATASUS [48] 19.386 casos, entre 2008 e 2017 (**Tabela 1**).

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

Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC 10/2019.

NCOP – Não Classificados (as) em Outra Patologia – Classificação CID10.

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

Com base nos casos acima descritos, muitas alterações fisiopatológicas podem estar ligadas ao consumo de álcool. Esse consumo, mesmo que seja de baixo a moderado, tem crescido entre as gestantes anualmente [3,50]. Vários estudos no Brasil apresentam uma estimativa deste consumo que varia de 10 a 40% de todas as participantes [16,51,55]. No entanto, há evidências que tais estimativas podem ser maiores devido à dificuldade de cada mulher gestante em tratar do assunto que pode também estar relacionado com a ingestão de outras drogas [3,44,50,55,57].

1.1 Diferenças no gênero e doença cardíaca

As doenças cardíacas manifestam-se e desenvolvem de 7 a 10 anos mais tarde em mulheres do que em homens e é a principal causa de morte em mulheres [58]. O risco de desenvolver doenças cardiovasculares ainda é frequentemente ignorado devido a falsa percepção de que as mulheres são menos suscetíveis a doenças cardíacas. A falta de importância com que tem tratado o assunto e as diferenças clínicas que são apresentadas em mulheres levam a estratégias de manejo clínico menos efetivas e uma taxa reduzida no percentual de mulheres em ensaios clínicos [58]. Além do mais, é necessário que haja um maior autoconhecimento e identificação dos fatores que levam ao risco

de desenvolver doenças cardíacas, o que resulta em uma melhor prevenção de eventos cardiovasculares [58].

Perrino *et al.* (2020), em estudos pré-clínicos e epidemiológicos, sugerem que a suscetibilidade à Doença Isquêmica do Coração (DIC) pode ser o resultado da programação fetal por meio da limitação do número final de células no coração, densidade de vasos reduzida e por modificação epigenética da expressão gênica. Os dimorfismos sexuais podem ser devidos à diferenças hormonais fetais e outras diferenças menos bem caracterizadas [59].

No estudo de Grant *et al* (2020), as diferenças relacionadas ao sexo nas doenças cardiovasculares são atribuídas principalmente aos hormônios sexuais masculinos e femininos. Tradicionalmente, acredita-se que o estrogênio forneça um efeito protetor, enquanto a testosterona tem um efeito cardiovascular prejudicial. No entanto, essa hipótese, que tem oferecido base biológica para várias doenças cardiovasculares que são mais prevalentes e mais graves em homens, não poderia explicar outras observações clínicas e pré-clínicas. O pior prognóstico de mulheres pós-menopáusicas recebendo terapia suplementar de estrogênio atribuída principalmente ao aumento da taxa de eventos tromboembólicos, e piora da insuficiência cardíaca em animais experimentais machos castrados, o que sugere um papel cardioprotetor dos androgênios. Além dos hormônios sexuais, estudos sugerem que diferenças inerentes nos genes dos cromossomos sexuais podem auxiliar para diferenças sexuais em doenças cardiovasculares. Esses achados sugerem fortemente que o dimorfismo sexual em doenças cardiovasculares é altamente complexo em humanos e, portanto, é de suma importância que se faça investigações em modelos animais experimentais [60].

Holzhauer *et al* (2020) relataram que o álcool gera mais efeitos negativos sobre a saúde das mulheres do que dos homens, mesmo em níveis mais baixos de exposição ao álcool ajustados pelo peso, em parte devido às diferenças de gênero na farmacocinética do álcool. Como as mulheres normalmente têm menos água corporal total e maior gordura corporal total, o álcool está mais concentrado do que nos homens, criando um maior teor de álcool no sangue em doses e pesos semelhantes. Mulheres com disfunções do uso de álcool (AUD em inglês) também têm maior probabilidade de desenvolver doenças cardíacas,

câncer e doenças hepáticas relacionadas ao álcool, e mais atrofia cerebral geral secundária ao consumo crônico de álcool [61].

Com avanço da idade, segundo estudo de Fazal, *et al* (2014), o número de células cardíacas tem redução importante nos homens por meio de diferentes processos, incluindo apoptose e necrose, enquanto o número e o tamanho dos cardiomiócitos são preservados em mulheres da mesma idade. Em cardiomiócitos, várias características bioquímicas como a atividade da telomerase variam de maneira diferente em homens e mulheres ao longo da vida. A telomerase é uma enzima que repara a repetição telomérica de DNA perdida durante o ciclo celular, restaurando assim o comprimento dos telômeros. A manutenção do telômero é um mecanismo pelo qual a viabilidade celular é preservada, e o encurtamento do telômero ocorre no estágio final da insuficiência cardíaca. Em humanos, a atividade da telomerase é detectável nos cardiomiócitos de adultos jovens e diminui com o envelhecimento nos homens, enquanto aumenta acentuadamente nas mulheres. Esses dados enfatizam uma diferença de gênero na viabilidade e replicação dos cardiomiócitos [62].

O consumo de álcool por homens e mulheres por diversas vezes têm sido associado a um risco aumentado para o desenvolvimento da hipertensão, fibrilação atrial, e acidente vascular cerebral. As relações entre o consumo excessivo de álcool crônico e as doenças cardíacas coronárias (DCC) têm sido menos consistentes. Alguns estudos mostraram que beber já foi um fator de risco tanto para mulheres quanto para homens, enquanto outros estudos não demonstram tais conexões [63]. Deste modo, nosso estudo busca encontrar as diferenças moleculares iniciais que possam contribuir para disfunções no miocárdio.

1.2 Alterações cardíacas e exposição pré-natal ao álcool

As alterações no sistema cardíaco derivadas da exposição pré-natal ao álcool podem ser divididas em alterações diretas, que surgem na estrutura e na formação de células cardíacas e indiretas, que estão ligadas aos mecanismos e substâncias importantes na funcionalidade do sistema cardiovascular. Cinquenta por cento dos indivíduos nascidos com Síndrome do Álcool Fetal (FAS) apresentam cardiopatias congênitas, enquanto que nascidos com os Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) esta proporção cai para 38%. Os defeitos

variam entre alterações no septo atrial ou ventricular, malformação aórtica e valvares, baixo peso cardíaco e atrofia [64,65,66,67]. Essas alterações evoluem para casos mais graves ao longo da vida do indivíduo, podendo até mesmo levar ao óbito. Outros estudos apontam que 80% das crianças que nascem com FASD não apresentam sinais físicos evidentes, gerando uma dificuldade no diagnóstico das cardiopatias mais superficiais. [68].

O álcool pode interferir no processo de acoplamento de contração por excitação (E-C), agindo nos níveis de cálcio no citosol das células contráteis, além de reduzir sua sensibilidade a este cátion [5]. 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 [69].

De forma indireta o álcool pode ter ação em moléculas responsáveis por modular a função cardíaca, sendo o caso da epinefrina, dopamina e noradrenalina. O álcool causa redução da síntese proteica miofibrilar, prejudicando sua função fisiológica. Em ratos, foi verificada diminuição na quantidade de miócitos e aumento do tamanho do ventrículo esquerdo [5]. Camundongos expostos ao EPA apresentam alterações ventriculares, parede mais fina, assim como defeitos válvulas cardíacas [70,71], assim como elevação na pressão arterial, resultado de função renal e vascular em desequilíbrio [71,72].

Yuan et al (2015) mostraram que ocorre declínio na expressão das proteínas SOD1, UCP2 e PCGa, que são de extrema importância para função dos cardiomiócitos após serem expostos ao EPA em camundongos com dieta hiperlipídica [73]. Este dado permitiu compreender que a exposição pré-natal ao álcool gera um ambiente repleto de estresse oxidativo no sistema cardiovascular desde o princípio de sua formação. Esse ambiente alterado pode gerar modificações no coração de várias maneiras, por exemplo em fibroblastos, células sensíveis aos estímulos nocivos [74] e formadores de matriz extracelular (MEC) cardíaca importantes na fixação e organização dos cardiomiócitos [75,76], no controle da proliferação, migração e diferenciação celular [77]. Quando o

fibroblasto é estimulado pelo agente nocivo, ele modifica os compostos da MEC, como colágeno e fibronectina, que fazem parte da regulação do desenvolvimento de cardiomiócitos. Os cardiomiócitos, por sua vez, se diferenciam em miofibroblastos e expressam actina do músculo liso α (Acta2), aumentando a secreção de colágeno [78]. No estudo de Ninh et al (2019) utilizando cultura de células cardíacas de camundongos expostos ao álcool pré-natal nos dias (6,75 e 7,25) de gestação, foi observada diminuição da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de Col1a1 e aumento de mRNA Col3a1. Além disso foram observadas redução da expressão proteica de Col1a1 e elevação de Col3a1 no tecido cardíaco [65].

Prioste et al (2003) mostraram que o uso de EtOH (aguardente da canade-açúcar) em seres humanos apresentou modificações epigenéticas no ciclo metionina-homocisteína pela redução da absorção de folato ocasionado pela necessidade de vitamina B6, sendo esta importantíssima para este ciclo [79]. A metionina (MET) é um aminoácido essencial, convertida no organismo para Sadenosilmetionina (AdoMet) via metionina-adenosiltransferase (MAT), sendo posteriormente hidrolisada em homocisteína (Hcv) e adenosina [80]. No entanto quando é observado um desequilíbrio na cadeia metionina-homocisteína, há elevação da homocisteína no organismo (hiper-homocisteinemia), sendo fator de risco para doenças cardiovasculares como, aterosclerose, trombose, e lesões nos vasos que podem provocar obstruções e rompimentos, causando isquemia. [81,82,83].

Os estudos disponíveis na literatura médico-científica relacionados à FASD e doenças cardiovasculares são, em sua maioria, focados no período de desenvolvimento do coração. O desenvolvimento do coração se inicia a partir do sétimo dia de gestação, acompanhado da diferenciação e migração de células progenitoras. O consumo de álcool neste período é um fator agravante para transformações genéticas e estruturais [65].

Turcotte *et al.* 2002 estudaram a exposição pré-natal ao álcool de maneira crônica e observaram (6,36% v/v) aumento na pressão arterial média (PAM) e redução do relaxamento dependente do endotélio aórtico em ratos de 25 semanas de idade [72]. Outro estudo, usando PAE 6% v/v álcool, apontou evidências de hipertrofia ventricular esquerda e fibrose cardíaca em prole de

ratos de ambos os sexos com idade de 8 meses [84]. Walton *et al.* (2019) mostraram que a exposição baixo-crônica ao álcool durante o período gestacional está ligada à pressão arterial reduzida e à resposta pressora atenuada ao estresse prole de fêmeas. No entanto, este fato não foi observado em machos após 1 ano de vida que equivale à meia idade humana. [85]

1.3 Biomarcadores

O genoma é 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. A rede de complexas reações bioquímicas denominada expressão do genoma, ou transcriptoma, é usada para designar o conjunto de moléculas de RNA derivadas desses genes codificadores de proteínas. [86,87]

Inicialmente, o termo transcriptoma compreendia somente o conjunto de moléculas de RNA, denominadas RNAs mensageiros (mRNAs), sintetizadas a partir da transcrição do DNA, correspondendo a menos de 4% do RNA total de uma célula [88]. 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) [87,89].

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, são denominados como características que podem ser medidas experimentalmente e indicam a ocorrência de determinada função normal ou patológica em um organismo ou resultado de uma intervenção terapêutica [90]. Os biomarcadores possuem potencial para estimar estados de doença, compreender alterações ou mau funcionamento nos processos fisiológicos, orientando pesquisas que contribuam para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes, com menor efeito colateral e não-invasivas.[90,91]. A seguir, detalharemos as características dos genes analisados neste estudo:

1.4. Características e expressão do gene AKT

O gene AKT -Serine /Threonine kinase I possui uma localização genômica no cromossomo 14q32.33, sendo uma serina/treonina quinase envolvida na regulação dos sinais de sobrevivência celular. A AKT é expressa em linfócitos T

e B, sendo ativada em resposta à estimulação de citocinas e receptores de antígenos. São conhecidas três isoformas de AKT identificadas como AKT-1, AKT-2 e AKT-3, sendo responsáveis pela regulação de diversos processos que incluem metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese. A expressão de AKT é ubíqua, especialmente no Fígado, Músculo, Sistema nervoso, Glândula adrenal, Pulmão, Pele, Pâncreas, Intestino, Coração, Olho, Sangue, Rim, Linfonodo, Medula óssea, Baço, Estômago, Glândula tireóide, Osso, Vesícula biliar e Urina. Este gene é superexpresso no útero [92,93].

Bozi (2015) verificou a ação do gene AKT como um agente cardioprotetor, durante o estresse do retículo endoplasmático (RE) pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas, sendo capaz de reduzir a função cardíaca e instalação da insuficiência cardíaca. Embora o mecanismo responsável pela disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE seja pouco conhecido, evidências sugerem que a inibição da via de sinalização PI3/AKT pela proteína JNK podendo estar envolvida nessa resposta. Zhang *et al.* (2011) evidenciaram que a inibição da quinase AKT (*Protein Kinase B*) pelo estresse do RE pode alterar a contratilidade de cardiomiócitos, assim como verificaram que a disfunção contrátil e as alterações dinâmicas do Ca^{+2} induzidas pelo estresse do RE não foram observadas nos cardiomiócitos que expressavam uma forma ativa de AKT [94,95].

1.5. Características e expressão do gene VEGFA

O gene VEGFA - fator de crescimento endotelial vascular A (ou VEGF-165) possui localização genômica no cromossomo 6p21.3. Este gene opera por meio dos receptores de VEGFR-1 e VEGFR-2 expressos predominantemente no endotélio vascular, causando alterações na divisão e migração celular e influxo citoplasmático de cálcio, o que faz com que sua concentração aumente em até quatro vezes. O aumento da permeabilidade venosa para macromoléculas permite que as proteínas plasmáticas se espalhem por todo espaço vascular, resultando em coagulação do fibrinogênio e deposição do gel de fibrina, que funciona como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos. A maior permeabilidade microvascular está relacionada à angiogênese em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, o que evidencia que o gene

VEGF possa ser um importante mediador da angiogênese. O VEGF atua na cicatrização de lesões, no ciclo reprodutor feminino, no processo de degeneração muscular, retinopatia diabética em isquemia do miocárdio, entre outros. Sua expressão de mRNA se dá em tecidos humanos como: Sistema musculoesquelético, Sistema nervoso e Pulmões, Sistema Cardiovascular, sendo superexpresso na tireoide e vesícula biliar. As isoformas VEGF189, VEGF165 e VEGF121 são amplamente expressas. Entretanto, as isoformas VEGF206 e VEGF145 são menos expressas.[96]

Kalil *et al.* (2010) avaliaram a segurança, viabilidade e a perfusão miocárdica após administração intramiocárdica, transtorácica de VEGF 165 plasmidial em pacientes com doença arterial coronariana avançada e angina refratária, não passíveis de revascularização percutânea e cirúrgica. Utilizando como metodologia o ensaio clínico fase I/II com treze pacientes cardiopatas isquêmicos com angina refratária submetidos à injeções intramiocárdicas de 2000µg VEGF 165 plasmidial, os autores observaram que não houve óbitos nem diferenças em cintilografias miocárdicas, em testes ergométricos e questionários de qualidade de vida. A terapia com o gene VEGF demonstrou-se segura e viável nestes pacientes e os resultados iniciais tendem a demonstrar melhora na gravidade da angina e redução da intensidade da isquemia miocárdica [96,97].

1.6. Características e expressão do gene GAPDH

O gene GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase possui localização genômica no cromossomo 12p13.31. Esse gene possui atividades gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase e nitrosilase, desempenhando papel importante na glicólise e nas funções nucleares que incluem transcrição, transporte de RNA, replicação de DNA e apoptose. O GAPDH catalisa a primeira etapa da via convertendo D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 3-fosfato-D glicerol fosfato, componente do complexo GAIT (Inibe tradução ativado por interferon gama) que medeia a inibição da tradução seletiva do transcrito induzida pelo interferon gama nos processos inflamatórios. A expressão de GAPDH pode estar aumentada no músculo de mamíferos diabéticos, em tecidos afetados de pacientes com Alzheimer, cirrose hepática alcoólica ou em cultura de células durante necrose. O GAPDH é considerado sensor de estresse celular intra- e extracelular com capacidade de ativar vias para se recuperar do insulto ou ativar via apoptótica. Quando expressa a níveis aumentados, essa enzima está

envolvida em diversas doenças e condições neurodegenerativas, sendo superexpresso em músculo esquelético. O GAPDH, apresenta estabilidade de expressão de RNAm como gene de referência no ventrículo cardíaco esquerdo de ratos que foram submetidos à hipóxia intermitente crônica. [98,99]

1.7. Características e expressão do gene HK1

O gene HK1 (Hexoquinase 1) possui localização genômica no cromossomo 10q22.1, estando relacionado com o metabolismo da glicose e galactose. A HK1 catalisa a primeira etapa essencial do metabolismo da glicose com a conversão do substrato glicose em glicose-6 fosfato. Este evento de fosforilação acopla diretamente a glicose extramitocondrial à fosforilação oxidativa intramitocondrial (Cavalcante, 2014). Este gene é superexpresso no cérebro córtex frontal e retina, coração, pele, pulmão entre outros. [100]

De acordo com (Waskova *et al.*, 2015), a hexoquinase possui alta capacidade de extinguir a formação de espécies reativas de oxigênio, devido a sua associação com as mitocôndrias, impossibilitando a abertura dos poros de transição de permeabilidade da membrana e prevenindo a morte celular. Waskova *et al.*, demonstraram que a expressão elevada de isoformas HK1 e HK2 no ventrículo esquerdo hipóxico aumentou a atividade de HK total, contribuindo para um fenótipo cardioprotetor [101,102].

1.8. Características e expressão do gene NDUFA3

O gene da Ubiquinona oxidoredutase subunidade A3, conhecido por NDUFA3, possui localização genômica no cromossomo 19q13.42, sendo uma proteína NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexa subunidade alfa 3. É expressa na próstata, região auricular do átrio direito, amígdala, ápice do coração, entre outros. Quanto à sua função, é uma subunidade de cadeia respiratória da membrana mitocondrial NADH desidrogenase (complexo I). O complexo I funciona na transferência de elétrons de NADH para cadeia respiratória e acredita-se que o receptor de elétrons imediato da enzima seja a ubiquinona.

Segundo Parreira (2018), o estresse oxidativo é intimamente ligado ao processo de hipertrofia cardíaca e a geração de radicais livres. Na hipertrofia induzida por isoproterenol foi comprovada que a ativação de MAPK14 está relacionada com a regulação negativa de PGAM1 (fosfoglicerato mutase 1), NDUFA3 e NDUFA11, indicando que o metabolismo energético é alterado no modelo. Pouco se sabe da relação de NDUFA3 e o coração [103,104].

1.9. Características e expressão do gene PFKM

O gene PFKM, denominado fosfofrutoquinase muscular, possui localização cromossômica 12q13.11, sendo expresso no ventrículo esquerdo, vasto lateral, tecido muscular, esquelético, deltoide, coração, ventrículo direito, tríceps braquial, córtex cerebral, miocárdio entre outros. Existem três isoenzimas fosfofrutoquinase em humanos e funcionam como subunidades da tetrâmero fosfofrutoquinase de mamíferos. A PFKM catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose -1-6- bifosfato. Entre suas vias relacionadas estão o metabolismo da glicose e sinalização de AKT. É um gene superexpresso em músculo esquelético e no coração.

Conforme Garcia *et al.* (2009), as mutações no gene da fosfofrutoquinase muscular (PFKM), uma enzima regulatória chave da glicólise, causam doença de armazenamento de glicogênio Tipo VII (GSDVII). As manifestações clínicas da doença vão desde a forma grave, levando à morte na infância, até a forma clássica, que se apresenta principalmente com intolerância ao exercício. Camundongos nocautes para PFKM apresentaram alta letalidade no desmame e redução da expectativa de vida, devido às alterações metabólicas e desenvolveram hipertrofia cardíaca com a progressão de idade. Em conjunto, essas alterações resultaram em hipóxia e hipervascularização muscular, comprometimento do metabolismo oxidativo, necrose de fibras e intolerância ao exercício [105,106].

1.10. Características e expressão do gene SLC2A1

O gene SLC2A1 - Proteína GLUT1 (transportador de glicose tipo 1) possui localização genômica no cromossomo 1p34.2 [107] A GLUT1 facilita o transporte de glicose, captação constitutiva ou basal de glicose e tem ampla especificidade de substrato muito grande (Santos, 2017), podendo transportar uma variedade

ampla de aldoses, incluindo pentoses e hexoses. É a molécula transportadora de energia mais importante do cérebro, presente na barreira hematoencefálica e garante o transporte da energia da glicose para o cérebro. Sua expressão é localizada no cérebro e córtex cerebral, superexpresso no nervo tibial, epitélio nasal, retina e placenta [107,108,109].

Brunetto (2011) relatou que os hormônios tireoidianos (HTs) participam do controle de funções essenciais do organismo relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo. Por meio das ações nucleares, eles controlam as expressões de vários genes cardíacos, como o SLC2A1. A Síndrome de Fanconi-Bickel (caracterizada por hepatomegalia, intolerância à glicose e à galactose e disfunção renal tubular) é secundária a uma mutação recessiva do gene SLC2A2 que codifica a GLUT 2 (Sperling, 2008). A GLUT 2 é expressa no fígado, células tubulares renais, enterócitos e células β -pancreáticas. As manifestações clínicas refletem a incapacidade de liberação da glicose do fígado e da reabsorção de glicose pelas células tubulares renais. [110,111].

1.11 Características e expressão do gene TAZ

O gene TAZ – tafazina; tafazzin, proteína G45 possui uma localização genômica no cromossomo Xq28 e codifica uma proteína que é superexpressa nos músculos cardíaco e esquelético. Os distúrbios clínicos associados à mutações neste gene são síndrome de Barth, cardiomiopatia dilatada (DCM, DCM hipertrófica, fibroelastose endocárdica e ventricular esquerda não compactada (LVNC) entre suas vias relacionadas estão metabolismo e metabolismo de proteínas. Como função molecular, algumas isoformas podem estar envolvidas no metabolismo da cardiolipina (CL) [112,113].

Borkar et al. (2015), em estudo de caso, verificaram que as mutações no gene tafazzina (TAZ) são responsáveis pelo fenótipo da síndrome de Barth (BTHS), resultando em uma perda de função da proteína tafazzina envolvida na transacilação da cardiolipina, um fosfolípido mitocondrial essencial.[113] O gene TAZ foi investigado em probando que faleceu de cardiomiopatia dilatada aos 8 meses de idade. A família passou por análise de sequenciamento de DNA para identificar a causa genética da BTHS. Após análise molecular, foi verificada nova

mutação no exon 5 (c.520T> G) do Gene TAZ. Esta nova mutação c.520T> G, pW174G foi encontrada em portadoras do sexo feminino na família (mãe e avó do probando). Após análise de Bioinformática, foi verificado efeito deletério no miocárdio causado por única mutação na estrutura da proteína TAZ [112,113].

1.12 Características e expressão do gene UCP2

O gene UCP2 - proteína desacopladora 2 (proteína de desacoplamento mitocondrial 2) possui localização cromossômica 11q.13.4. As UCPs são proteínas transportadoras mitocondriais que criam vazamento de prótons por meio da membrana mitocondrial interna desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e o resultado é energia dissipada na forma de calor. A UCP2 é altamente expressa no tecido adiposo e músculo, e está envolvida na regulação do metabolismo energético, apresentando expressão reduzida no músculo esquelético de obesos, regulada por receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa e gama (PPARA e PPARG, respectivamente) em camundongos.

No estudo de Palmer *et al.* (2009), pacientes diabéticos com genótipos GA/AA do polimorfismo -866G/A do gene da UCP2 apresentaram menor sobrevida após infarto do miocárdio e maior nível de mieloperoxidase (MPO). [114]. De acordo com (Teshima *et al.*, 2003), a superexpressão de UCP2 diminui a intensidade e atividade das espécies reativas de oxigênio, evitando que haja sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, sendo assim um mecanismo de cardioproteção importante [115]. Ruiz *et al.* 2016, observaram que no coração de roedores e humanos com obesidade, as UCP2 e UCP3 podem proteger os cardiomiócitos da morte e da progressão de insuficiência cardíaca, regulando de forma negativa a apoptose [116]. Segundo Cadenas 2018, as UCP2 e UCP3 podem ter papel protetor contra os danos oxidativos, diminuindo a produção de superóxido mitocondrial, resultando em efeitos cardioprotetores, enfraquecendo o dano oxidativo e a morte celular em cardiomiócitos e limitando o tamanho do infarto após isquemia-reperfusão (IR) em corações perfundidos isolados e *in vivo* [117].

Figura 3. Quadro dos genes selecionados para o respectivo estudo e resumo de suas funções. [92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117]

AKT1 (Serina/treonina quinase I)	Está envolvida na regulação dos sinais de sobrevivência celular. São conhecidas três isoformas de AKT identificadas como AKT1, AKT-2 e AKT-3, sendo responsáveis pela regulação de diversos processos que incluem metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese.
VEGFA (Fator de crescimento Endotelial Vascular A)	Angiogênese, proliferação e migração de células endoteliais. Este gene opera por meio dos receptores de VEGFR-1 e VEGFR2 expressos predominantemente no endotélio vascular, causando alterações na divisão e migração celular e influxo citoplasmático de cálcio, o que faz com que sua concentração aumente em até quatro vezes.
GAPDH – (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)	Importante na glicólise e nas funções nucleares que incluem transcrição, transporte de RNA, replicação de DNA e apoptose. O GAPDH catalisa a primeira etapa da via convertendo Dgliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 3-fosfato-D gliceroil fosfato.
HK1 (Hexoquinase 1)	Metabolismo da glicose e galactose. A HK1 catalisa a primeira etapa essencial do metabolismo da glicose com a conversão do substrato glicose em glicose-6 fosfato.
NDUFA3 (Ubiquinona oxidoreductase subunidade A3)	Subunidade de cadeia respiratória da membrana mitocondrial NADH desidrogenase (complexo I). O complexo I funciona na transferência de elétrons de NADH para cadeia respiratória e acredita-se que o receptor de elétrons imediato da enzima seja a ubiquinona.
PFKM, (Fosfofrutoquinase muscular)	Catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose -1-6-bifosfato. Entre suas vias relacionadas estão o metabolismo da glicose e sinalização de AKT. É um gene superexpresso em músculo esquelético e no coração.
SLC2A1 - Proteína GLUT1 (transportador de glicose tipo 1)	transporte de glicose, captação constitutiva ou basal de glicose e tem ampla especificidade de substrato muito grande.
TAZ – (Tafazina)	Algumas isoformas podem estar envolvidas no metabolismo da cardiolipina (CL).

UCP2 – (Proteína desacopladora 2)	As UCPs são proteínas transportadoras mitocondriais que criam vazamento de prótons por meio da membrana mitocondrial interna desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e o resultado é energia dissipada na forma de calor.
--	---

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo e sobrevivência celular do miocárdio de camundongos machos e fêmeas adultos submetidos à exposição ao álcool.

2.2 Específicos

- a. Verificar a expressão de RNAm de GAPDH, AKT1, VEGFA, HK1, NDUFA3, PFKM SLCA1, TAZ e UCP-2;
- b. Comparar diferenças na expressão desses genes em machos e fêmeas expostos ao EPA

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal e desenho do estudo

Para obtenção da prole de camundongos machos e fêmeas adultos, objeto de estudo deste projeto, foram utilizados 20 camundongos isogênicos (15 fêmeas e 5 machos) da linhagem C57Bl/6. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa foram utilizados 11 camundongos fêmeas com 49 dias de vida e com peso de 18 (\pm 3) gramas e 3 machos com mesma idade e pesos de 20 (\pm 2) gramas. Na segunda etapa foram utilizados 4 camundongos fêmeas com 88 dias de vida e peso de 20 (\pm 2) gramas e 2 machos com mesma idade e peso de 23 (\pm 3) gramas (**Figura 4**).

Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Nove de Julho, Campus Vergueiro, e foram mantidos em mesmo local, confinados em caixas plásticas apropriadas com maravalha, ciclo de luz (ciclo claro/ escuro de 12h/ 12h) e temperatura (21 ± 2 °C) e umidade controlados, bem como alimentação e água *ad libitum* [118,119,120,121,122]. Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 8ª Ed., 2011)” contando com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/ UNINOVE) sob número CEUA nº 9355120319 (ID 000115) de 19/03/2019.

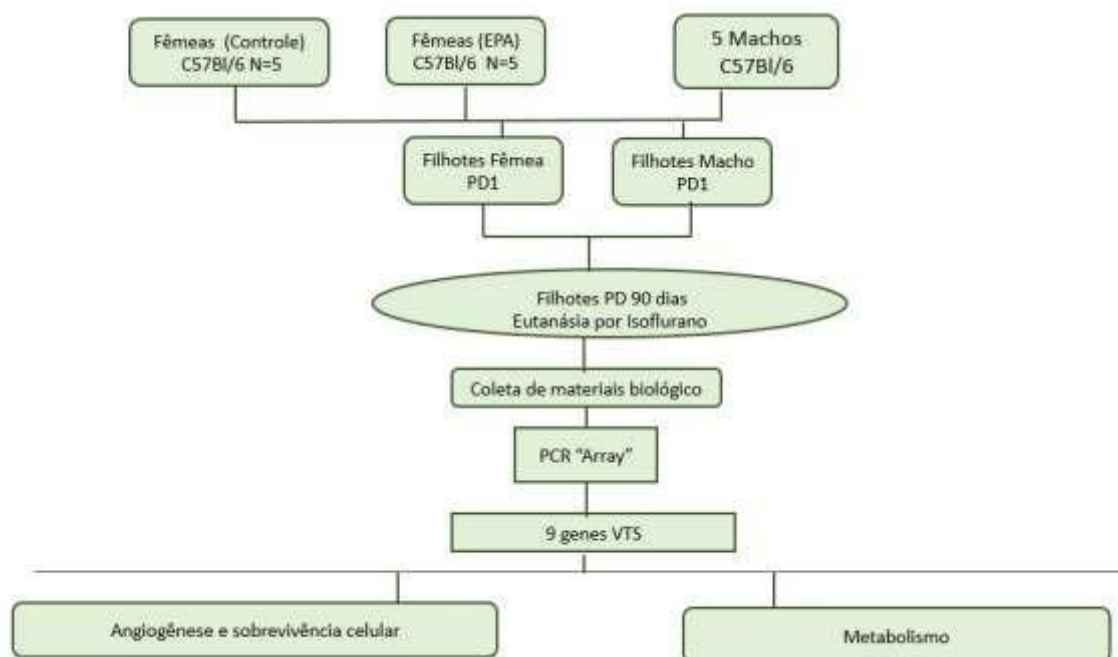


Figura 4. Desenho experimental do protocolo de exposição pré-natal ao álcool (EPA).

As fêmeas foram randomizadas em dois grupos: grupo Controle – Ct (n = 4) e grupo de Exposição pré-natal ao álcool – EPA (n = 11), enquanto os machos foram utilizados apenas como reprodutores, não se permitindo cruzamentos consanguíneos entre os animais [123] (**Figura 4**).

3.1.2 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 seus pesos e consumos de água aferidos diariamente até o final do protocolo (PD90).

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 H₂O + 0,1% de sacarina sódica – PA (Sac) (C₇H₅O₃NS · 2H₂O) (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. Registre-se que a troca da solução ocorreu a cada 2 dias para se 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.

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 (PD1 – PD10). Do PD10 ao desmame (PD30) 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”).

3.1.3 Protocolo grupo Etanol

De forma semelhante ao protocolo do grupo controle, as fêmeas do grupo Exposição pré-natal ao álcool - EPA (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%).

O processo de sensibilização (I1 a I15) ocorreu diferentemente do descrito no grupo Controle. Nos primeiros 4 dias (I1 a I4), cada fêmea recebeu 250 ml da solução de sacarina (250 mL H_2O + 0,1% 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 2**.

Tabela 2. Cálculo de diluição para obtenção de 1L da solução de EtOH em relação a porcentagem desejada para cada etapa do protocolo, com utilização de álcool etílico 99,5% (PA). Observação: 0,1% de sacarina sódica correspondeu a adição de 1g no volume final da solução, não sendo considerado para cálculo de diluição. (Adaptado de Atum, 2020)

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

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 (PD10) cada fêmea recebeu a solução alcoólica na concentração 10% EtOH com troca realizada a cada dois dias.

Finalmente, a partir do dia PD11, iniciou-se o protocolo de dessensibilização alcoólica. Nesse dia, foi disponibilizado para cada fêmea 250 mL de solução a 5% de EtOH, no dia PD13 250 mL de solução a 2% de EtOH e, do dia PD15 a PD21, 250 mL de solução controle (H₂O + 0,1% Sac), com troca realizada a cada dois dias. Do dia PD22 até o desmame (PD30) as fêmeas receberam somente água filtrada [118,119].

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 [119,124,125].

Os progenitores não foram utilizados para as análises sendo 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*. Sessenta dias após o desmame (PD90), os filhotes de ambos os grupos foram anestesiados com isoflurano por inalação (<20 segundos) e decapitados [126]. 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) [120,127,128].

Os corações excisados foram brevemente lavados em solução fisiológica para retirada do excesso de sangue e pesados. Em seguida, o ventrículo direito (VD) e os átrios esquerdo (AE) e direito (AD) foram extraídos e descartados.

Prontamente, cada ventrículo esquerdo (VE) foi pesado e acondicionado em frasco tipo *Eppendorf* de 1,5 ml e imerso em nitrogênio líquido para congelamento. Os tubos foram armazenados a -80 °C até o momento das análises. Além do coração e ventrículo esquerdo, foram coletados rins, cérebro e fígado para posterior análise.

3.2.2 Biomarcadores

Um total de 9 genes, previamente selecionados de acordo com participação em vias de transdução de sinais (VTS) relacionadas à disfunção cardiovascular foi analisado neste trabalho.

Tabela 3 – Genes selecionados para análises moleculares

VTS	Nº Poço	Código	Nome do Gene
<i>Angiogênese/</i>	g1 A 6/12	Akt1	AKT Serina / Treonina Quinase 1
<i>Sobrevida cel.</i>	g2 E 2/8	Vegfa	Fator de crescimento endotelial vascular A
	g41 A 2/8	Gapdh	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
	g42 F 3/9	Hk1	Hexoquinase 1
	g43 H 3/9	Ndufa3	NAD ⁺ : Ubiquinona Oxidoreductase Subunidade A3
<i>Metabolismo</i>	H 2/8	Pfkm	Fosfofrutoquinase muscular
<i>g44 Celular</i>	g45 H 6/12	Slc2a1	Transportador de glicose tipo 1
	g46 H 5/11	Taz	Tafazina
	g47 H 1/7	Ucp-2	Proteína Desacopladora 2

VTS – 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 (VE) de ambos os grupos, pesando 95,46 mg (\pm 0,78), foram homogeneizadas em 1 ml de Trizol[®] Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) à 15 °C e incubados por 5 min em temperatura ambiente para a dissociação completa dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200 μ L 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 μ L 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, foram ressuspensos com 15 μ L 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 μ g de RNA/ ml. Foram utilizadas apenas amostras livres de contaminantes (A260/A230 \sim 1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8 – 2,0). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1 μ g de RNA total (8 μ L) foi incubado com 1 unidade (1 μ L) de *DNase I/RNase Free* – (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA), na presença 1 μ L de

solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65 °C durante 10 minutos para inativação da DNase I.

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

c. Síntese de cDNA – Transcrição reversa

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

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

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

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

A amplificação e aquisição dos dados foi realizada com a sonda Taqman em equipamento Quantstudio™ 5 System (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA, EUA) como descrito previamente [129]. 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 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 μ L de água *DNase I/ RNase Free* – (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) por amostra, permitindo o volume de 10 μ L 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 passaram 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, se referiu ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atingisse o limiar de detecção.

Os genes diferencialmente expressos foram normalizados 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 Δ 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para representar os dados de expressão relativos. Os valores considerados *outliers*, foram retirados das análises, respeitando-se o mínimo de 8 amostras por grupo.

3.3 Análise estatística

Os dados morfométricos das fêmeas e da prole, e resultantes das análises de expressão gênica, foram tabulados e classificados. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando a aplicação *GraphPad Prism versão 8.0.1 for Windows, GraphPad Software* (San Diego, CA. USA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade e variâncias de erro.

Para a comparação da expressão dos genes entre o grupo Controle e grupo EPA foi realizado Teste t de Student para amostras independentes e, quando necessário, complementado com o teste de correção de Welch. Um valor de $p \leq 0.05$ foi considerado significativo e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

Nosso estudo analisou a expressão de RNAm de componentes das via de transdução de sinal relacionadas à sobrevivência celular e angiogênese - Serina/treonina quinase 1 (AKT1) e fator de crescimento endotelial A (VEGF-A), assim como os genes participantes da via de transdução de sinal do metabolismo celular - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH); Hexoquinase 1 (HK1), Subunidade 3 do complexo alfa da NADH desidrogenase (Ndufa3), fosfofrutoquinase (PFKM), transportador de glicose 1 (Slc2a1), tafazina (TAZ) e proteína desacopladora 2 (UCP2). A **Tabela 4** sumariza os resultados encontrados neste estudo.

Tabela 4 – Alterações na expressão gênica de mRNA do grupo EPA em relação ao grupo Controle

GENE	CONTROLE		EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL	
	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA
AKT1	1,000 ± 0,06	1,000 ± 0,05	2,883 ± 0,08 ^Δ	2,293 ± 0,04
VEGFA	1,000 ± 0,03	1,000 ± 0,03	0,2062 ± 0,004 ^Δ	0,0168 ± 0,0004
GAPDH	1,000 ± 0,06	1,000 ± 0,07	0,7182 ± 0,01 ^Δ	0,2981 ± 0,03
HK1	1,000 ± 0,03	1,000 ± 0,02	0,4826 ± 0,009	0,4753 ± 0,01
NDUFA3	1,000 ± 0,05	1,000 ± 0,04	0,9967 ± 0,02 ^Δ	2,213 ± 0,07
PFKM	1,000 ± 0,03	1,000 ± 0,06	0,3133 ± 0,005 ^Δ	0,5543 ± 0,01
SLC2A1	1,000 ± 0,04	1,000 ± 0,04	0,1725 ± 0,005 ^Δ	0,1124 ± 0,002
TAZ	1,000 ± 0,08	1,000 ± 0,02	2,984 ± 0,02	3,087 ± 0,2
UCP-2	1,011 ± 0,07	1,001 ± 0,02	0,6897 ± 0,007 ^Δ	4,136 ± 0,1

5.1. Expressão de RNAm de Proteína quinase serina/treonina 1 (Akt1)

Na Figura 4 observamos aumento de 186,3% da expressão de RNAm de Akt1 para o grupo de machos EPA, assim como um aumento de 128,4% para o grupo fêmeas EPA quando comparados com os respectivos controles.

Por meio da aplicação do teste t, verificamos uma expressão significativamente aumentada de RNAm de AKT1 entre os grupos EPA quando comparada com os respectivos controles, independente do sexo (Tabela 5). A expressão de RNAm de AKT1 foi maior em machos EPA quando comparados com fêmeas EPA.

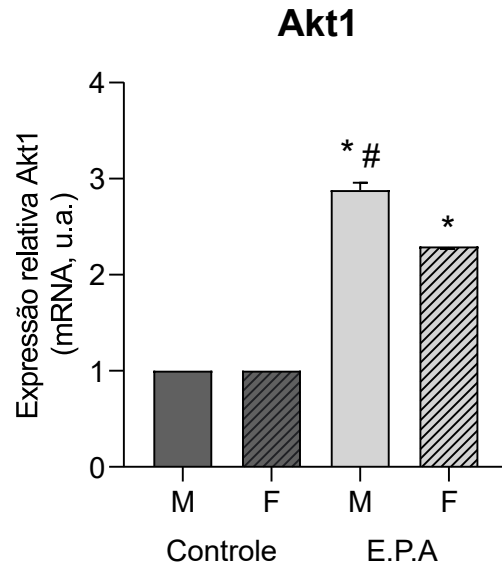


Figura 4: Expressão relativa de RNAm de Akt1 para os grupos EPA e seus respectivos controles em camundongos machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Tabela 5: Comparação da expressão do gene Akt1 conforme os grupos EPA e seus respectivos controles conforme o sexo. Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

	Controle		EPA	
Animais	p-valor (Média ± SEM)		(Média ± SEM)	
Macho	1,000 ± 0,06		2,883 ± 0,08 ^Δ	0,0001 [*]
Fêmea	1,000 ± 0,05		2,293 ± 0,04	0,0001 [*]

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea, p < 0,001

Os dois grupos controles foram comparados e resultou em um valor de p igual a 0,9747, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

Ao se realizar o teste entre os grupos EPA, por meio do teste t, observamos diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com um valor de p menor que 0,001. Assim, a expressão de Akt1 foi maior no grupo macho a EPA em relação ao grupo Fêmea EPA.

5.2. Análise de expressão de RNAm de Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFa)

A análise de expressão de RNAm de VEGFa evidenciou redução de 79,4% da expressão para os grupos EPA machos, assim como uma redução 98,32% para o grupo fêmea EPA quando comparados com os grupos controles (Figura 5).

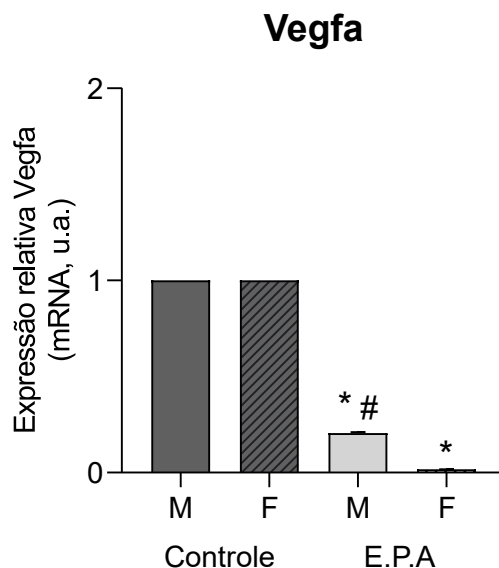


Figura 5: Expressão relativa de RNAm de VEGFa para os grupos EPA e seus respectivos controles em camundongos machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Após aplicação do teste t, observamos diferença significativa entre os grupos EPA e seus respectivos controles, indicando uma significativa redução da expressão do gene VEGFa após exposição ao álcool, sendo esta redução mais pronunciada em fêmeas que em machos EPA (Tabela 6).

Tabela 6: Expressão de RNAm de Vegfa nos grupos EPA e respectivos controles separados pelo sexo: Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle		EPA	
	p-valor	(Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho		1,000 ± 0,03	0,2062 ± 0,004 ^Δ	0,0001*
Fêmea		1,000 ± 0,03	0,0168 ± 0,0004	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea p < 0,001

Os dois grupos controles apresentaram valor de p igual a 0,9982 quando comparados, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as

diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

O teste t entre grupos EPA evidenciou diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com um valor de p menor que 0,001. Neste caso, a EPA modulou a expressão de RNAm de VEGFa, com valores maiores para o grupo Macho EPA quando comparados com fêmeas EPA, corroborando as expressões de RNAm de Gapdh e Atk1 descritas anteriormente.

5.3. Expressão de RNA mensageiro (RNAm) de Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

Ao analisar os valores de expressão de RNAm de GAPDH (Figura 6), observamos redução de 28,75% da expressão no grupo Macho EPA em comparação com o grupo controle. Uma redução ainda mais acentuada (70,49%) foi observada no grupo Fêmea EPA quando comparada com o grupo controle. Também evidenciamos uma redução da expressão em fêmeas EPA em relação aos machos EPA (Figura 6).

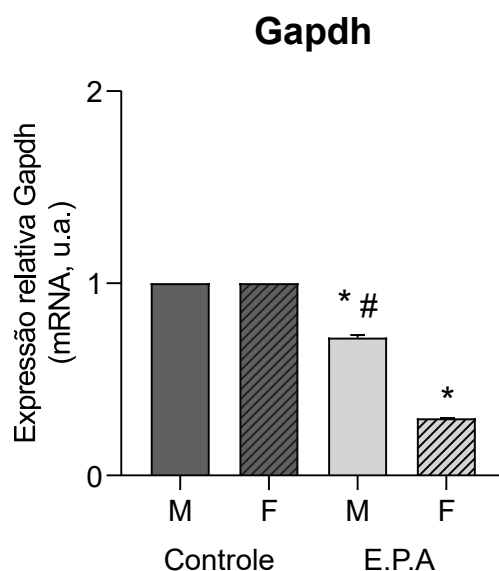


Figura 6: Expressão relativa de RNAm de GAPDH para os grupos EPA e seus respectivos controles em camundongos machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Por meio da aplicação do teste t, observamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles, em ambos os sexos, indicando uma significativa redução da expressão do gene GAPDH (Tabela 7) após EPA.

Tabela 7: Comparação da expressão de RNAm de GAPDH nos grupos EPA e seus respectivos controles separados pelo sexo. Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Machos	1,000 ± 0,06	0,7182 ± 0,01 ^Δ	0,0056*
Fêmeas	1,000 ± 0,07	0,2981 ± 0,03	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea, p < 0,001

Como condição para assegurar os resultados, foram comparados os dois grupos controles resultando em valor de p igual a 0,9875, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles. Ao se realizar o teste t entre os animais dos grupos EPA, observamos diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com valor de p menor que 0,001, evidenciando que o sexo influenciou nas expressões de RNAm de GAPDH, apresentando valores significativamente maiores no grupo de machos EPA em relação ao grupo Fêmea (F) EPA.

5.4. Expressão de RNAm de Hexoquinase 1 (Hk1)

Observamos redução de 51,85% da expressão de RNAm de Hk1 no grupo de machos (M), assim como uma redução 54,82% no grupo fêmeas (F) tratados com álcool durante a gestação (Figura 7) quando comparados com os grupos controles.

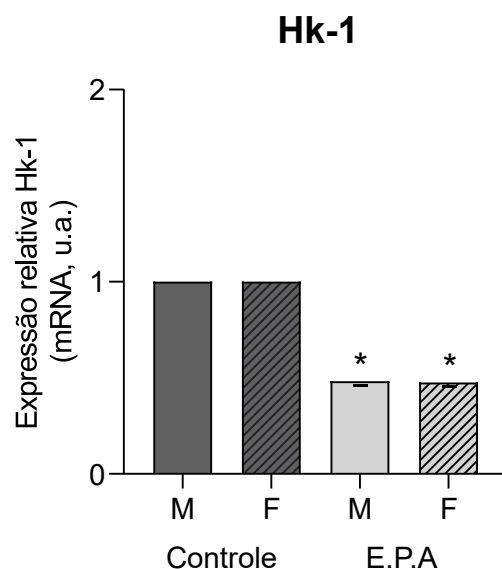


Figura 7: Valores das expressões do gene Hk1 para os grupos EPA e seus respectivos controles nos grupos machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle.

Observamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles, independente do sexo, indicando uma forte modulação negativa da expressão de RNAm de Hk1 em ambos os sexos quando expostos ao álcool durante a gestação (Tabela 8).

Tabela 8: Expressão de RNAm de Hk1 nos grupos EPA e seus respectivos controles conforme o sexo. Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho	1,000 ± 0,03	0,4826 ± 0,009	0,0001*
Fêmea	1,000 ± 0,02	0,4753 ± 0,01	0,0053*

*= EPA ≠ Controle

Os dois grupos controles quando comparados pelo teste t apresentaram valor de p igual a 0,7854, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

A análise de teste t entre os grupos EPA evidenciou igualdade entre o grupo Macho e Fêmea EPA, com valor de p igual a 0,6338, evidenciando que o sexo não influenciou nas expressões de RNAm de Hk1, ao contrário do observado nas expressões de RNAm de Gapdh, Atk1 e Vegfa.

5.5. Análise da expressão de RNAm de Subunidade 3 do complexo alfa da NADH desidrogenase (Ndufa3)

Na Figura 8 observamos aumento de 120,71% na expressão de RNA mensageiro no grupo fêmea EPA em relação ao grupo controle e em relação aos machos EPA. O grupo de machos (M) EPA não apresentou diferença de expressão de Ndufa3 em relação ao controle.

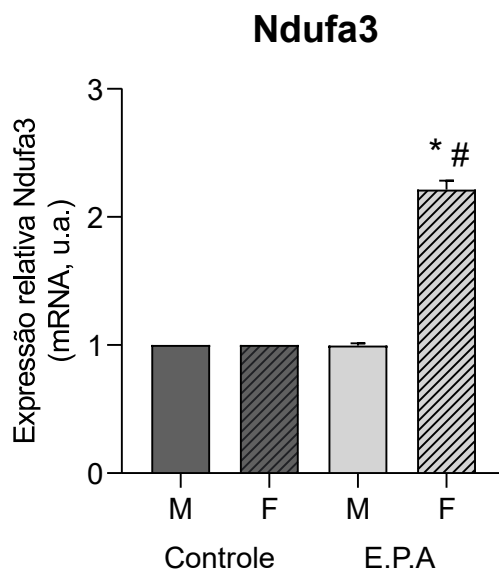


Figura 8: Expressão de RNAm de Ndufa3 para os grupos EPA e seus respectivos controles em animais machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

A Tabela 9 apresenta as diferenças entre os grupos EPA e controle separados pelo sexo.

Tabela 9: Comparação por meio do teste T da expressão do gene Ndufa3 entre os grupos EPA e seus respectivos controles conforme, o sexo. Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho	1,000 ± 0,05	0,9967 ± 0,02 ^Δ	0,8885*
Fêmea	1,000 ± 0,04	2,213 ± 0,07	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea , p = 0,001

A análise comparativa entre os dois grupos controles, que por meio do teste t, evidenciou um valor de p igual a 0,9672, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as diferenças obtidas não foram ocasionadas

por eventuais variações nos valores dos grupos controles. Ao se realizar o teste t entre os animais EPA observamos diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com um valor de p menor que 0,001 (Tabela 9).

5.6. Expressão de RNAm de Fosfofrutoquinase (PfkM)

A expressão de RNAm de fosfofrutoquinase (PFKM) apresentou redução de 68,72% no grupo de machos EPA quando comparados com o seu controle. Esta redução foi menos pronunciada em fêmeas EPA (44,96%) quando comparadas com o controle (Figura 9).

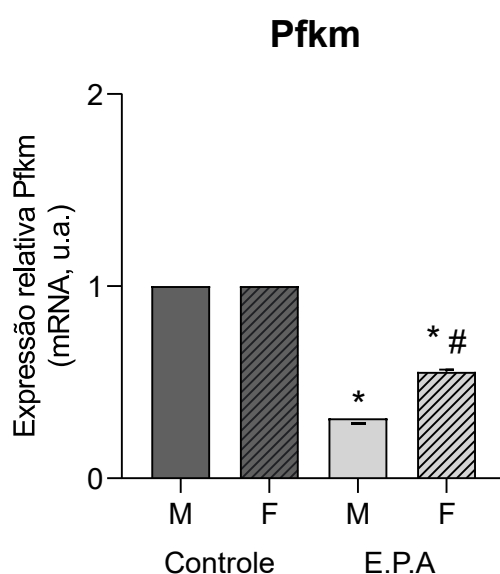


Figura 9: Valores das expressões de RNAm de PfkM para os grupos EPA e seus respectivos controles em grupos machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Observamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles, em ambos os sexos, indicando uma significativa redução da expressão de RNAm de PfkM após exposição al álcool durante a gestação (Tabela 10).

Tabela 10: Expressão de RNAm de PfkM nos grupos EPA e respectivos controles conforme o sexo: Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle		EPA	
	p-valor	(Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho		1,000 ± 0,03	0,3133 ± 0,005 ^Δ	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

Fêmea 1,000 ± 0,06 0,5543 ± 0,01 0,0001*

$\Delta = \text{Macho} \neq \text{Fêmea}, p < 0,001$

Ao compararmos os dois grupos controles por meio do teste t, observamos valor de p igual a 0,9361, o que representa a igualdade entre os valores testados, ou seja, as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

Ao se realizar o teste entre os grupos EPA, pelo teste t, observamos diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com um valor de p menor do que 0,0001, evidenciando que o sexo modulou a expressão de RNAm de Pkfm após EPA, sendo maior em fêmeas expostas ao álcool durante a gestação.

5.7. Expressão de RNAm de Transpostador de glicose 1 (Slc2a1)

Conforme observado na Figura 10, verificamos redução de 82,81% da expressão para o grupo de machos EPA, assim como redução 88,80% para o grupo fêmea EPA quando comparados com os respectivos controles. A expressão de RNAm de Slc2a1 foi maior em machos que em fêmeas EPA (Figura 10).

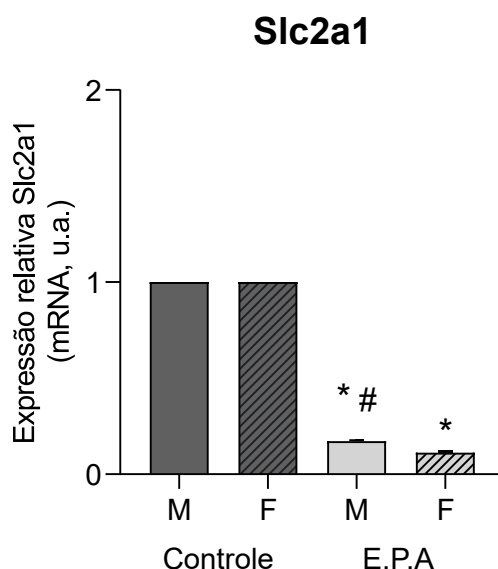


Figura 10: Valores das expressões de RNAm de Slc2a1 para os grupos EPA e seus respectivos controles machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA. Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Por meio da aplicação do teste t, verificamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles, em ambos os sexos, indicando uma significativa redução da expressão do gene Slc2a1 após EPA (Tabela 11).

Tabela 11: Expressão de RNAm de Slc2a1 conforme, os grupos EPA e seus respectivos controles conforme o sexo: Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho	1,000 ± 0,04	0,1725 ± 0,005 ^Δ	0,0001*
Fêmea	1,000 ± 0,04	0,1124 ± 0,002	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea , p < 0,001

Quando comparamos os dois grupos controles obtivemos valor de p igual a 0,9983. Assim, as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

A comparação entre sexos nos grupos EPA evidenciou diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com valor de p menor do que 0,0001. Neste caso, o sexo foi um fator de influência nas expressões de RNAm de Slc2a1 após EPA.

5.8. Expressão de RNAm de Tafazina (Taz)

A expressão de Taz foi fortemente modulada pela EPA (Figura 11). Observamos aumento de 194,72% da expressão para o grupo de machos (M), assim como aumento de 208,51% para o grupo fêmea (F) expostos ao álcool durante a gestação em comparação com os respectivos controles.

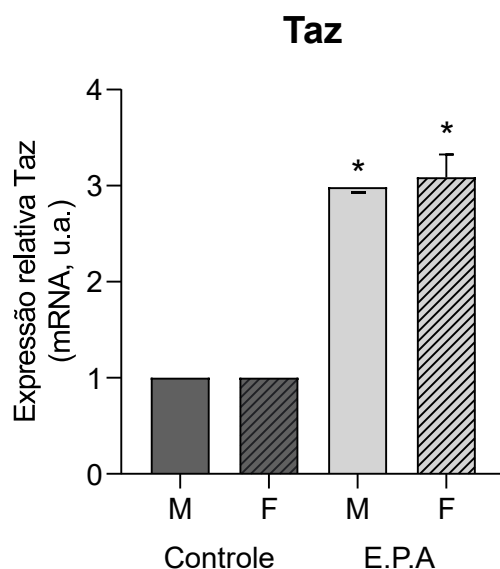


Figura 11: Expressão de RNAm de Taz para os grupos EPA e seus respectivos controles em animais machos (M) e fêmeas (F). Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Observamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles, independente do sexo, indicando um significativo aumento da expressão do gene Taz em comparação pelo teste t (Tabela 12).

Tabela 12: Análise da expressão do gene Taz conforme os grupos EPA e seus respectivos controles conforme o sexo: Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Animais	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho	1,000 ± 0,08	2,984 ± 0,02	0,0001*
Fêmea	1,000 ± 0,02	3,087 ± 0,2	

*= EPA ≠ Controle

Os dois grupos controles, quando comparados, apresentaram valor de p igual a 0,8863, evidenciando que as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles. A comparação entre os grupos Macho e Fêmea EPA apresentou valor de p igual a 0,7391, indicando que a expressão de Taz não foi modulada pelo sexo.

5.9. Expressão de RNAm de Proteína desacopladora 2 (Ucp2)

Ao analisarmos a expressão de UCP2 nos animais expostos ao álcool durante a gestação, verificamos que houve redução de 31,78% da expressão para o grupo de machos EPA. Entretanto, verificamos aumento de 313,26% para o grupo fêmea EPA em comparação com o controle (Figura 12).

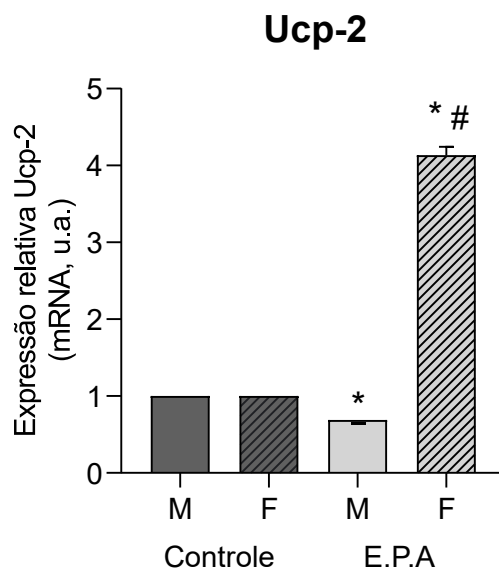


Figura 12: Valores das expressões do gene Ucp2 para os grupos EPA e seus respectivos controles. Significância: *em comparação ao controle, #em comparação ao grupo EPA.

Observamos diferença significativa entre os grupos EPA com seus respectivos controles. Notadamente, verificamos significativa redução da expressão do gene Ucp2 para o grupo Macho e um significativo aumento para o grupo Fêmea após a exposição ao álcool durante a gestação.

Tabela 12: Comparação por meio do teste T, da expressão do gene Ucp2 conforme os grupos P.A.E e seus respectivos controles conforme o sexo: Macho EPA n(5) Fêmea EPA n(5)

Cobaias	Controle	EPA	
	p-valor (Média ± SEM)	(Média ± SEM)	
Macho	1,011 ± 0,07	0,6897 ± 0,007 ^Δ	0,006*
Fêmea	1,001 ± 0,02	4,136 ± 0,1	0,0001*

*= EPA ≠ Controle

^Δ= Macho≠Fêmea , p < 0,001

Para garantir a fidelidade dos resultados, os dois grupos controles foram comparados resultando em valor de p igual a 0,8961, indicando que as diferenças obtidas não foram ocasionadas por eventuais variações nos valores dos grupos controles.

Ao se realizar o teste t entre os animais dos grupos EPA, observamos diferença entre o grupo Macho e Fêmea, com um valor de p menor que 0,0001, evidenciando que o sexo influenciou nas expressões de Ucp2.

Um resumo da expressão de RNA mensageiro dos genes analisados é mostrado na **Tabela 13**, evidenciando as diferenças encontradas nos grupos EPA machos e fêmeas em relação aos respectivos controles.

Tabela 13 - Resumo dos resultados da expressão dos genes relacionados as vias de transdução de sinal da angiogênese e sobrevivência celular e metabolismo, nos respectivos grupos EPA.

<i>Genes</i>	MACHOS (EPA)	FÊMEAS (EPA)
Angiogênese e Sobrevivência celular	AKT1 MACHOS[#]↑	↑ AKT1 FÊMEAS[*]
	VEGFA MACHOS[#]↓	↓ VEGFA FÊMEAS[*]
Metabolismo	GAPDH MACHOS^{**}↓	↓ GAPDH FÊMEAS[*]
	HK1 MACHOS[*] ↓	↓ HK1 FÊMEAS[*]
	NDUFA3 MACHOS ↓	↑ NDUFA3 FÊMEAS^{**}
	PFKM MACHOS[*] ↓	↓ PFKM FÊMEAS^{**}
	SLC2A1 MACHOS^{**}↓	↓ SLC2A1 FÊMEAS[*]
	TAZ MACHOS[*]↑	↑ TAZ FÊMEAS^{**}
	UCP2 MACHOS[*]↓	↑ UCP2 FÊMEAS^{**}

* significativo em relação ao grupo controle; # significativo em relação ao grupo EPA.

5. DISCUSSÃO

A análise da expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo e sobrevivência celular no miocárdio de camundongos machos e fêmeas adultos submetidos à exposição pré-natal ao álcool permitiu analisar as interações moleculares ocasionadas através da ingestão de álcool gestacional.

Este trabalho demonstrou que consumir álcool na gravidez, mesmo que em pequenas doses, pode vir a interferir diretamente na expressão de genes relacionados metabolismo, angiogênese e sobrevivência celular.

Angiogênese e sobrevivência celular

O processo da angiogênese, consiste na formação de novos vasos sanguíneos que são derivados da vasculatura pré-existente, sendo fundamental para diversos mecanismos fisiológicos, que vão da embriogênese até regeneração de feridas, assim como papel essencial nas doenças e tumorigênese [130, 131, 132].

A angiogênese no infarto do miocárdio, assim como em outras condições fisiopatológicas é de extrema importância, para proporcionar o reparo cardíaco, quando afetada, pode dificultar o reparo cardíaco e causar rupturas ou formação de tecido cicatricial imaturo [133]. Em nosso protocolo de estudo, analisamos a expressão de dois genes fundamentais na angiogênese e sobrevivência celular após a EPA em machos e fêmeas adultos. O aumento de expressão do gene serina/treonina quinase 1 (AKT1) em machos e fêmeas com EPA difere da expressão de RNAm de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA), em que ambos os sexos do grupo EPA apresentaram redução da expressão. Entretanto, machos EPA apresentaram alterações significativas em relação às fêmeas EPA. Esta discrepância, exacerbada nos machos EPA, sugere que o álcool possa ter sido mais deletério nestes animais, mas também que as fêmeas EPA poderiam apresentar maior proteção. O desenvolvimento de disfunções cardíacas, como hipertensão e reatividade vascular, induzidas por diferenças de gênero são bem conhecidas. O papel do estrógeno deve ser considerado, uma vez que os animais foram analisados na fase adulta, mas há outros componentes que influenciam esta disparidade. Os homens desenvolvem as doenças de forma mais grave e rápida do que mulheres da mesma idade [134,135]. Além disso, os níveis de óxido nítrico (NO) em todo o corpo são mais elevados em mulheres do que nos homens [136,137]. A diferença de gênero na via de NO pode contribuir para dimorfismos sexuais na doença cardiovascular [137].

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA), está entre os moduladores mais importantes na biologia vascular, por regular a vasculogênese, angiogênese e manter a manutenção vascular na embriogênese

e em indivíduos adultos. A serina/treonina quinase 1 (AKT), têm papel fundamental no sistema cardiovascular, por desempenhar funções na regulação hipertrófica cardíaca, angiogênese e apoptose [138,139].

Zeng *et al.* (2017) destacaram o papel do gene AKT, em diversos mecanismos celulares, entre eles a proliferação celular, sobrevivência e apoptose, além de atuar na cardioproteção em doenças cardíacas, favorecendo a remodelação tecidual [140]. Em estudo com camundongos C57Bl/6, Zhou *et al.* (2002) verificaram que a ingestão de álcool elevou os níveis de AKT cardíaco e esse aumento na atividade da AKT, além de estimular a função cardíaca em meio ao estresse oxidativo, diminuiu a apoptose de miócitos. Nossos achados sugerem que o aumento significativo do AKT nos grupos EPA pode estar relacionado a um estímulo de sobrevivência e cardioproteção nestes animais [141].

Para Nagoshi *et al.* (2005), a ativação de Akt por si só, não é suficiente para cardioproteção e que as vias dependentes de PI3K, mas independentes de Akt, desempenham um papel crítico neste cenário [142]. No entanto, nossos dados sugerem que a EPA modulou a expressão da serina/treonina quinase 1 (AKT1), evidenciando que, no miocárdio dos camundongos adultos macho e fêmea a exposição ao álcool produziu um estímulo à cardioproteção, possivelmente como forma de reduzir danos causados pelo álcool. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados para melhor avaliar o efeito cardioprotetor da AKT1 [143]. Dados obtidos por Taguchi *et al.* (2012) sugerem que em condições diabéticas, machos e não fêmeas, podem ser deficientes na via de sinalização Akt / eNOS, que pode contribuir para pressão arterial elevada observada nestes animais. Além disso, os autores verificaram que a ativação da via de AKT/eNOS é preservada no endotélio da aorta de fêmeas, com expressão elevada de eNOS, resultando em maior resistência do endotélio à disfunção [144].

Em relação à angiogênese, a EPA induziu diminuição nos níveis de expressão de VEGFA ambos os sexos, sugerindo uma possível deficiência na ativação da via de angiogênese. Estudos apontam a importância da expressão de VEGFA em células cardíacas. Segundo Braile *et al.*, (2020), os cardiomiócitos produzem e liberam VEGF-A, além de expressarem seus receptores, VEGFR1 e VEGFR2, em sua superfície celular. A diminuição da expressão do VEGF-A no

miocárdio prejudicaria a angiogênese miocárdica, e colabora com as disfunções cardíacas, entretanto sua expressão aumentada também prediz condições como inflamação em andamento [145].

Tang *et al.* (2009) demonstraram que quando altamente expresso em corações de camundongos infartados o VEGF medeia a migração de CSCs (células-tronco cardíacas) para a área isquêmica por meio da estimulação de Flk-1 (Receptor VEGFR2) e ativação de PI3K / Akt [146]. Jégou *et al.* (2012), com foco na vasculatura cerebral, verificaram que o álcool pré-natal reduziu os níveis de VEGFA-R2, afetando assim a vasculatura no cérebro neonatal [147]. Em estudo com exposição ao álcool, Radek *et al.* (2008) evidenciaram que a exposição ao álcool diminuiu o nível de mRNA de VEGF-R2 em células endoteliais [148]. Nossos dados mostram que a redução da expressão de VEGF foi mais acentuada em machos EPA que em fêmeas do mesmo grupo, o que evidencia um maior potencial deletério do álcool em machos.

Metabolismo celular

O coração neonatal passa por diversas alterações metabólicas, essas alterações que iniciaram na fase neonatal são concluídas na fase adulta, conjuntamente à maturação dos cardiomiócitos. As mitocôndrias, representam cerca de 1/3 do volume de cardiomiócitos no coração adulto, refletindo em um aumento na capacidade oxidativa de fornecimento de energia. Lopaschuk *et al.* (1992), em condições fetais, o coração funciona em ambiente relativamente hipóxico e o coração em desenvolvimento passaria por transformações metabólicas [149]. No feto, o coração dependeria de substratos de carboidratos para que haja síntese de ATP, já após o nascimento há elevação do suprimento de ácidos graxos e oxigênio. A β -oxidação dos ácidos graxos seria a principal fonte energética para o coração. Quando hipertrofiado e com insuficiência cardíaca o coração tende a reverter para o perfil metabólico fetal [150,151].

Assim, o metabolismo celular cardíaco é de extrema importância para o funcionamento do coração. Em nossa análise de expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo celular no miocárdio de camundongos machos e fêmeas adultos, observamos uma diminuição nos genes fosfofrutoquinase 1, assim como na hexoquinase-1. A captação de glicose

miocárdica é realizada principalmente por GLUT1 e GLUT4, que são transportadores de glicose. Quando a glicose entra no miócito é fosforilada em glicose-6-fosfato pela hexoquinase, que a retém dentro da célula. Após ser fosforilada pela hexoquinase, a glicose mantém os volumes intracelulares de glicose livre em nível menor, fornecendo um grau de concentração fundamental para que haja fluxo contínuo de glicose nos miócitos. Assim, a hexoquinase é importante no ajuste e manutenção miocárdica de glicose [152-154].

Soñanez-Organis *et al.* (2016) quantificaram os níveis de expressão de mRNA dos genes fator 1- α induzível por hipóxia (HIF-1 α) e do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), ambos responsáveis por realizar a transcrição e ativarem genes envolvidos no metabolismo celular. Os autores verificaram o efeito da gravidez nos genes-alvo da glicólise e observaram que genes glicolíticos GLUT1, PFKM, GAPDH e HK1 são regulados positivamente pela ativação de HIF-1 α e PPAR γ durante a cardiomiopatia hipertrófica patológica, e que o exercício físico induziu a expressão da fosfofrutoquinase muscular (PFKM) e hexoquinase 1 (HK1) [155]. Em nosso protocolo, observamos que, em machos e fêmeas adultas dos grupos EPA, houve diminuição nas expressões destes genes, provavelmente um efeito deletério do álcool, podendo estar relacionada com alteração do metabolismo de glicose pelo miocárdio. A expressão de PFKM foi marcadamente reduzida em fêmeas EPA quando comparadas com machos do mesmo grupo, que também apresentaram redução significativa quando comparados com machos controle. Na literatura há poucos relatos sobre a diferença de sexo e expressão das enzimas glicolíticas. A expressão proteica de HK1, PFKM e GAPDH foi diferente em embriões bovinos machos e fêmeas (Garcia-Herreros *et al.*, 2012). Os autores argumentaram que aumento de expressão destas enzimas em embriões machos pode estar relacionado às diferenças na cinética de desenvolvimento encontrado entre embriões bovinos machos e fêmeas. Embriões machos possuem maior consumo de glicose e desenvolvimento mais rápido em relação às fêmeas.[156]

O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima importante que está envolvida no metabolismo energético. No estudo de Barber *et al.* (2005) foram analisados 72 tipos de tecidos humanos em condições fisiológicas e observou-se uma variabilidade na expressão do mRNA de GAPDH

em tecidos humanos, sendo uma maior expressão nos tecidos cardíacos, cerebral e níveis mais baixos no tecido pancreático. No mesmo estudo não foram apresentadas diferenças na expressão do mRNA de GAPDH relacionadas ao sexo [157].

Karliner *et al.* (1971) realizaram um estudo com 63 pacientes infartados e 54 pacientes (controle) hospitalizados com intuito de avaliar a atividade sérica do Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) na lesão miocárdica. Os autores que evidenciaram aumento dos níveis de GAPDH 3,3 vezes maior que os valores encontrados no grupo controle [158]. Segundo Zhong *et al.* (1999), os níveis de GAPDH aumentam cerca de 75% em condições de hipóxia [159]. De maneira interessante, nossos dados sugerem que a EPA induziu uma diminuição da expressão de RNAm de GAPDH, especialmente em fêmeas. Este achado é mais interessante quando analisado em conjunto com as outras enzimas glicolíticas quantificadas neste estudo, evidenciando uma redução geral do perfil de metabolismo de glicose no miocárdio de animais expostos ao álcool durante a gestação.

O transportador de glicose facilitado pela família 2 do transportador de soluto ou transportador de glicose tipo 1 (GLUT1) é um gene de grande importância no metabolismo celular. Segundo Liao (2002), o aumento da captação miocárdica de glicose em camundongos transgênicos pela superexpressão cardíaca de GLUT1 evitou o desenvolvimento da disfunção cardíaca e melhorou a sobrevivência de camundongos submetidos a sobrecarga de pressão crônica durante o período deste estudo [160]. Em nosso estudo observamos uma redução de expressão de RNAm de SLC2A1 nos grupos EPA sugerindo um possível impacto na diminuição do transporte de glicose em machos e fêmeas, possivelmente devido à ação do álcool nos cardiomiócitos. Entre animais do grupo EPA observamos uma diminuição significativa em fêmeas quando comparadas com machos. O efeito deletério da redução da expressão de GLUT1, como mostrado por Jiang *et al.* (2020) com camundongos C57Bl/6 deficientes (nocaute) de GLUT1, resultou em disfunção sistólica e diastólica [161].

Em relação ao gene TAZ, observamos forte modulação do gene nos dois grupos EPA. No estudo de Garlid *et al.* (2019), os autores descrevem a

localização da tafazina nas membranas mitocondriais atuando como transacilase acil-específica de importância no metabolismo lipídico por meio da cardiolipina (CL) [162]. O remodelamento de CL é necessário para garantir que haja homeostase da cadeia respiratória nas mitocôndrias. Os autores evidenciaram ainda que mutações no TAZ desencadeiam defeitos cardiovasculares graves, como observados na síndrome de Barth (BTHS), incluindo fibroelastose endocárdica (EFE), cardiomiopatia dilatada ligada ao X 3A (CMD3A e ventricular esquerda não compactada (LVNC) [162] Nossos dados evidenciaram um aumento da expressão de RNAm de TAZ em animais com EPA. Não encontramos na literatura estudos que correlacionem a expressão de RNAm de TAZ e exposição pré-natal ao álcool. Entretanto, há estudos que evidenciaram uma diminuição na expressão do gene TAZ que acarretou insuficiência cardíaca [171].

A proteína desacopladora-2 (UCP2) transporta ânions na membrana interna de mitocôndrias e é um regulador negativo na produção de ROS [163]. Nossos dados sobre a expressão de RNAm de UCP2 no grupo EPA são bastante intrigantes, pois verificamos um perfil de expressão diferente entre os sexos. Observamos grande aumento de expressão no grupo EPA fêmea e diminuição significativa no grupo EPA macho quando comparados com os grupos controle. Em estudo com camundongos nocaute para o gene UCP2, foi observado aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial, evidenciando o papel importante na mitigação de ROS pela ativação de UCP2 [164] Kutsche *et al.* (2020) relatam que não está estabelecido o papel específico da UCP2 em cardiomiócitos, embora tenha sido apontado que o aumento de expressão possa reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais. [165] Horvath *et al.* (2002) analisaram camundongos nocautes para UCP2 e camundongos selvagens com superexpressão de UCP2 e os efeitos da UCP2 na sensibilidade ao álcool e o limiar da dor [166]. Um aumento de expressão da UCP2 foi relacionado a uma redução da sensibilidade ao álcool, assim como maior tolerância ao etanol. Uma possível explicação dada pelos autores para essa sensibilidade diferente, seria devido à capacidade da UCP2 em aumentar o metabolismo ou até mesmo a eliminação do etanol.

Wu *et al.* (2019) relataram a importância do papel da UCP2 em lesões miocárdicas e na hipertrofia cardíaca, embora o mecanismo da UCP2 na

cardioproteção durante a isquemia de reperfusão permaneça indefinido [167]. Razeghi *et al.* (2001) mostraram que UCP2 foi regulada negativamente em corações com insuficiência, ou seja, observaram diminuição na expressão de UCP2 no coração, mas o mesmo não foi observado em corações fetais e saudáveis [168]. Boss *et al.* (1998) mostraram que há necessidade de uma maior eficiência metabólica associada à redução nos níveis de expressão de mRNA das proteínas desacopladoras no músculo cardíaco, sugerindo que essa redução diminuiria a dissipação de energia nesses tecidos [169].

A expressão de RNAm da Subunidade 3 do complexo alfa da NADH desidrogenase (Ndufa3) apresentou aumento significativo em fêmeas EPA em relação ao grupo controle e em relação aos machos EPA. O Complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) usa o potencial de redução do NADH para conduzir prótons através da membrana interna de transdução de energia e potencializar a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias de mamíferos [170]. Estes dados corroboram os dados de expressão de RNAm de UCP2, onde observamos pronunciado aumento somente em fêmeas do grupo EPA. Assim, em fêmeas EPA, parece haver uma tentativa mais eficiente de ativar mecanismos que possam reduzir efeitos deletérios do estresse oxidativo gerado pelo álcool.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, em estudo de expressão de RNA mensageiro de genes relacionados ao metabolismo e sobrevivência celular em camundongos machos e fêmeas adultos após a exposição pré-natal ao álcool, observamos alterações que podem estar relacionadas às disfunções metabólicas no miocárdio. Nossos dados sugerem que a EPA resultou em modificações transcricionais que persistiram no miocárdio na fase adulta, sendo mais pronunciadas em machos que em fêmeas. Observamos também que, em fêmeas EPA, parece haver maior ativação de cardioproteção em relação ao estresse oxidativo gerado pelo álcool.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sales E. Aspectos da história do álcool e do alcoolismo no século XIX. *Cadernos de Hist. UFPE*. 2010;7(7):167-203.
2. Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. The impact of alcohol consumption on weight gain. *Rev Psiqu Clin*. 2008;35(Supl 1):21-24. doi:10.1590/S010160832008000700006.
3. WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
4. Rehm J, Baliunas D, Borges GL, et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction*. 2010;105(5):817–843. doi:10.1111/j.1360-0443.2010.02899.x.
5. Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health*. 2000;24(2):93–104.
6. Warren KR, Hewitt BG, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Research Challenges and Opportunities. *Alcohol Res Health*. 2011;34(1):4-14. PMID: 23580035.
7. Eberhart JK, Parnell SE. The Genetics of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(6):1154-65. doi:10.1111/acer.13066.
8. 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.
9. Tillonen J, Väkeväinen S, Salaspuro V, Zhang Y, Rautio M, Jousimies-Somer H et al. Metronidazole Increases Intracolonic but Not Peripheral Blood Acetaldehyde in Chronic Ethanol-Treated Rats. *Alcoholism: Clin Exper Res*. 2000;24(4):570-575. doi:10.1111/j.1530-0277.2000.tb02026.x.
10. Tillonen J. Ethanol, Acetaldehyde and gastrointestinal flora. Helsinki: Research Unit of Alcohol Diseases, University of Helsinki, 2000. Dissertação de mestrado. ISBN 952-91-2603-4.
11. Jordão Junior AA, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathiona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1998;31:434-449.

12. 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.
13. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2010;3(3):178–185.
doi:10.4161/oxim.3.3.12288.
14. Mincis M, Mincis R. Álcool e o fígado. *GED Gastroenterol Endosc Dig.* 2011;30(4):152-162.
15. Aguiar AS, Silva VA, Boaventura GT. As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? *Nutrição em Pauta.* 2007; 45-49.
16. Freire TM, Machado JC, Melo EV, Melo DG. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(7):376-81. doi:10.1590/S0100-72032005000700002.
17. Matos LC. Doença Hepática Alcoólica (DHA). *Revista Sociedade Portuguesa Medicina Interna.* 2003;13(3):307-216.
18. Maher JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(1):5-12. PMID: 15706758.
19. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human preimplantation embryo development. *Development.* 2012;139(5):829-841. doi:10.1242/dev.060426.
20. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen Embriologia Humana.* 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
21. Mazzu-Nascimento T, Melo DG, Morbioli GG, Carrilho E, Vianna FLS, Silva AA, Schuler-Faccini L. Teratogens: a public health issue – a Brazilian overview. *Genetics and Molecular Biology.* 2017;40(2):387-397.
doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0179.
22. Alves-Santos NH, Cocate PG, Benaim C, Farias DR, Emmett PM, Kac G. Prepregnancy Dietary Patterns and Their Association with Perinatal Outcomes: A Prospective Cohort Study. *J. of the Academy of Nutrition and Dietetics.* 2019;119(9):1439-1451. doi:10.1016/j.jand.2019.02.016.
23. 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.
24. Mandal C, Halder D, Jung KH, Chai YG. In Utero Alcohol Exposure and the Alteration of Histone Marks in the Developing Fetus: An Epigenetic Phenomenon of Maternal Drinking. *Int. J. Biol. Sci.* 2017a;13(9):11001108. doi:10.7150/ijbs.21047.
 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/ijms18071386.
 26. Shepard TH. Detection of human teratogenic agents. *The Journal of Pediatrics.* 1982;101(5):810-815. doi:10.1016/S0022-3476(82)80338-7.
 27. Finnell RH. Teratology: General considerations and principles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1999;103(2)Spl:S337-S342. doi:10.1016/S0091-6749(99)70259-9.
 28. 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.
 29. 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(Supp 1):1003S-1026S. doi:10.1093/ajcn/nqy240.
 30. Segre CAM. Efeitos do álcool na gestante, no feto e no recém-nascido. São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo. 2010.
 31. Mennella J. Alcohol's effect on lactation. *Alcohol Res Health.* 2001;25(3):230–234. PMID:11810962.
 32. 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
 33. Idrus NM, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Experimental Treatments and Strategies for Intervention. *Alcohol Research & Health.* 2011;34(1):76-85. PMID: 23580044.
 34. 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.
35. 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.
 36. 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.15300277.2000.tb04593.x.
 37. Kingdon D, Cardoso C, Mcgrath JJ. Research Review: Executive function deficits in fetal alcohol spectrum disorders and attentiondeficit/hyperactivity disorder – a meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatr*. 2016;57:116-131. doi:10.1111/jcpp.12451.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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-desaudef/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Passini Junior R. Alcohol consumption during pregnancy. *Rev. Bras.*

- Ginecol. Obstet. 2005;27(7):373-375.
doi:10.1590/S010072032005000700001.
52. 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.
 53. 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.
 54. 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.
 55. 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.
 56. 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.
 57. 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.
 58. Maas, A. H., & Appelman, Y. E. (2010). Gender differences in coronary heart disease. Netherlands heart journal: monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation, 18(12), 598–602. <https://doi.org/10.1007/s12471-010-0841-y>
 59. Perrino, Cinzia et al. Improving translational research in sex-specific effects of comorbidities and risk factors in ischaemic heart disease and cardioprotection: position paper and recommendations of the esc working group on cellular biology of the heart. Cardiovascular Research, [S.L.], v. 117, n. 2, p. 367-385, 2 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvaa155>.

60. Grant, Marianne KO et al. "Falta de dimorfismo sexual em um modelo de rato de disfunção cardíaca induzida por isoproterenol." PloS one vol. 15,7 e0232507. 9 de julho de 2020, doi: 10.1371 / journal.pone.0232507
61. Holzhauser, CG, Cucciare, M., & Epstein, EE (2020). Efeitos de sexo e gênero na recuperação do transtorno por uso de álcool. Pesquisa de álcool: análises atuais , 40 (3), 03. <https://doi.org/10.35946/arcr.v40.3.03>
62. Fazal, L., Azibani, F., Vodovar, N., Cohen Solal, A., Delcayre, C. e Samuel, J.-L. (2014), diferenças sexuais na fisiopatologia cardíaca. Br J Pharmacol, 171: 555-566. <https://doi.org/10.1111/bph.12279>
63. Wilsnack RW, Wilsnack SC, Gmel G, Kantor LW. Gender Differences in Binge Drinking. Alcohol Res. 2018;39(1):57-76. PMID: 30557149; PMCID: PMC6104960.
64. Mazzu-Nascimento T, Melo DG, Morbioli GG, Carrilho E, Vianna FLS, Silva AA, Schuler-Faccini L. Teratogens: a public health issue – a Brazilian overview. Genetics and Molecular Biology. 2017;40(2):387-397. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0179.
65. 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.
66. 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.
67. Mesquita MA. Frequência dos efeitos do álcool no feto e padrão de consumo 36 de bebidas alcoólicas pelas gestantes de maternidade pública da cidade de São Paulo. São Paulo: IAMSPE, 2008. [tese de doutorado].
68. 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.000000000000146.
69. Altura BM, Zhang A, P-OC, Altura BT. Exposure of piglet coronary arterial muscle cells to low alcohol results in elevation of intracellular free Ca²⁺: relevance to fetal alcohol syndrome. European J. Pharmacology. 1996;314(3):R9-R11. doi:10.1016/S0014-2999(96)00739-X.

70. Serano M, Han M, Brinez P, Linask KK. Fetal alcohol syndrome: Cardiac birth defects in mice and prevention with folate. *Am J Obstetr Gynecology*. 2010;203(1):75-e7. doi:10.1016/j.ajog.2010.03.017.
71. Grewal J, Carmichael SL, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM. Maternal periconceptional smoking and alcohol consumption and risk for select congenital anomalies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82(7):519–526. doi:10.1002/bdra.20461.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circ Res*. 2009;105(12):1164-1176. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209809.
77. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Def. Res A Clin Mol Terat*. 2011;91(6):535–550. doi:10.1002/bdra.20810.
78. 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.
79. 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.
80. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabol*. 1987;36:458-462. doi:10.1016/0026-0495(87)900436

81. Kobor MS, Weinberg J. Focus On: Epigenetics and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Alc Res Health*. 2011;34(1):29-37. PMID:23580038.
82. 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.
83. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2004;40(5):311-20.
84. 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.
85. 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
86. Lander ES, Weinberg, RA. Genomics: journey to the center of biology. *Science*. 2000;287(5459):1777-1782. doi:10.1126/science.287.5459.1777.
87. 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/>.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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].

92. Nicholson, K. M., & Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*, 14(5), 381–395. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00271-6](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00271-6)
93. Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(16), 2502–2508. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9335>
94. Bozi, Luiz Henrique Marchesi. Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico [tese]. São Paulo: , Escola de Educação Física e Esporte; 2015 [citado 2021-12-05]. doi:10.11606/T.39.2015.tde-28102015-071259
95. Zhang, Y., Xia, Z., La Cour, K. H., & Ren, J. (2011). Activation of Akt rescues endoplasmic reticulum stress-impaired murine cardiac contractile function via glycogen synthase kinase-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeation pore opening. *Antioxidants & redox signaling*, 15(9), 2407–2424. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3751>
96. Valiatti, F. B., Crispim, D., Benfica, C., Valiatti, B. B., Kramer, C. K., & Canani, L. H. (2011). Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética [The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 55(2), 106–113. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000200002>
97. Kalil, R. A., Salles, F. B., Giusti, I. I., Rodrigues, C. G., Han, S. W., Sant'Anna, R. T., Ludwig, E., Grossman, G., Prates, P. R., Sant'anna, J. R., Teixeira Filho, G. F., Nardi, N. B., & Nesralla, I. A. (2010). VEGF gene therapy for angiogenesis in refractory angina: phase I/II clinical trial. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 25(3), 311–321. <https://doi.org/10.1590/s0102-76382010000300006>
98. Singh, R., & Green, M. R. (1993). Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5093), 365–368. <https://doi.org/10.1126/science.8420004>
99. Julian, G. S., Oliveira, R. W., Tufik, S., & Chagas, J. R. (2016). Analysis of the stability of housekeeping gene expression in the left cardiac ventricle of rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Jornal brasileiro de*

pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologiae

Tisilogia, 42(3), 211–214.

<https://doi.org/10.1590/S180637562015000000133>

100. Cavalcante, Isadora Pontes. Correlação da expressão de GLUT1, HK1, HK2 e HK3 com alta captação de 18/F-FDG em hiperplasia macronodular adrenal primária [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014 [citado 2021-12-05]. doi:10.11606/D.5.2014.tde-12012015-125308.
101. Waskova-Arnostova, P., Elsnicova, B., Kasparova, D., Hornikova, D., Kolar, F., Novotny, J., & Zurmanova, J. (2015). Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 119(12), 1487–1493. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01035.2014>.
102. van Wijk, R., Rijksen, G., Huizinga, E. G., Nieuwenhuis, H. K., & van Solinge, W. W. (2003). HK Utrecht: missense mutation in the active site of human hexokinase associated with hexokinase deficiency and severe nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*, 101(1), 345–347. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1851>
103. Rose, A. M., Mukhopadhyay, R., Webster, A. R., Bhattacharya, S. S., & Waseem, N. H. (2011). A 112 kb deletion in chromosome 19q13.42 leads to retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), 6597–6603. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7861>
104. PARREIRA, R.C. Estudo do remodelamento do proteoma cardíaco após a indução de hipertrofia por isoproterenol em camundongos. [tese]. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
105. Vora, S., Durham, S., de Martinville, B., George, D. L., & Francke, U. (1982). Assignment of the human gene for muscle-type phosphofructokinase (PFKM) to chromosome 1 (region cen leads to q32) using somatic cell hybrids and monoclonal anti-M antibody. *Somatic cell genetics*, 8(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/BF01538653>

106. García, M., Pujol, A., Ruzo, A., Riu, E., Ruberte, J., Arbós, A., Serafín, A., Albella, B., Felíu, J. E., & Bosch, F. (2009). Phosphofructo-1-kinase deficiency leads to a severe cardiac and hematological disorder in addition to skeletal muscle glycogenosis. *PLoS genetics*, 5(8), e1000615. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000615>
107. CENTENO, A.J.; ESCALANTE, C.J.; ESCALANTE, G.C. (2016). Síndrome de déficit de GLUT1: Reporte de un fenotipo atípico. *Rev. Mex Neuroci.* 17(1):98-104.
108. SANTOS, F.B. (2017). Origem dos genes das vias de secreção do sistema digestivo humano. [dissertação]. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais.
109. Silva, Tiago João da et al. Importance of GLUT1 in differential diagnosis of vascular anomalies. *Jornal Vascular Brasileiro* [online]. 2015, v. 14, n. 2 [Acessado 5 Dezembro 2021], pp. 168-176. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1677-5449.0069>>. ISSN 1677-7301. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.0069>.
110. SPERLING, M. A. *Pediatric endocrinology*. 3.ed. Filadélfia: Elsevier, 2008. 912 p
111. Ract, Erika Lia Brunetto. Participação da triiodotironina (T3) na regulação da expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: estudos in vivo e in vitro [tese]. São Paulo: , Instituto de Ciências Biomédicas; 2011 [citado 2021-12-07]. doi:10.11606/T.42.2011.tde-19032012-133606.
112. Acehan, D., Vaz, F., Houtkooper, R. H., James, J., Moore, V., Tokunaga, C., Kulik, W., Wansapura, J., Toth, M. J., Strauss, A., & Khuchua, Z. (2011). Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *The Journal of biological chemistry*, 286(2), 899–908. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171439>

113. Borkar, Minal et al. Identification of a Novel TAZ Gene Mutation in a Family With X-Linked Dilated Cardiomyopathy Barth Syndrome. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* [online]. 2015, v. 3 [Accessed 5 December 2021] , e140014. Available from: <<https://doi.org/10.1177/2326409814567131>>. Epub 19 June 2019. ISSN 2326-4594. <https://doi.org/10.1177/2326409814567131>.
114. Palmer, BR, Devereaux, CL, Dhamrait, SS et al. O polimorfismo G-866A comum do gene UCP2 e a sobrevida em pacientes diabéticos após infarto do miocárdio. *Cardiovasc Diabetol* 8, 31 (2009). <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-31>
115. Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P., & Marbán, E. (2003). Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circulation research*, 93(3), 192–200. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000085581.60>
116. Ruiz-Ramírez, A., López-Acosta, O., Barrios-Maya, MA, & El-Hafidi, M. (2016). Morte celular e insuficiência cardíaca na obesidade: papel das proteínas desacopladoras. *Medicina oxidativa e longevidade celular* , 2016 , 9340654. <https://doi.org/10.1155/2016/9340654>
117. Cadenas S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>
118. Allan AM, Chynoweth J, Tyler LA, Caldwell KK. A Mouse Model of Prenatal Ethanol Exposure Using a Voluntary Drinking Paradigm. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2003;27(12):2009-2016. doi:10.1097/01.ALC.0000100940.95053.72.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. Caldwell KK, Solomon ER, Smoake JJW, Djatche De Kamgaing CD, Allan AM. Sex-specific deficits in biochemical but not behavioral responses to delay fear conditioning in prenatal alcohol exposure mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2018;156:1-16. doi:10.1016/j.nlm.2018.10.002.
123. 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.drugalcdep.2017.04.010.
124. 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.
125. 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.
126. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. 1. ed. Londres: CRC Press; 1988.
127. Villain H, Benkahoul A, Birmes P et al. Influence of early stress on memory reconsolidation: Implications for post-traumatic stress disorder treatment. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0191563. doi:10.1371/journal.pone.0191563.
128. 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.

129. 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.
130. Sherwood, Louis M. et al. Tumor Angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 18 nov. 1971. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm197111182852108>.
131. Chatterjee, Sampurna *et al.* Tumor VEGF: vegfr2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 123, n. 4, p. 1732-1740, 1 mar. 2013. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci65385>
132. Shibuya, Masabumi et al. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules & Therapeutics*, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-9, 31 jan. 2014. The Korean Society of Applied Pharmacology. <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2013.113>.
133. Barandon, Laurent et al. Frizzled A, a novel angiogenic factor: promises for cardiac repair. *European Journal Of Cardio-Thoracic Surgery*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 76-83, jan. 2004. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s1010-7940\(03\)00506-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1010-7940(03)00506-2).
134. Ji H, Pesce C, Zheng W, Kim J, Zhang Y, Menini S, et al. Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H43–7.
135. Takenouchi Y, Kobayashi K, Matsumoto T, Kamata K. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis* 2009;206:397–404.
136. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Ritter JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension* 1998;32:730–4.7
137. Sader, M. A., & Celermajer, D. S. (2002). Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*, 53(3), 597–604. [https://doi.org/10.1016/s00086363\(01\)00473-4](https://doi.org/10.1016/s00086363(01)00473-4)

138. Ylä-herttua, Seppo et al. Vascular Endothelial Growth Factors. Journal Of The American College Of Cardiology, [S.L.], v. 49, n. 10, p. 1015-1026, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>.
139. OUDIT, G et al. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. Journal Of Molecular And Cellular Cardiology, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 449-471, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.015>.
140. ZENG, Yan et al. A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. Theranostics, [S.L.], v. 7, n. 16, p. 3842-3855, 2017. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.19764>.
141. ZHOU, Hui-Zhong et al. Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC- ϵ and Akt. American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology, [S.L.], v. 283, n. 1, p. 165-174, 1 jul. 2002. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00408.2001>.
142. MATSUI, Takashi et al. Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. Journal Of Biological Chemistry, [S.L.], v. 277, n. 25, p. 22896-22901, jun. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m200347200>.
143. NAGOSHI, Tomohisa et al. PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. Journal Of Clinical Investigation, [S.L.], v. 115, n. 8, p. 2128-2138, 1 ago. 2005. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci23073>.
144. Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. Akt/eNOS pathway activation in endothelium-dependent relaxation is preserved in aortas from female, but not from male, type 2 diabetic mice. Pharmacol Res. 2012; 65(1):56-65.

145. BRAILE, Mariantonia et al. VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 15, p. 5294, 26 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21155294>.
146. TANG, Junming et al. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway. *Experimental Cell Research*, [S.L.], v. 315, n. 20, p. 3521-3531, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.026>.
147. JÉGOU, Sylvie et al. Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain. *Annals Of Neurology*, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 952-960, dez. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.23699>.
148. RADEK, Katherine A. et al. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *American Journal Of Physiology Heart And Circulatory Physiology*, [S.L.], v. 295, n. 1, p. 174-184, jul. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00699.2007>.
149. DOENST, Torsten et al. Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Circulation Research*, [S.L.], v. 113, n. 6, p. 709-724, 30 ago. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.113.300376>.
150. LOPASCHUK, G. D et al. Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovascular Research*, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 1172-1180, 1 dez. 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/26.12.1172>.
151. BARGER, Philip M. et al. Fatty Acid Utilization in the Hypertrophied and Failing Heart: molecular regulatory mechanisms. *The American Journal Of The Medical Sciences*, [S.L.], v. 318, n. 1, p. 36, jul. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1097/00000441-199907000-00006>.
152. Zorzano, Antonio et al. Regulation of Glucose Transport, and Glucose Transporters Expression and Trafficking in the Heart. *The American Journal Of Cardiology*, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 65-76, ago. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00459-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00459-1).

153. Wilson, John E. et al. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal Of Experimental Biology*, [S.L.], v. 206, n. 12, p. 2049-2057, 15 jun. 2003. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00241>.
154. GRIFFIN, Lisa D. et al. Developmental expression of hexokinase 1 in the rat. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Gene Structure And Expression*, [S.L.], v. 1129, n. 3, p. 309-317, fev. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90508-w](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(92)90508-w).
155. SOÑANEZ-ORGANIS, José G. et al. HIF-1 α and PPAR γ during physiological cardiac hypertrophy induced by pregnancy: transcriptional activities and effects on target genes. *Gene*, [S.L.], v. 591, n. 2, p. 376-381, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.025>
156. Garcia-Herreros M, Aparicio IM, Rath D, Fair T, Lonergan P. Differential glycolytic and glycogenogenic transduction pathways in male and female bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(2):344-52.
157. BARBER, Robert D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of gapdh mrna expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 389-395, 11 maio 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>.
158. KARLINER, Joel S. et al. Elevated Serum Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase Activity Following Acute Myocardial Infarction. *Chest*, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 318-323, out. 1971. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.60.4.318>.
159. ZHONG, Hua et al. Direct Comparison of GAPDH, β -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 259, n. 3, p. 523-526, jun. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1999.0815>.
160. Liao R, Jain M, Cui L, et al. Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice. *Circulation*. 2002;106(16):2125-2131.
doi:10.1161/01.cir.0000034049.61181.f3

161. Jiang H, Jia D, Zhang B, et al. Exercise improves cardiac function and glucose metabolism in mice with experimental myocardial infarction through inhibiting HDAC4 and upregulating GLUT1 expression. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(3):28. Published 2020 Mar 31. doi:10.1007/s00395-020-0787-1
162. Garlid AO, Schaffer CT, Kim J, Bhatt H, Guevara-Gonzalez V, Ping P. TAZ encodes tafazzin, a transacylase essential for cardiolipin formation and central to the etiology of Barth syndrome. *Gene.* 2020;726:144148.
doi:10.1016/j.gene.2019.144148
163. Wu S, Luo C, Hameed NUF, Wang Y, Zhuang D. UCP2 silencing in glioblastoma reduces cell proliferation and invasiveness by inhibiting p38 MAPK pathway. *Exp Cell Res.* 2020;394(1):112110.
doi:10.1016/j.yexcr.2020.112110
164. ABU-ELHEIGA, L. et al. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/highcarbohydrate diets. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 100, n. 18, p. 10207-10212, 14 ago. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1733877100>.
165. KUTSCHE, Hanna Sarah et al. Alterations in Glucose Metabolism During the Transition to Heart Failure: the contribution of ucp-2. *Cells*, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 552, 27 fev. 2020. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/cells9030552>
166. HORVATH, Balazs et al. Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold. *Biochemical Pharmacology*, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 369-374, ago. 2002. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s00062952\(02\)01167-x](http://dx.doi.org/10.1016/s00062952(02)01167-x).

167. WU, Hui et al. UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy. *Journal Of Cellular Biochemistry*, [S.L.], v. 120, n. 9, p. 15455-15466, 13 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.28812>.
168. RAZEGHI, Peter et al. Metabolic Gene Expression in Fetal and Failing Human Heart. *Circulation*, [S.L.], v. 104, n. 24, p. 2923-2931, 11 dez. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hc4901.100526>.
169. Boss, Olivier et al. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *The FASEB Journal*, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 335-339, mar. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.12.3.335>.
170. Agip AA, Blaza JN, Bridges HR, Viscomi C, Rawson S, Muench SP, Hirst J. Cryo-EM structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically defined states. *Nat Struct Mol Biol*. 2018; 25(7):548-556.
171. Saini-Chohan, HK, Holmes, MG, Chicco, AJ, Taylor, WA, Moore, RL, McCune, SA, Hickson-Bick, DL, Hatch, GM e Sparagna, GC (2009). A biossíntese da cardiolipina e as enzimas de remodelação são alteradas durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. *Journal of Lipid Research*, 50 (8), 1600–1608. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800561-JLR200>

