

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIEL ALMEIDA DA SILVA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE
PEPTÍDEOS VASOATIVOS DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E
CALICREÍNA-CININAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

São Paulo

2022

GABRIEL ALMEIDA DA SILVA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE
PEPTÍDEOS VASOATIVOS DOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E
CALICREÍNA-CININAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

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

2022

Silva, Gabriel Almeida da.

Efeitos da exposição pré-natal ao álcool na expressão de peptídeos vasoativos dos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas no hipocampo de camundongos. / Gabriel Almeida da Silva. 2022.

48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

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

1. Exposição pré-natal ao álcool. 2. Sistema renina-angiotensina. 3. Sistema calicreína-cininas. 4. Hipocampo.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616

São Paulo, 14 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **GABRIEL ALMEIDA DA SILVA**

Título da dissertação: **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL NA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS VASOATIVOS DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E CALICREÍNA-CININAS NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS.**

Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JUNIOR _____ *Jasjr*

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI _____ *AD*

Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA _____ *MC*

**Dedico este trabalho a toda a
minha família, a cada tio (a) e pai
e mãe, por todo suporte e
compreensão, por cada palavra
de incentivo e de consolo em
todos esses anos de mestrado.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vanessa E. Almeida e Jairo Cardoso, por todo apoio que me possibilitou dedicação integral ao mestrado.

À minha irmã, Rafaela Almeida, pelo carinho e parceria, sem a qual não seria possível realizar a parte teórica desse artigo.

Aos meus amigos, William Cardoso, Suse Caroline, Danilo Carlos, Julia Cardoso, Vinicius Cardoso e Pedro Celice, por cada conversa, cada conselho, cada risada que me ajudou a manter a sanidade durante a realização do protocolo de pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, por todas as parcerias que foram formadas durante as disciplinas.

À minha amiga Gabrielle Moreira, que me inspira a ser um cientista melhor a cada dia.

À todas as secretárias do Programa de Pós-Graduação, Daniela que me deu todo o suporte no início da minha jornada e à Camila por todos os e-mails me lembrando das minhas pendências.

Aos colegas do grupo de pesquisa Leonardo, Guilherme e Bruna, e principalmente ao Allan por todos os conselhos, dicas e palavras de incentivo. Sempre muito paciente e atencioso, mesmo com todas as minhas falhas.

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

A todas as técnicas de laboratório, Núbia e Fernanda, por todo o auxílio com os equipamentos e materiais do laboratório, e também à Dra. Nurya,

responsável pelo Biotério da Universidade Nove de Julho, pelo cuidado com os animais.

Ao CAPES, pela bolsa-auxílio durante a maior parte do mestrado.

Agradeço também ao Senhor que está nos céus, e que em sua misericórdia, não me trata de acordo com as minhas iniquidades. Meu coração é atraído em gratidão a ti, por tua maravilhosa graça e condescendência para comigo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor Dr. José Antônio Silva Junior, meu orientador, por toda a paciência, apoio e disposição. Sou grato por cada puxão de orelha, por cada ensinamento que levarei comigo pelo resto da vida. Que em um próximo projeto de pesquisa eu possa pôr em prática todo o aprendizado adquirido durante essa jornada.

RESUMO

A exposição pré-natal ao álcool (EPA) prejudica o desenvolvimento fetal e no Sistema Nervoso Central (SNC) pode resultar em inflamação e morte neuronal. Assim, pode contribuir para fenótipos de disfunções neurológicas e alterações de comportamento, memória e aprendizagem. Estas últimas alterações são controladas pelo hipocampo. A expressão hipocampal dos componentes dos sistemas peptídicos Renina-Angiotensina (SRA) e Calicreína-Cininas (SCC) já foi descrita, entretanto, uma possível modulação gerada pelo álcool destes sistemas na EPA ainda é desconhecida. Este estudo exploratório analisou os efeitos da EPA na expressão dos sistemas peptídicos SRA e SCC no hipocampo de camundongos de ambos os sexos. Assim, camundongos isogênicos C57Bl/6 foram expostos ao álcool durante a gestação na concentração de 10% (v/v). Os hipocampos dos camundongos, no dia pós-natal 45 (PN45), foram processados para análise diferencial de expressão de RNA mensageiro (RNAm) de componentes dos sistemas SRA e SCC. Além da diferença de expressão basal de RNAm de peptídeos dos SRA entre os sexos (grupo controle), a EPA modulou a expressão de RNAm dos componentes dos dois sistemas em machos e fêmeas, evidenciando um possível papel protetor ao dano gerado pelo álcool no hipocampo. A elevada expressão de RNAm de AT1 e ECA em machos e uma possível modulação do SRA pelo estrógeno sugere que as fêmeas do grupo EPA possam ser protegidas pelo efeito do álcool. O uso de medicamentos que regulam estes sistemas pode ser uma estratégia para reduzir os efeitos da EPA no hipocampo.

Palavras-chave: Exposição pré-natal ao álcool, sistema renina-angiotensina, sistema calicreína-cininas, hipocampo.

ABSTRACT

Prenatal exposure to alcohol (PAE) impairs fetal development and can result in neuronal inflammation and death in the Central Nervous System (CNS). Thus, it can contribute to phenotypes of neurological disorders and changes in behavior, memory, and learning. These latter changes are controlled by the hippocampus. Hippocampal expression of components of the Renin-Angiotensin (RAS) and Kallikrein-kinin (KKS) peptide systems has already been described, however, a possible modulation generated by alcohol of these systems in PAE is still unknown. This exploratory study analyzed the effects of PAE on the expression of the RAS and KKS peptide systems in the hippocampus of mice of both sexes. Thus, isogenic C57Bl/6 mice were exposed to alcohol during pregnancy at a concentration of 10% (v/v). On a postnatal day 45 (PN45), mouse hippocampi were processed for differential analysis of messenger RNA (mRNA) expression of components of the RAS and KKS systems. In addition to the difference in baseline mRNA expression of RAS peptides between genders (control group), PAE modulated mRNA expression of components of both systems in males and females, evidencing a possible protective role against damage caused by alcohol in the hippocampus. The high expression of AT1 and ACE mRNA in males and a possible RAS modulation by estrogen suggest that females from the PAE group may be protected by the effect of alcohol. The use of drugs that regulate these systems may be a strategy to reduce the effects of PAE on the hippocampus.

Keywords: Prenatal alcohol exposure, renin-angiotensin system, kallikrein-kinins system, hippocampus.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1 Exposição Pré-Natal ao álcool.....	12
1.2 Sistema Renina-angiotensina.....	14
1.3 Sistema Calicreína-cininas.....	17
2. Objetivo.....	20
2.1 Principal.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. Método.....	21
3.1 Modelo animal.....	21
3.1.1 Protocolo grupo controle e etanol.....	22
3.2 Coleta dos materiais biológicos.....	24
3.3 PCR quantitativo.....	25
a. Extração do RNA.....	25
b. Tratamento do RNA total e Integridade das amostras.....	26
c. Transcrição reversa.....	27
d. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR.....	27
3.4 Análise estatística.....	28
4. Resultados.....	29
5. Discussão.....	33
5.1 Sistema Renina-angiotensina.....	33
5.2 Sistema Calicreína-cininas.....	37
6. Conclusão.....	40
7. Referências Bibliográficas.....	41
8. Anexo.....	49

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o uso do álcool ou etanol (EtOH) advém do mesmo período em que surgiu a agricultura e a invenção da cerâmica, tendo sua origem a partir da fermentação natural de frutas e cereais. O consumo de bebidas alcoólicas já registrado desde os povos ancestrais, como os celtas, babilônicos, gregos, egípcios e os romanos. [1] O álcool é a droga utilizada há mais tempo pelo homem e com maior poder viciante, sendo aceita pela sociedade. [2] [3]

O álcool é consumido em todas as regiões do mundo, sendo esse consumo concentrado em menos da metade da população mundial. Em 2018, a Organização Mundial da Saúde publicou o Relatório Global sobre Álcool e Saúde referente ao ano de 2016, indicando que 43% da população com 15 anos ou mais (15+ anos) consumiu álcool no último ano, registrando a média per capita mundial de 6,4 L de álcool. No Brasil, 40% da população consome álcool, sendo a maioria dos consumidores do sexo masculino (44% dos homens e 27,3 das mulheres), registrando o consumo per capita 7,8 L de álcool. Mesmo sendo maior que a média mundial (6,4 L de álcool), o índice brasileiro é inferior à média da região das Américas (8,0 L) [4] [5]. O consumo brasileiro por homens e total (quando somados homens e mulheres) tem apresentado diminuição nos últimos anos. Entretanto, o consumo de álcool por mulheres, embora menor que dos homens, é o único que tem apresentado aumento progressivo ao passar dos anos na última década [1].

Os efeitos do etanol dependem do seu metabolismo e concentração no sangue humano. Sendo uma molécula hidrossolúvel, de baixo peso molecular, com fórmula química C_2H_6O (CH_3CH_2OH), sua absorção é facilitada no estômago (20%) e intestino delgado (80%). Após absorção, o álcool é

metabolizado pelo fígado, seja pela via oxidativa ou não oxidativa. O restante do etanol (menos de 5%) é eliminado através da respiração, suor e urina [6] [7] [8] [9].

O álcool, quando consumido moderadamente, é oxidado a acetaldeído (CH_3CHO) em reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (ADH) no citosol dos hepatócitos e participação da forma oxidada da dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD^+), via fosforilação oxidativa (**Figura 1**) [10] [11]. Se o consumo de álcool for excessivo, a via microsomal oxidante (MEOS) é ativada no retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos, ajudando na eliminação de compostos tóxicos pela ativação do citocromo P450 IIE1 (CYP2E1). A ADH, converte o álcool em acetaldeído por meio de moléculas de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina hidrogenado (NADPH) e O_2 com gasto de ATP (**Figura 1**). Uma terceira via de metabolização do álcool é a via das catalases nos peroxissomos, tendo a capacidade de oxidar uma pequena quantidade de álcool na presença de um gerador de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sem a necessidade de NAD como cofator, formando acetaldeído [12]. O acetaldeído é convertido em acetato pela ação das aldeído desidrogenases (ALDH) nas mitocôndrias, possibilitando a sua conversão em acetil-coenzima A (Acetil-CoA) por enzimas como a Acil-CoA sintetase. Pela incapacidade dessas enzimas (ADH) de metabolizar o álcool em indivíduos com consumo crônico, é necessário a ativação dessas duas vias alternativas (**Figura 1**) [13] [7] [8].

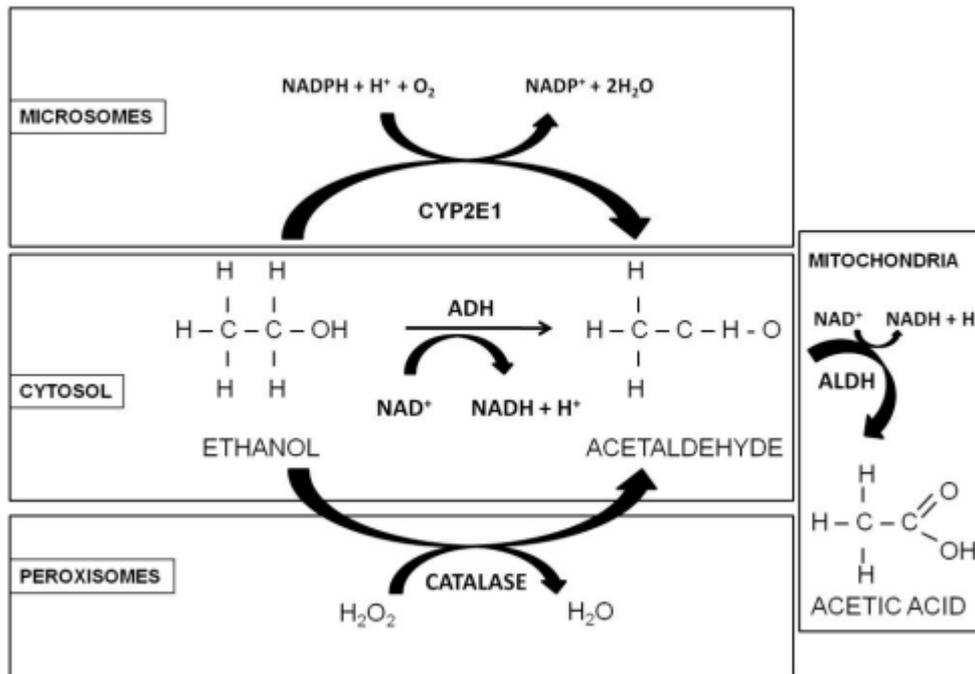


Figura 1. Vias oxidativas do metabolismo do álcool. As enzimas álcool desidrogenase (ADH), citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e catalase contribuem para metabolismo do álcool. ADH, presente no citosol, converte etanol em acetaldeído. Essa reação envolve um transportador intermediário de elétrons, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), que é reduzido por dois elétrons para formar NADH . Catalase, localizada em peroxissomos, requer peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para oxidar o álcool. CYP2E1, presente predominantemente nos microsomas da célula metabolizam o álcool em acetaldeído em concentrações de etanol. O acetaldeído é metabolizado principalmente pelo aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) na mitocôndria para formar acetato e NADH (retirado de AVALOS, MOLINA, 2010 [3]).

1.1 EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL (EPA)

Considera-se exposição pré-natal ao álcool o álcool consumido por gestantes de forma deliberada ou não, não importando a quantidade ou frequência. De fato, quantidades pequenas de álcool consumidas durante a gestação podem estar correlacionadas a efeitos neurológicos e comportamentais na criança [14]. A síndrome alcoólica fetal (SAF) e os distúrbios do espectro alcoólico fetal (FASD) resultam da exposição intrauterina ao álcool e são as causas não hereditárias mais comuns de deficiência intelectual. Estudos sobre EPA relatam deficiências de crescimento, anormalidades neurológicas, retardo no desenvolvimento e deficiência intelectual em crianças que foram expostas ao álcool durante a gestação [14] [15]. A SAF é comumente

diagnosticada erroneamente, impedindo que as crianças afetadas recebam tratamento e intervenção necessários em tempo hábil. O diagnóstico é baseado na presença de características clínicas como retardo de crescimento pré-natal e/ou pós-natal, dismorfologia facial, disfunção do sistema nervoso central e deficiências neurocomportamentais. A FASD é um diagnóstico mais amplo que abrange pacientes com SAF [16].

Os efeitos tóxicos da EPA são bem conhecidos e associados a passagem facilitada do álcool pelas barreiras placentárias e hematoencefálicas, resultando em dano do desenvolvimento de células fetais. Sabe-se que o álcool pode modular inúmeras moléculas-alvo e múltiplos mecanismos em diferentes estágios de desenvolvimento ou em diferentes limiares de dose de exposição, podendo contribuir para os diversos fenótipos observados na FASD [15].

No Brasil, os últimos dados disponíveis indicam que a EPA é responsável por 11,2% de óbitos de recém-nascidos, sendo considerada a segunda maior causa de mortalidade infantil, como também 37% de todas as internações pediátricas [4] [5]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2017, 9,8% das gestantes consumiram álcool durante a gestação [4].

Os efeitos da EPA podem variar consideravelmente, uma vez que dependem de relação com fatores ambientais, genéticos e da saúde da gestante [17] [15]. Essa exposição pode resultar em alterações celulares importantes como modificações na forma, tamanho, posição, número e adesividade celular e, qualquer perturbação ocorrida durante essa etapa, pode induzir dismorfogênese, modificando o desenvolvimento fetal. Entretanto, muitas dessas alterações são observadas ao nascimento e algumas ocorrem silenciosamente, predispondo ao longo da vida, a doenças crônicas [15].

Independente da dose, o álcool quando ingerido pela gestante e absorvido, por meio da circulação, chega ao feto em questão de poucos minutos, podendo causar intoxicação no sistema nervoso central (SNC) da mãe e do feto. O álcool prejudica a atividade cerebral, coordenação motora e alterando o comportamento. Além disso, foram relatados efeitos do álcool na síntese, liberação e sinalização de neurotransmissores, incluindo GABA, glutamato e serotonina [3].

O álcool, no feto, pode produzir diferentes efeitos na neurogênese no hipocampo. A neurogênese hipocampal implica na formação de memórias episódicas, aprendizagem, controle comportamental, desempenho emocional e cognitivo, na atenção, no humor, em tomada de decisões, no controle de impulsos e na depressão. Especula-se que déficits afetivos e cognitivos após a ingestão de etanol podem estar ligados à neurogênese hipocampal interrompida. O comprometimento da neurogênese hipocampal é mediado pela inibição da proliferação de células-tronco neurais, causando aumento da morte celular e diminuindo o número de células sobreviventes. Experimentos com animais, incluindo adultos, mostraram que o consumo de álcool pode suprimir a neurogênese hipocampal [18] [19]. O álcool pode afetar etapas da neurogênese, incluindo proliferação neuronal, diferenciação, migração, sobrevivência e integração de circuitos. O grau de inibição da neurogênese, porém depende da dose, duração, padrões de uso do álcool e da idade do consumidor [20].

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

O papel tradicional atribuído ao sistema renina-angiotensina tem sido o de manter o equilíbrio hidroeletrólítico. Isso é conseguido por meio da liberação do hormônio aldosterona, que retém o sal, e pela promoção da ingestão de líquidos

por meio da indução da sede [21]. Quando o fluxo sanguíneo para o rim é reduzido ou quando a pressão sanguínea diminui, esses eventos estimulam as células justaglomerulares do rim a secretar renina. A renina é uma enzima que retira a extremidade da proteína plasmática angiotensinogênio para formar o decapeptídeo angiotensina I (ANG I). A enzima conversora de angiotensina então separa dois aminoácidos adicionais para formar o octapeptídeo biologicamente ativo angiotensina II (ANG II), que estimula a sede e a liberação de vasopressina e aldosterona. Todos esses processos promovem a retenção de líquidos e eletrólitos e, ao fazê-lo, restauram a homeostase. Embora dependentes de órgãos-alvo para controle da pressão arterial, todos componentes do SRA foram expressos no cérebro, inclusive no hipocampo, onde modulam de forma ativa diversas funções, entre elas o estresse, a ansiedade, o aprendizado e aquisição de memória (**Figura 2**) [22].

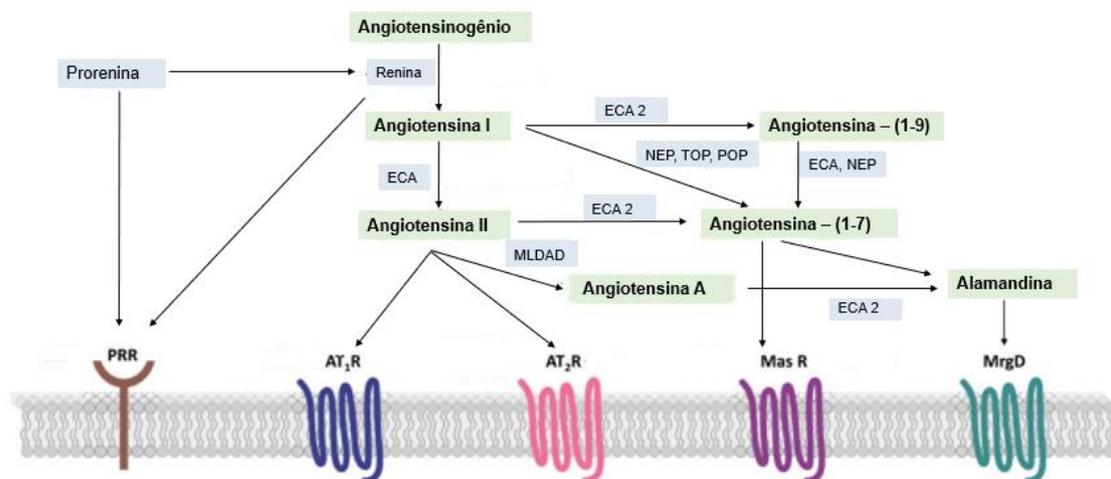


Figura 2. Diagrama do sistema renina-angiotensina (Adaptado de White et al., 2019)

Os receptores de angiotensina AT1 e AT2 são os mais estudados. Estes têm uma grande afinidade para Ang II, embora haja diferenças no desfecho de suas ligações. O receptor AT1 é altamente expresso em adultos e medeia a vasoconstrição induzida por Ang II, proliferação, inflamação e remodelação da

matriz extracelular. Por outro lado, a ativação do receptor AT2 produz efeitos opostos, proporcionando uma ação protetora [22]. Outro receptor importante do SRA é o receptor, Mas. Este receptor (com ações antagonistas ao receptor AT1) está ligado à regulação neuronal observada na ansiedade.

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares [24].

Porém, sabe-se há algum tempo que existe uma relação entre o consumo de álcool e o SRA em modelos animais e humanos, inclusive em indivíduos com consumo leve de álcool e em alcoólicos [25] [26] [27].

Além disso, a infusão intracerebroventricular de ANG II aumenta a ingestão de álcool [28]. A administração intracerebroventricular de ANG II, um dipsógeno potente em camundongos BALB/C, foi utilizado para avaliar o funcionamento do mecanismo da sede [29]. Os resultados desses experimentos revelaram que o consumo prolongado de solução de etanol não influenciou a eficácia da ANG II para estimular a ingestão de água. Surpreendentemente, no entanto, observou-se que a infusão de ANG II não estimulou a ingestão de solução de etanol, mesmo nos camundongos sensibilizados que estavam acostumados a beber solução de etanol para satisfazer suas necessidades diárias de água. A incapacidade de ANGII de estimular a ingestão de solução de etanol foi devidamente relacionado ao sabor aversivo da solução de etanol [30]. Weisinger et al. [29] relataram que a infusão de ANG II causa aumento na ingestão de solução de etanol de camundongos C57Bl/6, em contraste de estudo anterior com camundongos BALB/C [28].

Fitts [31] demonstrou que a administração central de ANG II ou administração periférica de baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril, causou um aumento na ingestão de solução de etanol.

A ingestão de solução de etanol causada pelo captopril foi reduzida por lesão cerebral, sugerindo que a conversão de ANG I para ANG II em regiões circumventriculares, e não alterações nos níveis séricos de ANG II, medeia o aumento na ingestão de solução de etanol. Grupp e colaboradores [21] [32] [33] mostraram que tratamentos que aumentam a angiotensina sanguínea, por exemplo, administração periférica de ANG II, desativavam a ingestão de solução de etanol, enquanto os tratamentos que diminuem os níveis sanguíneos de ANG II provocaram o início da ingestão da solução de etanol. Paradoxalmente, Robertson e colaboradores [34] relatam que a administração periférica de captopril ou enalapril, outro inibidor da enzima conversora de angiotensina, também diminuiu a ingestão de etanol. Nenhuma dessas alterações foi bloqueada pela administração central de antagonistas da enzima renina-angiotensina ou no caso de administração periférica de ANG II, lesão da área postrema [35]. Entretanto, na EPA, ainda não está relatada uma possível modulação da expressão de componentes do SRA.

1.3 SISTEMA CALICREÍNA CININA (SCC)

As cininas são os efetores vasoativos deste sistema, sendo geradas pelas calicreínas teciduais e plasmáticas no plasma e em outros fluidos biológicos, sendo a calicreína tecidual a cininogenase mais potente [35]. A ação das cininas é mediada pela ativação dos receptores de cininas B1 e B2, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G. O receptor B1 apresenta alta afinidade para os metabólitos das cininas des-Arg⁹-bradicinina e des-Arg¹⁰-

calidina, que são liberados pela ação das carboxipeptidases (Carboxipeptidase N – encontrada no plasma – e M – encontrada nos tecidos). O receptor B2 é constitutivo e apresenta alta afinidade pela bradicinina e baixa afinidade pelo seu produto de clivagem C-terminal des-Arg⁹-bradicinina. As calicreínas agem em dois substratos, o cininogênio de alto peso molecular e baixo peso molecular [35] [36].

No sistema nervoso, o receptor B1, mesmo sendo geralmente um receptor induzido, é expresso de forma constitutiva em neurônios do tálamo, medula espinhal e hipotálamo. O receptor B2 é expresso no córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral, núcleos basais, epêndimados e ventrículos laterais. A expressão de ambos os receptores pode ser estimulada por lesão tecidual causada por estímulos pró-inflamatórios, estresse oxidativo, exposição a citocinas como IL-1 e TNF-alfa [37].

O sistema Calicreína-cininas (SCC) compõe um sistema de resposta inflamatória que exerce uma série de funções pleiotrópicas na permeabilidade vascular e inflamação, bem como trombose e coagulação do sangue [38]. Enquanto o SCC tem um papel importante na manutenção no tônus do músculo liso vascular, sua disfunção prejudica vários órgãos [39]. A ativação do SCC tem sido associada a vários distúrbios, incluindo nefropatia diabética e retinopatia [40] [41], doenças cardiovasculares [42] e doenças renais [43]. Ademais, os componentes do SCC também foram identificados no sistema nervoso e influenciam a integridade da unidade neurovascular e participam na progressão de doenças neurológicas [44] [45] [46] [47].

As cininas são um grupo de oligopeptídeos com características químicas e farmacológicas semelhantes [48]. No ambiente cerebrovascular, esses

polipeptídios possuem funções autócrinas e/ou parácrinas devido à sua curta duração [49]. Além disso, foi demonstrado que a expressão de ambos os receptores de cininas B1R e B2R é modulada em condições de lesão tecidual gerada por estresse oxidativo, estímulos pró-inflamatórios como lipopolissacarídeo, endotoxinas, exposição a citocinas (IL-1 e TNF-alfa) [37] [50] Gouveia et al., 2014).

Entretanto, até o presente momento não há descrito na literatura se há efeito da EPA sobre o SCC e poucos relatos do SRA e respectivas associações com danos no SNC. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da EPA na modulação da expressão de peptídeos vasoativos dos sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas em hipocampo de camundongos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo principal

Analisar o efeito da exposição pré-natal ao álcool em peptídeos vasoativos dos sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas em hipocampo de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Em hipocampos de camundongos isogênicos machos e fêmeas da linhagem C57Bl/6 submetidos à exposição pré-natal ao álcool serão quantificados, no dia pós-natal 45 (PN45):

- a expressão de RNA mensageiro de componentes do Sistema Renina-Angiotensina: receptores AT1 e AT2, pró-renina, enzima conversora de angiotensina ECA1 e ECA2;
- a expressão de RNA mensageiro de componentes do Sistema Caliceína-Cininas: receptores B1 e B2 de bradicinina e caliceína tecidual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Animal

Para a obtenção da prole, objeto de estudo deste projeto, foram utilizados 20 camundongos isogênicos (15 fêmeas e 5 machos) da linhagem C57Bl/6 com mesma idade e pesos de 20 (\pm 2) gramas. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Nove de Julho, Campus Vergueiro, e foram mantidos em mesmo local, confinados em caixas plásticas apropriadas com maravalha, ciclo de luz (ciclo claro/ escuro de 12h/12h) e temperatura (21 ± 2 °C) e umidade controlados, bem como alimentação e água *ad libitum* [51] [52]. Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NRC, 8ª Ed., 2011) e recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/ UNINOVE) com o número de protocolo 3145230522 (ID 000309).

A exposição pré-natal ao álcool foi executada usando soluções adoçadas com sacarina [53] [54] [55]. Foi comprovado que água adoçada aumenta o consumo entre os roedores. Não só isso, foi mostrado também, que a quantidade ingerida metabolizada pelo organismo é menos de 12%, tendo o restante eliminado pela urina [15] [51] [56] [57].

As fêmeas foram separadas em grupo Controle – CT ($n = 4$) e grupo de Exposição pré-natal ao álcool – EPA ($n = 11$), entretanto, os machos foram utilizados como reprodutores. Todos os progenitores foram eutanasiados com altas doses de anestésicos (cetamina 300 mg/kg e xilazina 90 mg/kg) após o desmame dos filhotes (PN30), não sendo utilizados para as demais análises. O descarte das carcaças dos progenitores foi realizado em sacos plásticos

apropriados, armazenados em freezer e, posteriormente, encaminhados à empresa especializada [58].

3.1.1 Protocolo grupo controle e Exposição pré-natal

As fêmeas do grupo Controle (n = 4) e Exposição pré-natal ao álcool – EPA (n = 11) foram acondicionadas unitariamente em caixas plásticas com maravalha e com livre acesso à ração e água e tiveram seus pesos e consumos de água aferidos diariamente até o final do protocolo (PN45).

Camundongos fêmeas do grupo controle e exposição pré-natal ao álcool, receberam 24 horas de livre acesso a 400ml de água com 1g de sacarina sódica – P.A. (Sac) (C7H5O3NS · 2H2O) (PolyStar, São Paulo, Lote: 18071801) por 2 semanas, sendo realizada a troca a cada dois dias para evitar o amargor decorrente da degradação da sacarina. **(Figura 3).**

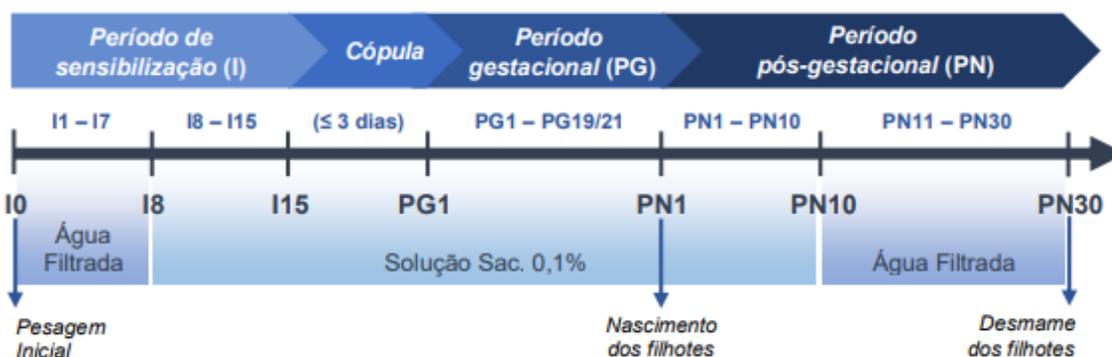


Figura 3. Protocolo grupo Controle. I – Período introdutório; PG – Período gestacional; PN – Período pós-gestacional. Observa-se a linha do tempo evidenciando o tipo de solução disponibilizada em cada etapa do protocolo. (arquivo pessoal).

As fêmeas do grupo etanol, após duas semanas, receberam álcool na solução de sacarina, enquanto o grupo controle continuou recebendo apenas a sacarina **(Figura 4)**. A concentração de etanol foi aumentada gradualmente para evitar a desnutrição materna pelo consumo excessivo. Sendo assim, a cada 2 dias, foi administrado 2% de etanol, depois para 5% e finalmente para 10% (p/v)

preparadas no volume de 1000 ml com adição de 0,1% de Sac [52] de acordo com a **Tabela 1**.

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

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

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

Após 2 semanas, o macho foi introduzido na caixa da fêmea. Confirmada a gestação o macho foi retirado.

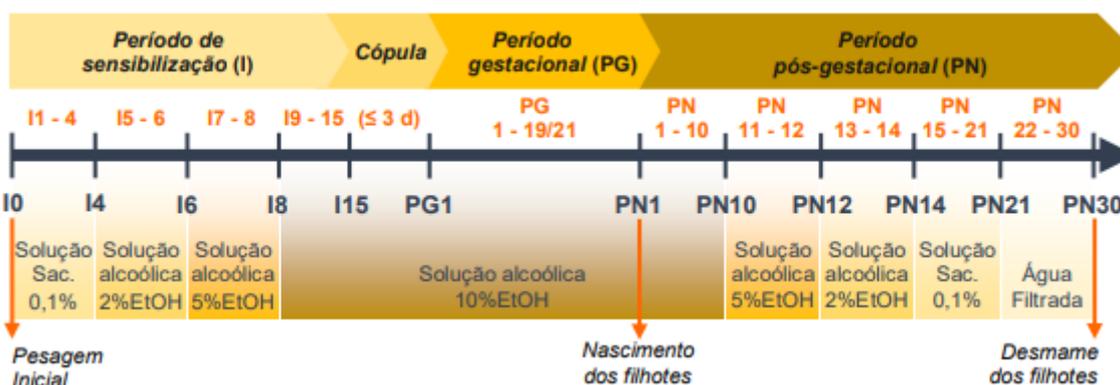


Figura 4. Protocolo grupo Exposição pré-natal ao álcool (P.A.E.). I – Período introdutório; PG – Período gestacional; PN – Período pós-gestacional. Observa-se a linha do tempo evidenciando o tipo de solução disponibilizada em cada etapa do protocolo. (arquivo pessoal)

As fêmeas continuaram a beber de forma estável durante a gravidez. 11 dias após o nascimento, as concentrações de álcool e sacarina foram reduzidas pela metade a cada 2 dias, até que os camundongos consumissem apenas água. Do mesmo modo, as fêmeas do grupo controle pararam de consumir a água adoçada. Os filhotes foram desmamados aos 30 dias e mantidos em gaiolas alojadas do mesmo sexo, com água e ração à vontade. Os filhotes (tanto macho quanto fêmeas) com 45 dias de vida foram usados em nosso estudo de

expressão gênica. A administração de álcool através de água, foi realizada para reduzir o estresse materno e dos filhotes, que poderiam ser causados se o álcool fosse administrado por meio da canulação ou injeção gástrica [56] [51].

Resumindo, o protocolo de exposição pré-natal ao álcool (EPA) foi realizado usando uma solução com gradiente alcoólico crescente (2, 5 e 10%) e solução de sacarina a 0,1% dissolvidos em 400 mL de água. Os progenitores tiveram acesso à solução 10% durante o acasalamento (ambos), gestação e aleitamento (somente as fêmeas). O gradiente decrescente de álcool foi realizado após 10 dias do nascimento dos filhotes (5 e 2% até água pura) para não causar estresse nas fêmeas progenitoras, como sinais de abstinência de álcool [52].

3.2 Coleta dos materiais biológicos

Após o desmame, os filhotes machos e fêmeas foram acondicionados em caixas, separados por gênero, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*. Quinze dias após o desmame (PN45), os animais foram anestesiados com 1 mL de isoflurano por inalação por 1 minuto e decapitados [58]. Esse método de eutanásia se fez necessário em função das demais técnicas induzirem aumento de estresse oxidativo pela ação de anestésicos administrados por vias, intravenosa (i.v.), intragástrica (i.g.) ou intraperitoneal (i.p.), por exemplo [59] [60]. O número de animais por grupo experimental (controle e EPA) foi de 5 animais por grupo ($n = 5$), sendo que os animais excedentes também foram eutanasiados e seus órgãos coletados e congelados para análises não pertinentes a este estudo.

O hipocampo foi retirado após craniotomia e brevemente lavado em solução fisiológica, para retirada do excesso de sangue. Os hipocampos foram pesados, imersos em nitrogênio líquido para congelamento e, armazenados a -80 °C para análise posterior. O descarte das carcaças dos animais foi realizado em sacos plásticos apropriados, armazenados em freezer e, posteriormente, encaminhados à empresa especializada [61].

3.3 PCR quantitativo

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

a) Extração do RNA

As amostras de hipocampo dos dois grupos foram pesadas e 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, foi adicionado 200 µL de clorofórmio refrigerado aos homogenatos, agitados em vórtex por 15 seg., e incubados em temperatura ambiente por 10 min. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 min, (12000 xg a 4 °C).

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

b) Tratamento do RNA total e Integridade das amostras

As quantificações de RNA total foram obtidas utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop ND-2000* (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*), sendo que 1U A260 corresponde a 40 µg de RNA/ ml. Foram utilizadas apenas amostras livres de contaminantes (A260/A230 ~1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8 – 2,0). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1µg de RNA total (8 µL) foi incubado com 1 unidade (1 µL) de DNase I/RNase Free – (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), na presença 1 µL de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65 °C durante 10 minutos para inativação da DNase I.

Após o tratamento descrito anteriormente, 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) Transcrição reversa

Para esta reação foi utilizado o Kit *SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Inicialmente, 10 µL de RNA de cada amostra, 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 ocorreu com o uso de sonda *Taqman* em equipamento *Quantstudio™ 5 System* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*) como descrito previamente¹²⁵. 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.

O design da placa foi customizado para conceder a análise de 2 amostras simultaneamente, utilizando-se 48 poços para cada amostra, demandando para a reação de qPCR o seguinte protocolo: em 15 μ L de cDNA, adicionados a 250 μ L 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 serão 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. Foram utilizados os primers dos componentes do SCC: receptores B1 e B2 de bradicinina e calicreína tecidual. Para o SRA, os primers foram para receptores AT1 e AT2, pró-renina, enzima conversora de angiotensina ECA1 e ECA2.

Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pelo nível de expressão do gene housekeeping subunidade 18S do RNA ribossomal, da qual a 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.

3.4 Análise estatística

Os resultantes das análises de expressão gênica foram tabulados e classificados. Os cálculos estatísticos e a confecção de todos os gráficos foram

realizados utilizando a aplicação de GraphPad Prism versão 8.0.1 for *Windows*, GraphPad Software (San Diego, CA. USA). O teste de *Shapiro-Wilk* foi usado para verificar a normalidade e variâncias de erro.

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

4. Resultados

As amostras de hipocampo coletadas de animais de ambos os sexos com 45 dias de vida dos dois grupos experimentais (controle e EPA) foram processadas para extração de RNAm. Foram analisadas a expressão gênica de 8 genes componentes do sistema renina-angiotensina (SRA): receptores AT1 e AT2, pró-renina, ECA, ECA2; e do sistema caliceína-cininas (SCC): receptores B1 e B2 e KLK.

A expressão de RNAm do gene do receptor de angiotensina AT1 apresentou, nos grupos EPA, aumento significativo quando comparado aos respectivos controles de ambos os sexos (**Figura 5A**). Mesmo assim, a expressão de RNAm de AT1 mostrou-se menor em fêmeas que em machos dos grupos EPA. A expressão basal de AT1 também se mostrou diminuída em fêmeas controle quando comparada com machos controle (**Figura 5A**). Em relação à expressão do gene do receptor de angiotensina AT2, foi observada diminuição nos grupos EPA em relação aos grupos controles (**Figura 5B**). Todavia, fêmeas do grupo EPA apresentaram maior expressão de RNAm de AT2

quando comparadas com machos EPA. Curiosamente, nos grupos controle, a expressão basal de RNAm de AT2 foi maior em fêmeas que em machos (**Figura 5B**).

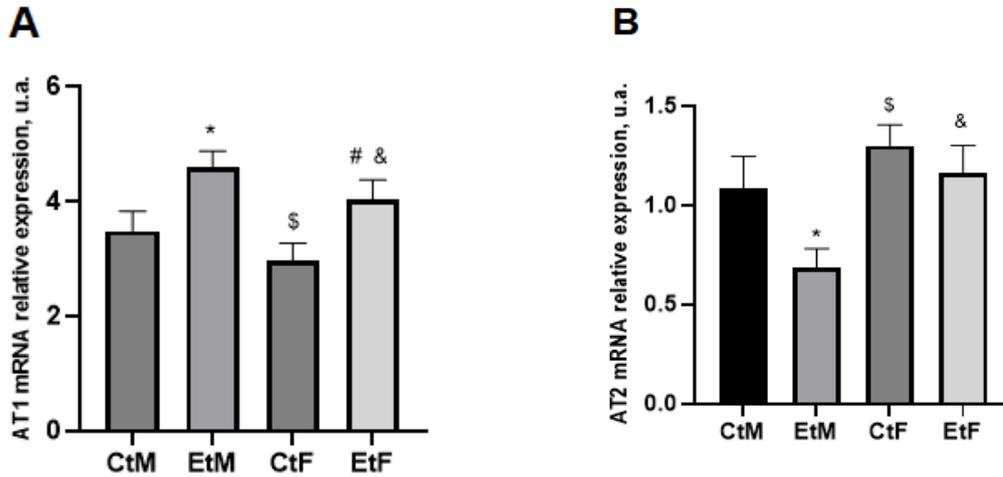


Figura 5. Expressão relativa de RNAm dos receptores AT1 (**A**) e AT2 (**B**) de angiotensina no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais controles machos (CtM) e fêmeas (CtF) e com exposição pré-natal ao álcool (EPA) machos (EtM) e fêmeas (EtF). **A.** * em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF; & em relação ao grupo EtM; \$ em relação ao grupo CtM; **B.** * em relação ao grupo CtM; & em relação ao grupo EtM; \$ em relação ao grupo CtM;

A EPA não alterou a expressão de RNAm do gene da pró-renina (Ren) nos grupos Controle ou EPA de ambos os sexos. Entretanto, a expressão basal de RNAm de renina em fêmeas mostrou-se menor que em machos independente da EPA (**Figura 6**).

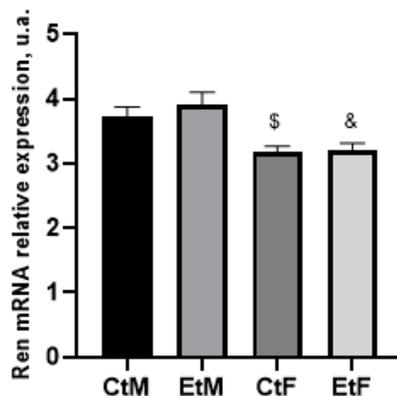


Figura 6. Expressão relativa de RNAm de pró-renina no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais controles machos (CtM) e fêmeas (CtF) e com exposição pré-natal ao álcool (EPA) machos (EtM) e fêmeas (EtF). & em relação ao grupo EtM; \$ em relação ao grupo CtM;

A EPA induziu aumento da expressão de RNAm do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA), quando comparados aos grupos Controle, tanto em machos como em fêmeas EPA (**Figura 7A**). A expressão de ECA mostrou-se diminuída em fêmeas EPA em relação aos machos EPA (**Figura 7A**). Em relação à expressão de RNAm do gene da enzima conversora de angiotensina II (ECA2), a EPA induziu diminuição de expressão em animais do grupo EPA de ambos os sexos quando comparados com seus respectivos controles (**Figura 7B**). Entretanto, em relação aos controles, a expressão basal de ECA2 foi menor em fêmeas quando comparadas com os machos (**Figura 7B**).

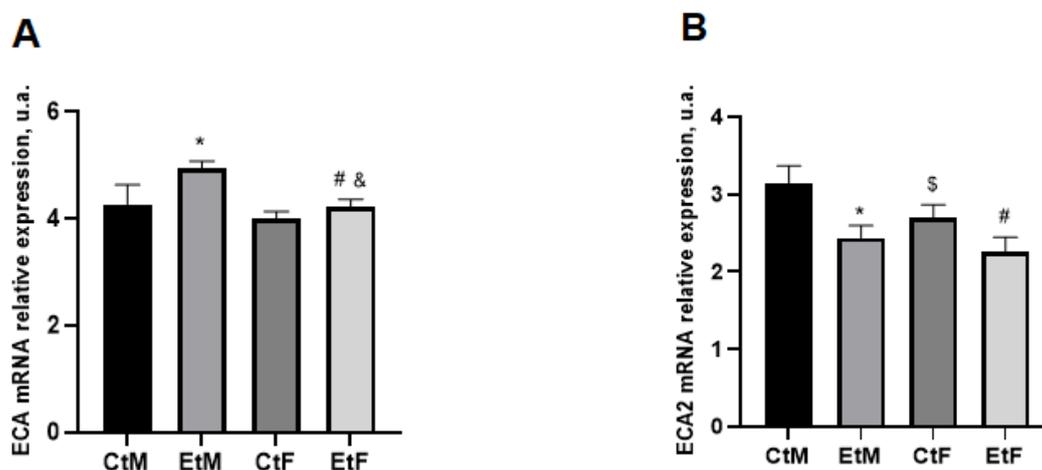


Figura 7. A. Expressão relativa de RNAm de enzima conversora de angiotensina (ECA) no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais controles machos (CtM) e fêmeas (CtF) e com exposição pré-natal ao álcool (EPA) machos (EtM) e fêmeas (EtF). * em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF; & em relação ao grupo EtM; **B.** Expressão relativa de RNAm de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais). *em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF; \$ em relação ao grupo CtM;

A expressão de RNAm dos receptores de cininas B1 e B2 apresentaram padrão similar, sendo observado aumento de expressão nos grupos EPA, independente do sexo (**Figura 8A e B**). Entretanto, a expressão do receptor B1 foi fortemente induzida pela exposição ao álcool em ambos os sexos quando

comparados com os grupos Controles (**Figura 8A**). Foi também verificado aumento significativo de expressão de RNAm do receptor B2 em machos EPA comparados com fêmeas EPA (**Figura 8B**). A expressão de caliceína tecidual (KLK) também foi estimulada pela EPA tanto em machos como em fêmeas, quando comparados aos respectivos controles (**Figura 8C**).

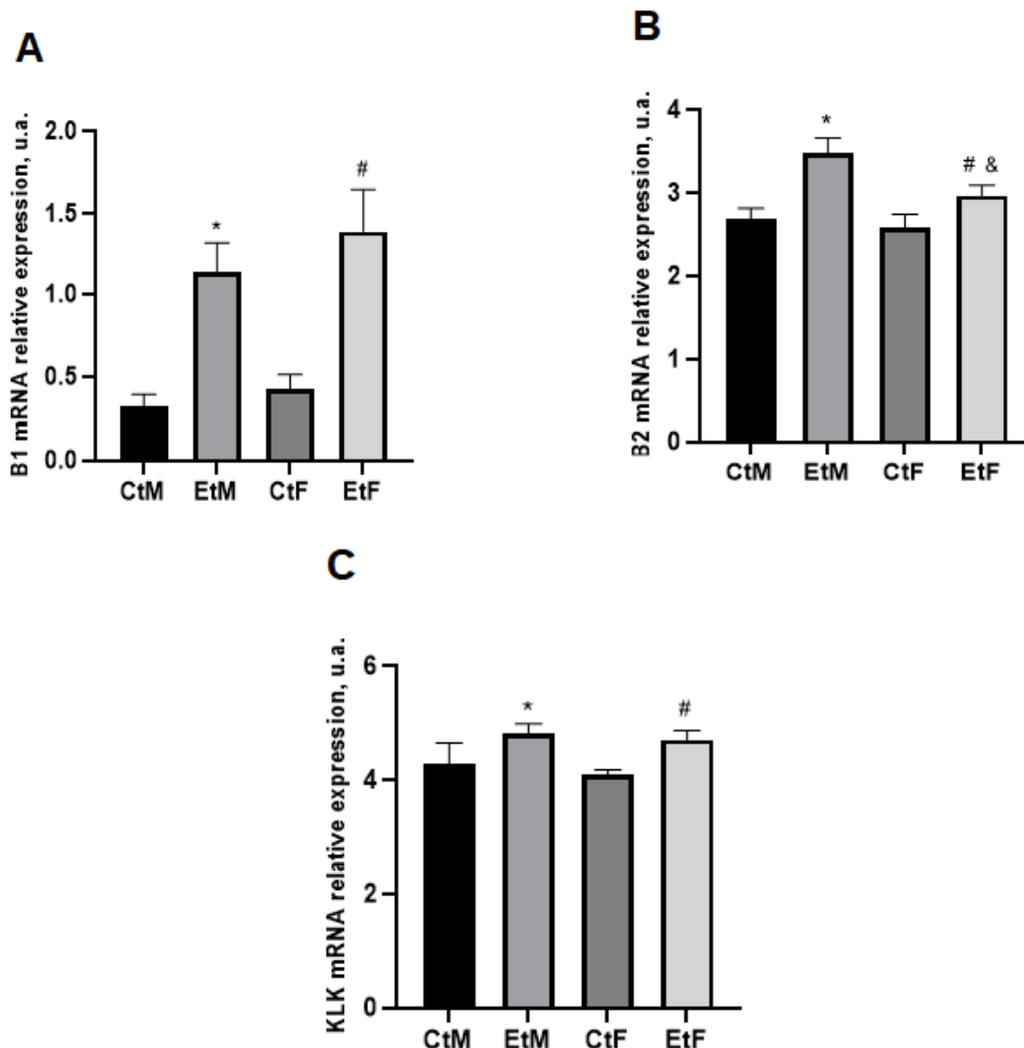


Figura 8. Expressão relativa de RNAm dos receptores de cininas B1 (**A**) e B2 (**B**) no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais controles machos (CtM) e fêmeas (CtF) e com exposição pré-natal ao álcool (EPA) machos (EtM) e fêmeas (EtF). **A.** * em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF; **B.** * em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF; & em relação ao grupo EtM; **(C)** Expressão relativa de RNAm de Caliceína tecidual no hipocampo de camundongos C57Bl6 em dia pós-natal 45 (PN45) dos grupos amostrais. *em relação ao grupo CtM; # em relação ao grupo CtF.

5. Discussão

Apresentamos neste estudo diferenças significativas na expressão de mRNA de componentes dos sistemas renina-angiotensina (SRA) e calicreína-cinina (SCC) no hipocampo de animais de ambos os sexos expostos ao álcool durante a gestação em comparação com seus controles. Observamos, no hipocampo, a expressão diferencial de mRNA dos componentes SRA de machos e fêmeas controles.

Vários estudos relataram a influência do SRA na ingestão de álcool. Em 1993, [62] observou que a administração periférica de baixas doses do inibidor da ECA captopril induziu aumento na ingestão de solução de etanol. Grupp et al. [28] coletaram evidências de que a ingestão de álcool está inversamente relacionada à atividade do SRA. No entanto, poucos estudos associam a EPA e a modulação de expressão de SRA. Zhu et al. [63] observaram aumento no nível sérico de Ang II e na expressão gênica da enzima renal ECA em animais com EPA. No mesmo estudo, a expressão do receptor AT2 foi significativamente inibida [63]. Particularmente, no hipocampo, até o momento não encontramos estudo exploratório entre EPA e SRA, ponto forte de nosso estudo.

Nossos dados mostram diferenças sexuais na expressão hipocampal do RNAm dos componentes do SRA em animais submetidos à EPA. Observamos aumento na expressão dos genes AT1 e ECA em camundongos do grupo EPA, independentemente do gênero, em relação aos controles. Analisando o hipocampo após a indução de epilepsia em ratos, que resulta em lesão tecidual e morte celular, Gouveia et al. (2012) observaram aumento na expressão de AT1 na fase crônica do modelo. Esta fase é caracterizada por crises epiléticas espontâneas e recorrentes devido à formação de esclerose hipocampal.

Segundo os autores, a expressão de AT2 aumentou nas fases aguda e silenciosa, sendo esta última uma fase latente, sem convulsões, onde ocorre a plasticidade hipocampal. Uma maior expressão de RNAm de AT2 foi observada em nosso estudo no grupo fêmeas PAE em relação ao grupo macho EPA, embora inalterada em relação aos seus controles. De fato, Chakrabarty et al. [64] mostraram que o estradiol induz a expressão do RNAm do receptor AT2 em neurônios de ratos e que esse receptor é necessário para a neurogênese.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento dos RNAs mensageiros de AT1 e ECA pode refletir o aumento da disponibilidade e ativação da Ang II, contribuindo para uma possível neuroinflamação gerada pela EPA. Liu et al. [41] relataram que uma dieta alcoólica de 5% provocou aumento na concentração de Ang II no miocárdio e maior índice apoptótico. Em fêmeas EPA, a diminuição da expressão do RNAm de AT1 e a restauração da expressão do RNAm de AT2 apontam que a EPA pode ser menos prejudicial para as fêmeas do que para os machos. A expressão aumentada observada de RNAm de receptores AT1 após EPA, observada em machos, está em consonância com dados que observaram aumento de RNAm de AT1 após infarto do miocárdio e hipertrofia cardíaca [65] [66].

Em condições fisiológicas, também observamos diferenças na expressão gênica dos componentes do SRA entre os animais controle. Esse dimorfismo sexual já foi observado por outros autores. Zimmerman e Sullivan [67] mostraram que ratos têm maior expressão do receptor AT1 no miocárdio, enquanto as fêmeas apresentam maior expressão do receptor AT2 (para revisão, consulte: Hilliard et al, [68]). Observamos, no hipocampo dos grupos controle, que a expressão de RNAm para o receptor AT1 da angiotensina foi menor nas fêmeas

do que em machos. Wang et al [69] encontraram expressão diferencial do receptor AT1 em rins de camundongos. Esses autores também observaram, nos rins, maior expressão de AT2 em animais controles fêmeas em relação aos controles machos.

No hipocampo, não detectamos diferenças na expressão do RNAm de ECA em machos e fêmeas controles, entretanto, alguns autores relataram dimorfismo sexual na expressão do gene da ECA em humanos e animais em condições fisiológicas. Em crianças, por exemplo, a atividade da ECA foi maior em meninos e menor em meninas após a puberdade [70]. Em adultos jovens saudáveis, a atividade da ECA foi maior nos homens [71]. Um aumento da expressão do RNAm da ECA no hipocampo após a EPA foi detectado em nosso estudo, no entanto, observamos uma diminuição da expressão do RNAm de ECA em fêmeas EPA quando comparadas com machos EPA. Zhu et al. [63], analisando ratos com EPA, não detectaram diferença na expressão do RNAm de ECA nos rins, porém, a expressão da ECA2 diminuiu em relação ao controle. Quando comparada com os controles, a expressão do RNAm de ECA2 em animais PAE machos e fêmeas diminuiu no hipocampo em nosso protocolo experimental. Gembardt et al. [72] relataram que a distribuição da ECA2 é menor que a da ECA, sendo mais expressa no coração, rins, pulmão, cérebro, intestino, testículos, baço e tecido adiposo em roedores. A expressão diferencial da ECA2 entre os gêneros foi observada por Grupte et al [73]. Camundongos machos C57BL/6 alimentados com baixo teor de gordura apresentaram maior expressão de RNAm de ECA2 no rim e tecido adiposo em comparação com camundongos fêmeas [73]. Nossos dados, analisando a mesma linhagem de camundongos,

mostraram menor expressão do RNAm de ECA2 no hipocampo das fêmeas do grupo controle em relação aos machos.

A expressão do RNAm de renina humana foi detectada em diversos órgãos, como nos rins, músculos, coração e cérebro [74]. Camundongos adultos apresentaram expressão de RNAm de renina no córtex, tálamo e hipocampo [75]. Muitos estudos sugerem que o estrogênio é responsável por reduzir a secreção de renina pelas células justaglomerulares renais, diminuindo a concentração plasmática de renina em humanos, enquanto a testosterona aumenta a concentração sérica de renina [76]. As medições de renina mostraram níveis mais baixos nas mulheres do que nos homens [77]. Animais hipertensos exibiram diferenças sexuais na expressão de renina [78]. Os autores observaram que ratos machos apresentavam concentrações séricas de renina maiores que as fêmeas. Outro estudo, analisando a glândula submandibular, encontrou que os níveis de renina aumentaram após a puberdade para se tornarem maiores em homens do que em mulheres, e que a castração reduziu os níveis de renina [79]. Em geral, a maioria dos estudos sugere que as concentrações plasmáticas de renina são diminuídas por efeitos estrogênicos e aumentadas por andrógenos [80].

Assim, nossos dados sugerem menor expressão de RNAm de renina no hipocampo de camundongos fêmeas. *In vitro*, o álcool aumenta a expressão do RNAm da renina de maneira dependente da concentração em fibroblastos cardíacos [81]. Estes autores observaram aumento da expressão de renina em corações de ratos induzida pelo consumo de álcool.

Gallagher et al. [82] observaram que o tratamento com estrogênio reduziu a expressão e a atividade do RNAm de ECA em rins, aorta e pulmões de ratas

ooforectomizadas. Assim, os níveis de Ang II são diminuídos pela supressão da renina e da atividade da ECA pelo estrogênio, reduzindo a ativação da via Ang II-ECA-AT1 [80] [83]. Em contraste, diferenças relacionadas ao sexo na fisiopatologia da doença cardiovascular são impulsionadas por andrógenos, como a testosterona, por meio da estimulação do eixo Ang II-ECA-AT1 para induzir vasoconstrição, disfunção vascular e hipertrofia e fibrose cardíacas (Para revisão, Medina et al., [84] e Regitz-Zagrosek & Kararigas, [85]). Detectamos a indução do eixo Ang II-ECA-AT1 no hipocampo, sugerindo uma resposta inflamatória relacionada à EPA.

Com relação ao sistema caliceína-cininas (SCC), dados sobre a EPA e a modulação desse sistema são mais escassos. Ao contrário do SRA, não encontramos diferenças na expressão do RNAm de receptores de cininas entre animais controles machos e fêmeas. No entanto, Madeddu et al [86] observaram aumento na expressão do RNAm do receptor B2 nos rins, glândula adrenal, aorta e ventrículo esquerdo de ratas Wistar em comparação com machos. Entretanto, os autores não analisaram as expressões destes receptores em hipocampo ou outras estruturas cerebrais.

Perosa et al. [87] observaram aumento da expressão do receptor B2 no hipocampo humano. Usando o mesmo modelo de indução de epilepsia [88], os autores observaram aumento na expressão de RNAm de receptores de cininas em animais epiléticos. No miocárdio, os níveis de RNAm de B2 aumentaram de maneira dependente do tempo após o infarto do miocárdio [89]. Os autores propuseram que o aumento de B2 está relacionado à cardioproteção exercida pela geração e liberação de cininas no tecido. A expressão do receptor de cininas B1 é induzida em condições patológicas [35]. Marceau et al [90] relataram que a

expressão do receptor B1 é aumentada após lesão e inflamação. Uma expressão elevada do receptor B1 após infarto do miocárdio foi observada na fase aguda em ratos machos [91]. Os autores relataram que a expressão do RNAm do receptor B1 diminuiu gradualmente após o infarto do miocárdio. Flores-Monroy et al. [92] detectaram diferenças na expressão do RNAm dos receptores de cininas durante as fases aguda e crônica pós-infarto em ratos Wistar de ambos os sexos. Em nosso estudo, mostramos que a EPA induziu aumento significativo nos níveis de expressão de RNAm dos receptores B1 e B2 em ambos os sexos. Particularmente em relação ao receptor B2, os machos EPA apresentaram maior expressão de RNAm deste receptor do que as fêmeas EPA. Esse aumento pode sugerir que o sexo feminino é menos afetado pela EPA, possivelmente por neuroproteção exercida pela ação hormonal.

Iwadate et al. [93] relataram a expressão da calicreína tecidual no cérebro de ratos em desenvolvimento, com pico de expressão no primeiro dia pós-natal. A expressão de KLK manteve-se elevada até o 10º dia pós-natal e, a partir daí, diminuiu gradativamente. A infusão de calicreína no miocárdio atenuou a inflamação e reduziu o estresse oxidativo em ratos após IM [94]. Os autores observaram que a ativação da calicreína e dos receptores B2 induziu a supressão do estresse oxidativo após o IM. Os mesmos autores, em trabalho anterior (2000) reportaram que o conteúdo de proteína KLK no cérebro de ratos diminuiu continuamente após o nascimento até PN49. Nossos achados sugerem que a EPA induziu aumento na expressão do RNAm de calicreína tecidual em animais de ambos os sexos expostos ao álcool durante a gestação observado no dia PN45. Um estudo com hipocampo humano observou que a expressão da calicreína tecidual foi aumentada pela inflamação presente na epilepsia refratária

do lobo temporal [95]. Outros autores observaram diferenças na expressão da calicreína entre os sexos em outros órgãos, como nos rins. A expressão do RNAm da calicreína tecidual foi maior em ratas do que em machos, porém, no coração, não foi detectada diferença entre os sexos [86].

Em resumo, a EPA alterou a expressão de RNAm de vários genes analisados do SRA e do SCC e, embora não tenhamos verificado a expressão neste estudo, os dados obtidos até o momento sugerem uma possível neuroproteção contra o álcool e a ativação desses sistemas peptidérgicos. O uso de inibidores da ECA, cuja eficácia na neuroproteção foi evidenciada por diversos autores [96] [97] poderia ser indicado para diminuir os efeitos da EPA, seja no hipocampo ou em outras estruturas cerebrais no futuro.

6. CONCLUSÃO

A EPA modulou a expressão de genes dos sistemas peptidérgicos renina-angiotensina e calicreína-cininas. Diferenças sexo-específicas de expressão de RNAm foram encontradas com ou sem EPA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. História do Álcool, CISA, 2022, disponível em: <https://cisa.org.br/sua-saude/informativos/artigo/item/60-historia-do-alcool>. Acesso em 12 de abr. de 2022.
2. Sales E. Aspectos da história do álcool e do alcoolismo no século XIX. *Cadernos de Hist. UFPE*. 2010; 7(7): 167-203.
3. Avalos SM, Molina AS. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *Health*. 2010; doi: 10.3390/ijerph7124281
4. WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.478 p. ISBN 978-92-4-156563-9
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 424 p.:il. ISBN 978-85-334-2701-3
6. Tillonen J. Ethanol, acetaldehyde and gastrointestinal flora [Dissertação]. Helsinki: Research Unit of Alcohol Diseases, University of Helsinki; 2000. 81 p. ISBN 952-91-2603-4
7. Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug. Metab. Rev.* 2004 Oct; 36(3-4): 511- 29. doi: 10.1081/DMR-200033441.
8. Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Rev. psiquiatr. clín.* 2008; 35(Supl1): 21-4. doi: 10.1590/S0101-60832008000700006
9. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2010 May-Jun; 3(3): 178-85. doi: 10.4161/oxim.3.3.12288. 14. Mincis M, Mincis R. Álcool e o fígado. *GED*. 2011; 30(4): 152-62.
10. Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res. Health*. 2000; 24(2): 93-104. PMID: 11199283
11. Aguiar AS, Silva VA, Boaventura GT. As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? *Nutrição em Pauta*. 2007; s/v: 45-9.
12. Maher JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res. World*. 1997; 21(1): 5-12. PMID: 15706758
13. Matos LC. Doença Hepática Alcoólica (DHA). *Rev. Soc. Port. Med. Int.* 2003; 13(3): 207-16

14. Momino W, Sanseverino MT, Faccini LS. Prenatal alcohol exposure as a risk factor for dysfunctional behaviors: the role of the pediatrician. *Pediatrics journal* – Vol. 84, No. 4. 2008; Doi: 10.1590/S0021-75572008000500011.
15. Petrelli B, Weinberg J, Hicks GG. Effects of prenatal alcohol exposure (P.A.E.): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem. Cell. Biol.* 2018; 96(2): 131-47. doi: 10.1139/bcb-2017-0280
16. Denny L, Coles S, Blitz R. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Am Fam Physician.* 2017, 15;96(8):515-522.
17. Warren KR, Hewitt BG, Thomas JD. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Research Challenges and Opportunities. *Alcohol Res. Health.* 2011; 34(1): 4-14. PMID: 23580035
18. Nixon K, Crews FT (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83(5):1087–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01214.x>
19. Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM 2003 Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7919 –7924
20. Shabani Z, Jafarzadeh Gharehziaaddin M. Effects and Potential Mechanisms of Alcohol Use Disorder on the Fate Determination of Newly Born Neurons in the Hippocampus. *Alcohol Alcohol.* 2020; 55(6):598-602. doi: 10.1093/alcalc/agaa083. PMID: 32814954.
21. Baltatu O, SILVA JA Jr, Bader M, Ganten D. The Brain Renin-Angiotensin System Modulates Angiotensin II-Induced Hypertension and Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* 2000, 35 (1) 2: 409-412.
22. MS Vieira-Rocha, P Rodríguez-Rodríguez, JB Sousa, MC González, SM Arribas, AL López de Pablo, C. Diniz. Vascular angiotensin AT1 receptor neuromodulation in fetal programming of hypertension. *Vascular Pharmacology* 2019; 117:27-34. doi :10.1016/j.vph.2018.10.003.
23. White MC, Fleeman R, Arnold AC. Sex differences in the metabolic effects of the renin-angiotensin system. *Biol Sex Differ.* 2019; 10(1):31. doi: 10.1186/s13293-019-0247-5. PMID: 31262355; PMCID: PMC6604144.
24. Lixin J, Yulin L, Chuanshi X, Jie D. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2012, 17(1), 221–231
25. Farmer, RW; Fabre, LF. Some endocrine aspects of alcoholism. In: Majchrowicz, E., ed. *Biochemical pharmacology of ethanol.* New York: Plenum Press; 1975:277-289
26. Ibsen, H; Christensen, NJ; Rasmussen, S; Hollnagel, H; Nielsen, MD; Giese, J. Effects of high alcohol intake on blood pressure, adrenergic activity and the renin-angiotensin system. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 45:87-91; 1985.

27. Wright, JW; Morseth, SL; Abhold, RH; Harding, JW. Elevations in plasma angiotensin II with prolonged ethanol treatment in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:813-818; 1986.
28. Grupp, LA; Harding, S.: The reduction in alcohol drinking by peripherally injected angiotensin II is selectively mediated by the AT1 receptor subtype. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47:385–392; 1994.
29. Weisinger RS, Blair-West JR, Denton DA, McBurnie MI. Angiotensin II stimulates intake of ethanol in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 1999; 67(3):369-76. doi: 10.1016/s0031-9384(99)00085-2. PMID: 10497955.
30. Blair–West, JR; Denton, DA; McBurnie, MI; Weisinger, RS: The dipsogen angiotensin II does not stimulate ethanol intake in mice. *Physiol. Behav.* 60:481–487; 1996.
31. Fitts, DA: Forebrain circumventricular organs mediate captopril-enhanced ethanol intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45:811–816; 1993.
32. Grupp, LA; Perlanski, E; Stewart, RF.: Systemic angiotensin II does not act at the area postrema to suppress alcohol intake. *Alcohol* 8:165–167; 1991a.
33. Grupp, LA; Perlanski, E; Stewart, RB.: Regulation of alcohol consumption by the renin–angiotensin system: A review of recent findings and a possible mechanism of action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15:265–275; 1991b.
34. Robertson, JM; Harding, S; Grupp, LA.: The reduction in alcohol intake produced by enalapril is not attenuated by centrally administered angiotensin inhibitors. *Alcohol* 11:295–299; 1994
35. Silva JA Jr, Araujo RC, Baltatu O, Oliveira SM, Tschöpe C, Fink E, Hoffmann S, Plehm R, Chai KX, Chao L, Chao J, Ganten D, Pesquero JB, Bader M. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. *FASEB J.* 2000; 14(13):1858-60. doi: 10.1096/fj.99-1010fje.
36. Santana, ET. Título: Participação do Sistema Caliceína-Cininas na cardioproteção promovida pela atividade física e sua modulação pela sobrecarga adrenérgica induzida pelo isoproterenol em miocárdio de ratos. Orientador: Prof. Dr. Jose Antonio Silva Junior. 2011. 71 p. Dissertação de Mestrado – ciências da reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2011.
37. Nokkari A, Abou-El-Hassan H, Mechref Y, Mondello S, Kindy MS, Jaffa AA, Kobeissy F. Implication of the Kallikrein-Kinin system in neurological disorders: Quest for potential biomarkers and mechanisms. *Prog Neurobiol.* 2018; 165-167:26-50. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.01.003.
38. Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, Souza PP. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(2):135-42. doi: 10.1016/j.intimp.2007.08.003.

39. Marcondes S, Antunes E. The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005; 3(1):33-44. doi: 10.2174/1568016052773351.
40. Jaffa MA, Kobeissy F, Al Hariri M, Chalhoub H, Eid A, Ziyadeh FN, Jaffa AA. Global renal gene expression profiling analysis in B2-kinin receptor null mice: impact of diabetes. *PLoS One*. 2012 ;7(9):e44714. doi: 10.1371/journal.pone.0044714.
41. Liu J, Feener EP. Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem*. 2013;c394(3):319-28. doi: 10.1515/hsz-2012-0316
42. Delemasure S, Blaes N, Richard C, Couture R, Bader M, Dutartre P, Girolami JP, Connat JL, Rochette L. Antioxidant/oxidant status and cardiac function in bradykinin B(1)- and B(2)-receptor null mice. *Physiol Res*. 2013;62(5):511-7. doi: 10.33549/physiolres.932496.
43. Kakoki M, Smithies O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney Int*. 2009; 75(10):1019-30. doi: 10.1038/ki.2008.647.
44. Perry EK. Neurotransmitters and diseases of the brain. *Br J Hosp Med*. 1991; 45(2):73-83.
45. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD. Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology*. 1996; 32(1-3):39-47. doi: 10.1016/0162-3109(96)00007-0.
46. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*. 2005; 57(1):27-77. doi: 10.1124/pr.57.1.2.
47. Guevara-Lora I. Kinin-mediated inflammation in neurodegenerative disorders. *Neurochem Int*. 2012; 61(1):72-8. doi: 10.1016/j.neuint.2012.04.013.
48. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int*. 1995; 26(1):1-16; discussion 17-26. doi: 10.1016/0197-0186(94)00114-a.
49. Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281(1):H275-83. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.1.H275.
50. Naffah-Mazzacoratti Mda G, Gouveia TL, Simões PS, Perosa SR. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World J Biol Chem*. 2014; 5(2):130-40. doi: 10.4331/wjbc.v5.i2.130.
51. Akers KG, Kushner SA, Leslie AT, Clarke L, Van der Kooy E, Lerch JP. et al. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and

impaired odor discrimination in adult mice. *Mol. Brain*. 2011; 4(29): 2-15. doi: 10.1186/1756-6606-4-29

52. Allan AM, Chynoweth J, Tyler LA, Caldwell KK. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2003; 27(12): 2009-16. doi: 10.1097/01.ALC.0000100940.95053.72

53. Czachowski CL, Samson HH, Denning CE (1999) Blood ethanol concentrations in rats drinking sucrose/ethanol solutions. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1331–1335.

54. Roberts AJ, Heuser CJ, Koob GF (1999) Operant self-administration of sweetened versus unsweetened ethanol: effects on blood alcohol levels. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1151–1157

55. Tomie A, diPoce J, Derenzo CC, Pohorecky LA (2002) Autoshaping of ethanol drinking: an animal model of binge drinking. *Alcohol* 37:138–146.

56. 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(10): 961-71. doi: 10.1038/sj.mp.4001694

57. Torloni MR, Nakamura UM, Megale A, Sanchez VHS, Mano C, Fusaro AS, Mattar R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2007; 29(5):267-75. doi: 10.1590/S0100-72032007000500008

58. May PA, Tabachnick B, Hasken JM, Marais A-S, De Vries MM, Barnard R et al. Who is most affected by prenatal alcohol exposure: Boys or girls? *Drug Alcohol Dep*. 2017; 177: 258-67. Doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.04.010.

59. Abate P, Hernández-Fonseca K, Reyes-Guzmán AC, Barbosa Luna IG, Méndez M. Prenatal ethanol exposure alters met-enkephalin expression in brain regions related with reinforcement: Possible mechanism for ethanol consumption in offspring. *Behav. Brain Res*. 2014; 274: 194-204. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.022

60. Sanchez Vrga 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; 356:127-36. Doi: 10.1016/j.bbr.2018.08.018

61. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. 1.ed. Londres: CRC Press; 1988. 176 p. ISBN 9780849349348

62. Fitts DA. Angiotensin and captopril increase alcohol intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993; 45(1):35-43. doi: 10.1016/0091-3057(93)90082-5.

63. Zhu Y, Zuo N, Li B, Xiong Y, Chen H, He H, Sun Z, Hu S, Cheng H, Ao Y, Wang H. The expressional disorder of the renal RAS mediates nephrotic syndrome of male rat offspring induced by prenatal ethanol exposure. *Toxicology*. 2018; 400-401:9-19. doi: 10.1016/j.tox.2018.03.004.

64. Chakrabarty A, Blacklock A, Svojanovsky S, Smith PG. Estrogen elicits dorsal root ganglion axon sprouting via a renin-angiotensin system. *Endocrinology*. 2008; 149(7):3452-60. doi: 10.1210/en.2008-0061.
65. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*. 1994, v. 267, p. 844 - 852.
66. Meggs LG, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ, Anversa P. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1993, v. 72, p. 1149 - 1162.
67. Zimmerman MA, Sullivan JC. Hypertension: what's sex got to do with it? *Physiology (Bethesda)*. 2013 Jul;28(4):234-44. doi: 10.1152/physiol.00013.2013. PMID: 23817798; PMCID: PMC3742130.
68. Hilliard LM, Sampson AK, Brown RD, Denton KM. The "his and hers" of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2013; 15(1):71-9. doi: 10.1007/s11906-012-0319-y.
69. Wang Q, Zhang Y, Le F, Wang N, Zhang F, Luo Y, Lou Y, Hu M, Wang L, Thurston LM, Xu X, Jin F. Alteration in the expression of the renin-angiotensin system in the myocardium of mice conceived by in vitro fertilization. *Biol Reprod*. 2018, v. 99, p. 1276 – 1288.
70. Landazuri P, Granobles C, Loango N. Gender differences in serum angiotensin-converting enzyme activity and blood pressure in children: an observational study. *Arq. Bras. Cardiol.* (2008) 91 352–357.
71. Zapater P, Novalbos J, Gallego-Sandín S, Hernández FT, Abad-Santos F. Gender differences in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and inhibition by enalaprilat in healthy volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (2004) 43 737–744.
72. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides*. 2005; 26(7):1270-7. doi: 10.1016/j.peptides.2005.01.009.
73. Gupte M, Thatcher SE, Boustany-Kari CM, Shoemaker R, Yiannikouris F, Zhang X, Karounos M, Cassis LA. Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(6):1392-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.248559.
74. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002, v. 109, p. 1417 - 1427.
75. Contrepas A, Walker J, Koulakoff A, Franek KJ, Qadri F, Giaume C, Corvol P, Schwartz CE, Nguyen G. A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell

differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009, v. 297, p. 250 - 257.

76. Danser AH, Derkx FH, Schalekamp MA, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J. Hypertens*. (1998) 16 853– 862.

77. Schunkert H, Danser AH, Hense HW et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin–angiotensin system in post-menopausal women. *Circulation* 1997; 95:39–45.

78. Pendergrass KD, Pirro NT, Westwood BM, Ferrario CM, Brosnihan KB, Chappell MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. (2008) 295 H10–H20

79. Pratt RE, Dzau VJ, Ouellette AJ. Influence of androgen on translatable renin mRNA in the mouse submandibular gland. *Hypertension* (1984) 6 605–613.

80. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010; 24(6):687-98. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00854.x.

81. Xiong J, Cao X, Qiao S, Yu S, Li L, Yu Y, Fu C, Jiang F, Dong B, Su Q. (Pro)renin Receptor is Involved in Myocardial Damage in Alcoholic Cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019, v. 43, p. 2344 – 2353.

82. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB 1999 Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 33: 323 – 328

83. Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2002; 53(3):672-7. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00479-5.

84. Medina D, Mehay D, Arnold AC. Sex differences in cardiovascular actions of the renin-angiotensin system. *Clin Auton Res*. 2020; 30(5):393-408. doi: 10.1007/s10286-020-00720-2.

85. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiol Rev*. 2017; 97(1):1-37. doi: 10.1152/physrev.00021.2015.

86. Madeddu P, Pinna Parpaglia P, Anania V, Glorioso N, Chao C, Wang C, Chao J. Sexual dimorphism of cardiovascular responses to early blockade of bradykinin receptors. *Hypertension*. 1996; 27(3 Pt 2):746-51. doi: 10.1161/01.hyp.27.3.746

87. Perosa SR, Argañaraz GA, Goto EM, Costa LG, Konno AC, Varella PP, Santiago JF, Pesquero JB, Canzian M, Amado D, Yacubian EM, Carrete H Jr, Centeno RS, Cavalheiro EA, Silva JA Jr, Mazzacoratti Mda G. Kinin B1 and B2 receptors are overexpressed in the hippocampus of humans with temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 2007; 17(1):26-33. doi: 10.1002/hipo.20239.

88. Argañaraz GA, Silva JA Jr, Perosa SR, Pessoa LG, Carvalho FF, Bascands JL, Bader M, da Silva Trindade E, Amado D, Cavalheiro EA, Pesquero JB, da Graça Naffah-Mazzacoratti M. The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 2004; 1006(1):114-25. doi: 10.1016/j.brainres.2003.12.050.
89. Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, Spillmann F, Wendorf M, Hauke D, Bader M, Schultheiss HP, Walther T. Myocardial bradykinin B2-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction. *J Hypertens.* 2000, v. 18, p. 223 – 228.
90. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998; 50(3):357-86.
91. Tschöpe C, Spillmann F, Altmann C, Koch M, Westermann D, Dhayat N, Dhayat S, Bascands JL, Gera L, Hoffmann S, Schultheiss HP, Walther T. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):559-69. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.10.018.
92. Flores-Monroy J, Lezama-Martínez D, Fonseca-Coronado S, Martínez-Aguilar L. Differences in the expression of the renin angiotensin system and the kallikrein-kinin system during the course of myocardial infarction in male and female Wistar rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2020; 21(2):1470320319900038. doi: 10.1177/1470320319900038.
93. Iwadate H, Kudo M, Kizuki K. Expression of tissue kallikrein mRNA in developing rat brains. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002, v. 80, p. 245-248.
94. Yao YY, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein infusion prevents cardiomyocyte apoptosis, inflammation and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Regul Pept.* 2007, v. 140, p. 12-20.
95. Simões PS, Perosa SR, Arganãraz GA, Yacubian EM, Carrete H Jr, Centeno RS, Varella PP, Santiago JF, Canzian M, Silva JA Jr, Mortara RA, Amado D, Cavalheiro EA, Mazzacoratti Mda G. Kallikrein 1 is overexpressed by astrocytes in the hippocampus of patients with refractory temporal lobe epilepsy, associated with hippocampal sclerosis. *Neurochem Int.* 2011; 58(4):477-82. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.021.
96. Tao MX, Xue X, Gao L, Lu JL, Zhou JS, Jiang T, Zhang YD. Involvement of angiotensin-(1-7) in the neuroprotection of captopril against focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2018; 687:16-21. doi: 10.1016/j.neulet.2018.09.024.
97. Sahin B, Ergul M. Captopril exhibits protective effects through anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glioma cells. *Metab Brain Dis.* 2022; 37(4):1221-1230. doi: 10.1007/s11011-022-00948-z.

8. Anexo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição pré-natal ao álcool na expressão de peptídeos vasoativos dos sistema renina-angiotensina e calcireína-cininas no hipocampo de camundongos", protocolada sob o CEUA nº 3145230522 (000000), sob a responsabilidade de **José Antônio Silva Júnior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 21/06/2022.

We certify that the proposal "Effects of prenatal alcohol exposure on the expression of vasoactive peptides of the renin-angiotensin and kallikrein-kinins system in the hippocampus of mice", utilizing 20 isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 3145230522 (000000), under the responsibility of **José Antônio Silva Júnior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/21/2022.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 08/2022 a 08/2023

Área: *Medicina*

Origem: *Biotério - Unidade Vergueiro*

Espécie: *Camundongos isogênicos*

sexo: *Machos e Fêmeas*

idade: *2 a 3 meses*

N: *20*

Linhagem: *CS780/6*

Peso: *18 a 20 g*

Local do experimento: *Biotério da UNINOVE (sala de experimentação) Laboratório de Biologia Molecular*

São Paulo, 23 de novembro de 2022

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

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