



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

PATRICIA ACORDI CESCINETTO

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E
MORFOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* AO
ETANOL EM MODELO ANIMAL E EM CULTURA DE
CÉLULAS**

Florianópolis
2019

Patricia Acordi Cesconetto

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E
MORFOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* AO
ETANOL EM MODELO ANIMAL E EM CULTURA DE
CÉLULAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutorado em Farmácia.

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

Florianópolis
2019

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

Acordi Cesconetto, Patricia
EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E MORFOLÓGICOS DA
EXPOSIÇÃO IN VIVO E IN VITRO AO ETANOL EM MODELO
ANIMAL E EM CULTURA DE CÉLULAS / Patricia Acordi
Cesconetto ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco
de Souza, 2019.
190 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Etanol. 3. Estresse oxidativo.
4. Toxicidade. I. Zamoner Pacheco de Souza, Ariane
. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Patricia Acordi Cesconetto

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E MORFOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO
IN VIVO E IN VITRO AO ETANOL EM MODELO ANIMAL E EM CULTURA DE
CÉLULAS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a, Dra. Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof.^a, Dra. Patrícia de Souza Brocardo
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNISUL

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia.

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora

Florianópolis, 18 de julho de 2019.

Dedico esta tese aos meus amados pais,
Eduardo e Melania pela importância que eles
tem e sempre terão em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela confiança depositada neste trabalho, pela paciência para explicar as dúvidas encontradas, por passar seus conhecimentos com toda sua calma, sabedoria e com seus desenhos, pelo exemplo de orientadora e professora. Principalmente pela orientação e por sua amizade.

Agradeço aos meus pais Eduardo e Melania, meus maiores exemplos. Obrigada por cada incentivo, pelas orações em meu favor, pela preocupação, pela sabedoria, pelo incentivo de nunca desistir e de sempre seguir em busca dos sonhos. Principalmente por todo amor que me deram.

À todos os meus amigos e familiares por todo apoio, por toda a torcida e pelos abraços e carinhos que recebi quando precisei.

As amigas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, pelos momentos de companheirismo nos experimentos realizados, pelas conversas descontraídas, por escutar os desabafos e por todo o carinho que recebi ao longo desses anos. Principalmente às minhas queridas amigas que levarei para sempre em meu coração: Carol (IC) pelo carinho, amizade, confiança, por sempre me ajudar e escutar meus desabafos; às novas meninas Katuska, Josiane e Fabiana pela amizade, pelas conversas e algumas parcerias de experimento. Aos que já saíram do laboratório e estão conquistando seus sonhos, Camila, Daiane, Juliana, Vitória, Alessandra e Eduardo, pela amizade e ajuda no início deste projeto. Guardo cada um de um modo especial no meu coração.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios, principalmente a Nádía e Marisa, que sempre estiveram comigo nos corredores da universidade e na vida.

A Carmem, pelo exemplo de pessoa e profissional, por toda paciência e dedicação ao passar seus conhecimentos em histologia.

Ao Leandro, por todo o companheirismo na reta final da tese.

Aos meus amigos do Porto, que me receberam de braços abertos, pela paciência em me passar todos os seus conhecimentos no curto tempo disponível, pela amizade que levarei para a vida toda.

Aos professores Carlos Pedro Fontes Oliveira e Marco Alves, da Universidade do Proto, por me receber e por deixar desenvolver parte deste trabalho de doutoramento nos laboratórios supervisionados por eles.

As minhas amadas amigas Raquel, Patricia Oliveira e Carina, que conheci em Porto, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelos cafezinhos e conversas, pelo apoio emocional, pelos abraços e puxões de orelhas, por se tornarem minha família, sinto muito a falta de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PGFAR por ter oportunizado a realização deste trabalho.

Ao LAMEB e LCME, por sempre me receber bem, pela oportunidade de realizar o trabalho, pela ajuda e paciência de todos os técnicos.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

“It has long been recognized that the problems with alcohol relate not to the use of a bad thing, but to the abuse of a good thing.”

Abraham Lincoln

RESUMO

O uso nocivo de etanol é reconhecido como um importante problema de saúde pública em todo o mundo, trazendo sérias consequências ao indivíduo, principalmente às mulheres grávidas e aos fetos, causando uma série de alterações orgânicas e fisiológicas. A exposição intrauterina ao etanol pode causar uma síndrome neurotóxica conhecida como síndrome alcoólica fetal (SAF). A SAF pode levar a graves problemas de desenvolvimento, anormalidades faciais, comportamentais e cognitivas. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da SAF. No presente estudo investigou-se o efeito da exposição materna ao etanol em diferentes parâmetros bioquímicos e histomorfológicos no fígado, intestino, sangue periférico e testículos de ratos imaturos. A exposição materna ao etanol causou alterações morfológicas e metabólicas no fígado da prole, levando ao aumento na concentração de marcadores de lesão hepática no sangue dos animais expostos (aminotransferases e gama-glutamil transferase, GGT). Além disso, os animais apresentaram aumento na digestão dos dissacarídeos maltose e lactose, que repercutiu em elevação da glicemia. Os efeitos da exposição materna ao etanol também foram observados nos testículos da prole onde demonstrou-se aumento no transporte de glutamato, glicose e cálcio na membrana plasmática, os quais foram acompanhados do aumento na geração de EROs. Já em células de Sertoli, o etanol alterou a viabilidade e a proliferação celular, assim como o metabolismo energético. Analisando os resultados em conjunto, sugere-se que o etanol é capaz de induzir toxicidade sobre o sistema digestório e reprodutor de ratos durante o desenvolvimento. Estratégias de prevenção e redução de danos causados pela exposição materna ao etanol precisam ser difundidas em prol da saúde dos indivíduos, bem como novas abordagens experimentais se fazem necessárias para compreender os mecanismos envolvidos na toxicidade do etanol sobre o organismo como um todo.

Palavras chave: etanol, fígado, intestino, testículos, estresse oxidativo, toxicidade.

ABSTRACT

The harmful use of alcohol is recognized as a major public health problem worldwide, leading to serious consequences to the individual, especially pregnant women and fetuses, causing a series of organic and physiological changes. Intrauterine exposure to ethanol may cause a neurotoxic syndrome known as fetal alcohol syndrome (FAS). FAS can lead to serious developmental, behavioral and cognitive abnormalities. Little is known about the mechanisms involved in the pathophysiology of FAS. The present study investigated the effects of maternal exposure to ethanol on different biochemical parameters in the liver, intestine, blood and testis of immature rats. Maternal exposure to ethanol caused morphological and metabolic changes in the liver of the offspring, leading to increased hepatic markers in the blood of the exposed animals (aminotransferases and gamma-glutamyl transferase, GGT). In addition, it was observed an increase in the digestion of the disaccharide maltose and lactose, which is associated with the elevation of glycemia. The effects of maternal exposure to ethanol were also observed in offspring testis, where there was an increase in the transport of glutamate, glucose and calcium in the plasma membrane, which were accompanied by an increase in ROS generation. Within the testis, in Sertoli cells, ethanol altered cell viability and proliferation, as well as energy metabolism. Taken together, the results suggested that ethanol induces toxicity to digestive and reproductive systems of rats during development. Harm reduction strategies need to be disseminated for the health of individuals as well as new experimental approaches are needed to understand the mechanisms involved in the toxicity of ethanol during development.

Key words: alcohol, intestine, testis, oxidative stress, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características morfológicas da SAF.....	36
Figura 2 - Metabolismo hepático do etanol.....	38
Figura 3 - Microestrutura do tecido hepático e as divisões em lóbulos.....	40
Figura 4 - Ilustração das células do intestino delgado e proteínas juncionais.....	43
Figura 5 - Ilustração esquemática do testículo e túbulo seminífero.....	44
Figura 6 - Representação esquemática do papel das aminotransferases no fígado.....	47
Figura 7 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas.....	49
Figura 8 - Representação esquemática do tratamento com etanol.....	54
Figura 9 - Imagem demonstrativa da realização das medidas de diâmetro (a) e altura da vilosidade (b) do duodeno.....	66
Figura 10 - Impactos do etanol na massa corporal e parâmetros morfométricos dos filhotes de ratas expostas durante a prenhez e aleitamento	73
Figura 11 - Ilustração dos filhotes expostos ou não ao etanol durante a gestação e aleitamento.....	76
Figura 12 - Efeito do etanol sobre a atividade de γ -glutamil transferase (GGT) no fígado de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.....	83
Figura 13 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT no fígado de ratos de 21 dias de idade.....	83
Figura 14 - Efeitos da exposição materna ao etanol na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (A) e de nitrogênio (ERNs) (B) no fígado de ratos imaturos.....	84

Figura 15 - Efeito do etanol na peroxidação lipídica em fígado de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez e lactação.....	85
Figura 16 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação no conteúdo de GSH em fígado da prole aos 21 dias de idade.....	86
Figura 17 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação na atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B) em fígado da prole aos 21 dias de idade.....	87
Figura 18 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e lactação no conteúdo total de glicogênio hepático	88
Figura 19 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na concentração de ferro hepático em ratos imaturos.....	89
Figura 20 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade da GS no fígado da prole de 21 dias de idade.	90
Figura 21 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre os níveis de TNF- α e IL-6 e atividade da MPO no fígado de ratos imaturos.....	91
Figura 22 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na morfologia hepática de ratos imaturos.....	92
Figura 23 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a contagem de núcleos (A) e hemácias (B) de microfotografias de fígado de ratos expostos ao etanol com 21 dias de idade.....	93
Figura 24 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol sobre o conteúdo de glicogênio em microfotografias de fígado de ratos expostos ao etanol com 21 dias de idade.	94
Figura 25 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de preparações histológicas do fígado de ratos imaturos.	95

Figura 26 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na atividade das enzimas: (A) alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e (B) γ -glutamil transferase (GGT) em soro de ratos imaturos.	96
Figura 27 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na concentração de ferro e transferrina sérico em ratos imaturos.....	97
Figura 28 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na glicemia em soro de ratos imaturos.....	98
Figura 29 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e lactação nas concentrações de colesterol total e triglicérides no soro de ratos imaturos.	99
Figura 30 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e aleitamento nos níveis do fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-1).....	100
Figura 31 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e aleitamento na atividade das dissacarídeses: maltase (A), lactase (B) e sacarase (C) no intestino da prole	102
Figura 32 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação sobre parâmetros associados ao estado redox no intestino da prole.	104
Figura 33 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) e GGT (C) em intestinos de ratos imaturos.	105
Figura 34 - Efeito da exposição da exposição materna ao etanol na atividade glutamina sintetase e da MPO em intestinos de ratos imaturos.....	106
Figura 35 - Análise da histomorfologia e morfométrica de cortes de duodeno de animais expostos ou não ao etanol através de microscopia de luz.....	107
Figura 36 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação na medida da (A) altura das vilosidades e (B) diâmetro do duodeno, realizadas em imagens de ML, objetiva de 10X, do intestino de ratos imaturos.	108

Figura 37 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação no número de células caliciformes do intestino de ratos imaturos.	109
Figura 38 - Mecanismo de toxicidade do etanol sobre o fígado, intestino e parâmetros sanguíneos de ratos de 21 dias de idade exposto ao etanol durante a prenhez e lactação.....	122
Figura 39 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículo de ratos de 21 dias de idade.....	127
Figura 40 - Consequências da exposição materna ao etanol sobre a captação [^{14}C]-glutamato em testículos de ratos de 21 dias de idade.....	128
Figura 41 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT em testículos de ratos de 21 dias de idade.....	129
Figura 42 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade da GS em testículos de ratos de 21 dias de idade.....	130
Figura 43 - Efeito do etanol sobre a atividade da captação de [^{14}C]-2-DG em testículos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na prenhez e amamentação.....	131
Figura 44 - Efeito do etanol sobre o conteúdo de glicogênio em testículos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na prenhez e lactação.....	131
Figura 45 - Efeitos da exposição materna ao etanol na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na atividade das enzimas: (B) superóxido dismutase (SOD) e (C) catalase (CAT) e (D) GSH em testículos de ratos imaturos.....	132
Figura 46 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na morfologia testicular de ratos imaturos.....	134
Figura 47 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação no número de células de Sertoli (A), espermatogônias (B) e espermatócitos (C) dos túbulos seminíferos de cortes histológicos de testículos de ratos imaturos.	135

Figura 48 - Imagens representativas dos testículos de ratos imaturos expostos ou não ao etanol durante a prenhez e lactação obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.....	136
Figura 49 - Mecanismo de toxicidade do etanol testículo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a gestação e lactação.....	142
Figura 50 – Proliferação celular em diferentes concentrações de etanol em cultura células de Sertoli no tempo de 24 horas.....	145
Figura 51 – Efeitos da exposição de 6 e 24 horas em diferentes concentrações de etanol sobre a proliferação celular (A), viabilidade celular (B), e potencial mitocondrial (C).....	146
Figura 52 - Efeitos da exposição de 6 e 24 horas em diferentes concentrações de etanol sobre a toxicidade celular, analisado no meio de incubação (A) e nas células (B).....	148
Figura 53 - Expressão da proteína LDH em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM de etanol em 6 e 24 horas.	149
Figura 54 - Expressão da proteína MCT-4 em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM de etanol em 6 e 24 horas.	150
Figura 55 – Representação da função mitocondrial pela expressão dos complexos (I, II, III, IV) em células de Sertoli exposta as etanol na concentração de 10 mM em 6 e 24 horas.....	151
Figura 56 - Efeitos do etanol em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM com tratamento de 24 horas em concentrações extracelulares de lactato, glutamina, alanina, glicose e piruvato.....	152
Figura 57. Os efeitos da exposição materna ao etanol sobre as células intestinais, hepáticas e testiculares de ratos imaturos.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparações de antropometria e medidas de composição corporal.....**75**

Tabela 2. Parâmetros hematológicos da prole de ratas expostas ao etanol durante a prenhez e o aleitamento.....**101**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•NO	Óxido nítrico
•OH	Radical hidroxila
¹⁴ C-DG	¹⁴ C-2-desoxi-D-glicose
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ARND	Deficiência do desenvolvimento neurológico relacionados com o etanol
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
Caco	Cacodilato
CAT	Catalase
CYP2E1	Citocromo P450 isoforma 2E1
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DHR	Dihidrorodamina
DL-AP	DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5)
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico (5,5'-Ditiobis (2-Ácido Nitrobenzoico))
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FAE	Efeitos fetais do etanol
FASD	Transtornos do espectro do etanol fetal
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamiltransferase
GH	Hormônio do crescimento

Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GLUT	Transportador de glicose
GPx	Glutationa peroxidase
GRAN	Granulócito
GR	Glutationa redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
GTA	Glutaraldeido
H ₂ DCF	2',7' diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCT	Hematócrito
HE	Hematoxilina/Eosina
HGB	Hemoglobina
HO ₂ [·]	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
IgA	Imunoglobulina A
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina – 6
LCME	Laboratório central de microscopia eletrônica
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LYMP	Linfócito

MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MDA	Malondialdeído
MEOS	Sistema microsomal de oxidação do etanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MON	Monócito
MPO	Mieloperoxidase
MPV	Volume médio de plaquetas
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NFKB	Fator nuclear kappa B
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OMS	Organização mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCT	Plaquetócrito
PDW	Amplitude de variação do tamanho das plaquetas
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato
PLT	Contagem de plaquetas
RBC	Contagem de eritrócitos
RDW	Largura de distribuição de células vermelhas
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RL	Radical livre
SAF	Síndrome Alcoólica fetal

SCs	Células de Sertoli
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	Tert-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricarboxílico
TEAF	Espectro de transtornos alcoólico fetal
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato gastrointestinal
TLR4	Receptor Toll-like 4
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico
TNF α	Fator de necrose tumoral
WBC	Contagem de glóbulos brancos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. DESENVOLVIMENTO.....	33
3.1. O USO NOCIVO DE ETANOL	33
3.2. USO DE ETANOL DURANTE A GRAVIDEZ	33
3.3. METABOLISMO DO ETANOL	36
3.4. ETANOL E FÍGADO	38
3.5. ETANOL E INTESTINO	41
3.6. ETANOL E O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	44
3.7. GLUTAMATO E AMINOTRANSFERASES.....	46
3.8. ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	48
3.9. γ -GLUTAMIL TRANSFERASE – GGT.....	50
4. HIPÓTESE E DIVISÃO DE ESTUDO	51
5. MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.1. MATERIAIS.....	53
5.2. ANIMAIS	53
5.3. TRATAMENTO COM ETANOL.....	53
5.4. MEDIDAS ZOOMÉTRICAS E PESO DOS TECIDOS.....	55
5.5. COLETA DE SANGUE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO E PLASMA.....	55
5.6. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	55
5.7. CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS NO PLASMA	56
5.8. CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL NO PLASMA.....	56
5.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRANSFERRINA SÉRICA.....	56
5.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SORO E FÍGADO.....	56
5.11. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGUÍNEA	57
5.12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA-I (IGF-1).....	57
5.13. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E TESTICULAR	58
5.14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES INTESTINAIS	58
5.15. GLUTAMINA SINTETASE	59
5.16. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE	59
5.17. ATIVIDADE DA γ -GLUTAMIL TRANSFERASE - GGT	60
5.18. LACTATO DESIDROGENASE - LDH	60
5.19. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	60
5.20. SUPERÓXIDO DISMUTASE- SOD.....	61
5.21. CATALASE - CAT	61
5.22. CONTEÚDO DE GSH	61
5.23. LIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL – TBARS	62
5.24. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E DE NITROGÊNIO (ERNS).....	62
5.25. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α E IL-6)	63
5.26. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	63
5.27. CAPTAÇÃO DE [14 C]-GLUTAMATO	63
5.28. INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	64
5.29. INFLUXO DE [14 C]-2-DESOXI-D-GLICOSE	64
5.30. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	65
5.31. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	65
5.32. MICROSCOPIA DE LUZ	65
5.33. ANÁLISE ESTATÍSTICA	67

5.34.	METODOLOGIA APLICADA NO DOUTORADO SANDUÍCHE NA UNIVERSIDADE DO PORTO - PORTUGAL	67
5.34.1.	<i>Cultura de células de sertoli (SCS) – linhagem SERW3</i>	67
5.34.2.	<i>Estudo da viabilidade celular</i>	67
5.34.3.	<i>Extração total de proteínas</i>	68
5.34.4.	<i>Western Blot</i>	68
5.34.5.	<i>Ensaio enzimático de lactato desidrogenase (LDH)</i>	69
5.34.6.	<i>Ensaio Sulforrodamina B – SRB</i>	69
5.34.8.	<i>Ressonância magnética nuclear de próton (RMN-1H)</i>	70
5.34.9.	<i>Análise estatística</i>	70
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.1.	PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A PREENHIZ E LACTAÇÃO	71
6.1.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
6.1.4.	DISCUSSÃO	76
6.1.5.	CONCLUSÃO PARCIAL	78
6.2.	PARTE II: ESTUDO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL DURANTE A PREENHIZ E LACTAÇÃO SOBRE O FÍGADO, INTESTINO E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DA PROLE	81
6.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	82
6.2.21.	DISCUSSÃO	153
6.2.22.	CONCLUSÃO PARCIAL	156
6.3.	PARTE III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A PREENHIZ E LACTAÇÃO SOBRE TESTÍCULOS DA PROLE	125
6.3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	145
6.3.8	DISCUSSÃO	153
6.3.9	CONCLUSÃO PARCIAL	156
6.4.	PARTE IV: IMPACTOS DO ETANOL NAS CÉLULAS DE SERTOLI: CONSEQUÊNCIAS PARA A FERTILIDADE MASCULINA	143
6.4.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	145
6.4.8.	DISCUSSÃO	153
6.4.9.	CONCLUSÃO PARCIAL	156
7.	CONCLUSÃO	157
	PERSPECTIVAS	159
	REFERÊNCIAS	161

1. INTRODUÇÃO

O etanol é a droga de abuso mais frequentemente consumida. Sendo uma molécula pequena e solúvel em água e lipídios, o etanol permeia por todos os tecidos do corpo e afeta a maioria das funções vitais de praticamente todos os órgãos incluindo fígado, rim, cérebro, coração e pâncreas. Os efeitos tóxicos do etanol são atribuídos ao aumento geração de radicais livres e o desenvolvimento de uma estado de estresse oxidativo. Aumento do EROs ocorre devido ao metabolismo do etanol e seus produtos de oxidação (LIEBER, 1995).

Apesar das evidências de que consumir álcool durante a gravidez é prejudicial para o feto em desenvolvimento, mais de 10% das mulheres nos Estados Unidos relatam pelo menos algum uso de álcool durante a gravidez (TAN et al., 2015). A prevalência de síndrome alcoólica fetal nos Estados Unidos varia de 0,5 a 2,0 por 1.000 nascidos vivos na população geral (MAY e GOSSAGE, 2001). A prevalência do espectro de transtornos alcoólico fetal foi estimada em 24 a 48 por 1.000 nascidos vivos nos Estados Unidos (MAY et al., 2014).

Características observadas no espectro dos efeitos causados pelo álcool ao feto em humanas são observadas em modelos de roedores de exposição pré-natal ao etanol (crescimento e desenvolvimento retardado pré e pós-natal, malformações físicas, anormalidades do SNC e problemas cognitivos e comportamentais) (KELLY et al., 2009; CALDWELL et al., 2008; HELLEMANS et al., 2008; HAUSKNECHT et al., 2005).

O consumo moderado ou excessivo de etanol durante a gestação pode levar a uma variedade de condições que juntas são denominadas por Síndrome alcoólica fetal (SAF), espectro mais grave dos efeitos causados pelo álcool. Dentre as principais, estão os defeitos no desenvolvimento, anormalidades cerebrais e craniofaciais, disfunção do sistema nervoso central, deficiência no crescimento de órgãos e de sistemas corporais em desenvolvimento. A SAF provoca comprometimento na aprendizagem, emoção, cognição, desempenho motor, e pode levar a transtornos comportamentais, bem como sociais. Para o diagnóstico de SAF, a criança deve atender aos seguintes critérios: deficiências de crescimento com atrasos neuro-cognitivos (atraso mental, atraso no desenvolvimento ou transtorno de déficit de atenção com hiperatividade -TDAH), pelo menos dois traços faciais (lábio superior fino, fissuras palpebrais curtas ou philtrum liso), e exposição pré-natal do etanol. (HOYME et al., 2005; KLINGENBERG et al., 2010).

Muitos estudos relacionam o consumo de etanol durante a gestação e amamentação sobre os efeitos causados no SNC do feto, ainda pouca se sabe sobre este consumo em outros órgãos

como fígado, intestino e sistema reprodutos masculino. Está bem descrito na literatura, os feitos do consumo de bebidas alcoólicas sobre estes órgão (fígado, intestino e testículo) em adultos, com isso, este trabalho mostra alterações na exposição de etanol durante a prenhez e lactação em animais de 21 dias idade sobre estes órgãos, no intuito de compreender a fisiopatologia da SAF.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do etanol em parâmetros oxidativos, metabólicos e morfológicos em células testiculares, hepáticas e intestinais de ratos imaturos, no intuito de compreender as consequências fisiopatológicas do alcoolismo materno sobre a prole. Os objetivos específicos do presente estudo foram divididos em quatro estudos apresentados no decorrer da presente tese.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1.O USO NOCIVO DE ETANOL

O consumo de bebidas alcoólicas é um problema na saúde pública em diversos países. A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 2014 o relatório global sobre etanol e saúde, publicando informação sobre o consumo do etanol. O relatório apontou que no ano de 2010 os indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos consumiram em torno de 8,7 litros de etanol puro por ano no Brasil. O mesmo relatório demonstrou que o consumo entre os homens foi de até 13,6 litros por ano e entre as mulheres de 4,2 litros (Relatório global OMS, 2014). Nos Estados Unidos da América (EUA) o elevado consumo de bebidas alcoólicas é uma das principais causas evitáveis de morte, sendo responsável por cerca de 1,8 milhões de mortes por ano (SEITZ e STICKEL, 2007). Estima-se que o alto consumo de bebidas alcoólicas resulte em aproximadamente 2,5 milhões de mortes a cada ano, em grande parte está relacionado com a doença hepática alcoólica (ALD) (OMS, 2011). Os dados, da Organização Mundial da Saúde (OMS), mostram que o consumo de bebidas alcoólicas chegou a 8,9 litros por pessoa no Brasil em 2016, superando a média internacional, que era de 6,4 litros.

De acordo com o Relatório da Organização Mundial de Saúde sobre Etanol e Saúde (2011), o abuso de etanol é responsável por pelo menos 60 tipos principais de doenças sistêmicas. Além disso, o consumo de etanol aumenta significativamente o risco global de desenvolver câncer (OMS, 2011). O consumo nocivo de etanol acarreta em efeitos adversos sobre vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, pâncreas, coração, sistema nervoso central (SNC) e trato gastrointestinal (TGI) (FISCHER et al., 2008; KARINCH et al., 2008; YANG et al., 2008). As consequências do consumo de etanol sobre o organismo são dependentes de diversos fatores, como da quantidade de etanol ingerida, da atividade dos sistemas de metabolização e eliminação do etanol, idade, sexo, entre outros.

3.2.USO DE ETANOL DURANTE A GRAVIDEZ

Uma pesquisa realizada nos EUA entre os anos de 2006-2010 estimou que 1 em cada 13 mulheres consumiram bebidas alcoólicas durante a gravidez (CDC 2012). Em outros dois estudos, onde foram entrevistadas mulheres logo após o nascimento dos seus filhos,

demonstrou-se que entre 25 e 35% dos recém-nascidos foram expostos ao etanol durante a gravidez (GAUTHIER et al., 2005a; LESTER et al., 2001).

O etanol pode atravessar com facilidade a barreira placentária e quando ingerido pela gestante é entregue diretamente para o líquido amniótico e para o feto. Primeiramente, o etanol atua na vasoconstrição no cordão umbilical e na placenta, aumentando o tempo de duração da exposição fetal devido à redução do fluxo sanguíneo, podendo chegar a uma hipóxia (GRINFELD, 2009). O etanol pode exercer uma ação direta ou indireta sobre o feto, interferindo na capacidade materna de suprir o crescimento normal deste. Além disso, o etanol também age indiretamente prejudicando o transporte de nutrientes essenciais ao desenvolvimento fetal realizado pela placenta e favorece a má nutrição materna (GOODLETT e HORN, 2001).

A exposição ao etanol tem muitos efeitos complexos sobre a função placentária, no crescimento e desenvolvimento fetal. As concentrações de etanol no sangue fetal e no líquido amniótico são equivalentes a mesma quantidade no sangue da gestante em cerca de uma hora após a ingestão. Nesse caso, o feto fica exposto às mesmas concentrações de etanol observadas no sangue materno (BURD et al., 2007). Porém, a exposição fetal é mais deletéria devido ao metabolismo e eliminação serem mais lentos, pois o fígado fetal, ainda não possui um sistema eficaz para metabolizar o etanol. Sendo assim o líquido amniótico permanece impregnado de etanol não metabolizado (etanol) e acetaldeído (metabólito do etanol) por mais tempo que no sangue materno. Portanto, a diminuição das concentrações de etanol no feto se dá primordialmente pela sua reentrada na circulação materna (BURD et al., 2007; GOODLETT e HORN, 2001).

Os efeitos teratogênicos do etanol sobre o feto em desenvolvimento estão relacionados com o período da gestação e a quantidade de etanol a qual o feto é exposto (SILVA et al., 2007). Tal fato é preocupante, principalmente quando já está esclarecido que o consumo de etanol durante a gestação envolve grande risco, devido à teratogenicidade fetal que a eles estão relacionados, transformando-se em sério problema de saúde pública, com enormes repercussões físicas, cognitivas e comportamentais (GRINFELD et al., 2000).

Mesmo o consumo leve a moderado durante a gestação está associado a adversos efeitos fetais e é especialmente prejudicial se a ingestão ocorre durante o período crítico de formação de órgãos, principalmente da 1ª a 6ª semanas de gestação (BEAN, 2002).

A exposição ao etanol em qualquer período da gravidez pode causar efeitos especialmente no SNC, tendo como consequência a diminuição do crescimento cerebral, manifestado pela

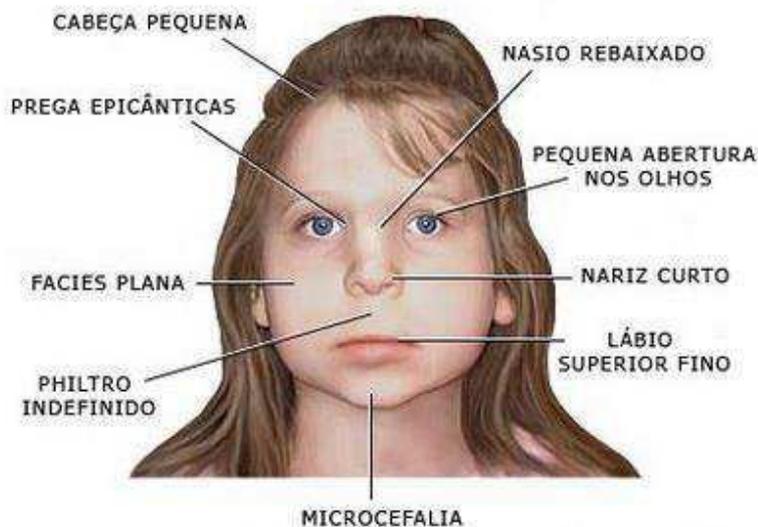
microcefalia (MAY et al., 2007). Aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro, baixo peso ao nascer, anomalias de crescimento, retardo mental, perímetro cefálico menor, Síndrome Fetal Alcoólica (SAF) e os efeitos fetais do etanol (FAE), também conhecido como deficiência do desenvolvimento neurológico relacionados com o etanol (ARND) espectro de desordens fetais alcoólicas (FASD), são alguns dos efeitos adversos causado pela ingestão de etanol durante a gestação (RUSSELL et al., 1998).

O quadro clínico do FASD incluem alterações físicas, mentais, comportamentais e/ou de aprendizado que se podem perpetuar por toda a vida; a ARND incluem alterações funcionais ou cognitivas, como dificuldades de aprendizado escolar, controle dos impulsos, memória, atenção e/ou de discernimento; os FAE incluem crescimento deficiente, problemas comportamentais ou déficits motores e de linguagem; os defeitos congênitos relacionados ao álcool (ARBD) incluem malformações cardíacas, ósseas, renais, das orelhas e dos olhos; a SAF resulta na restrição de crescimento, anormalidades neurocomportamentais e características faciais específicas (BERTRAND et al., 2005; HOYME et al., 2005).

A SAF afeta 33% das crianças nascidas de mães que fizeram uso de mais de 150 g de etanol por dia. Definida como um padrão de anomalias e déficits no desenvolvimento encontrado em crianças expostas por longos meses ao etanol no período pré-natal (MAY et al., 2007). A SAF é tipicamente caracterizada por um padrão de anormalidades faciais, retardo no crescimento, disfunção do sistema nervoso, alterações na coordenação motora, anomalias articulares, malformações cardíacas, redução da capacidade intelectual, entre outros (BERTRAND et al., 2005).

Associado a todas estas características, crianças com SAF frequentemente sofrem com baixo QI, comportamento inapropriado ou imaturo, falta de organização, dificuldade na leitura e memória, dificuldades motoras, na fala e na audição, déficit de atenção e hiperatividade (STREISSGUTH et al., 2003). O retardo mental pode aparecer em níveis de gravidade distintos, acomete as crianças com diagnóstico de SAF estabelecido, mas também aquelas que tiveram alguma exposição ao etanol durante a gestação (ARCHIBALD et al., 2001).

Figura 1 - Características morfológicas da SAF.



Características encontradas em crianças expostas ao etanol durante a gestação e portadoras da SAF. Essas características são complementares para diagnóstico da doença.

Fonte: adaptado Clarke e Gibbard, 2003

Crianças com SAF têm aspectos faciais muito característicos que auxiliam no diagnóstico, incluindo hipoplasia do terço médio da face, fendas oculares curtas, olhos pequenos que aparecem amplamente espaçados e epicanto interno, lábio superior fino, indistinto sulco entre o lábio superior e o nariz e filtro nasal longo liso (Figura 1), restrição de crescimento, incluindo microcefalia relativa (STOLER et al., 1999; BERTRAND et al., 2005).

3.3.METABOLISMO DO ETANOL

Após a ingestão oral, o etanol é rapidamente absorvido pelo TGI por difusão passiva através da parede do estômago, cerca de 20% do total ingerido, sendo o restante absorvido através da parede do duodeno e do intestino delgado (NORBERG et al., 2003). A metabolização do etanol absorvido pelo TGI ocorre principalmente nos hepatócitos, sendo que apenas uma pequena quantidade da dose ingerida é eliminada de forma inalterada no ar exalado, no suor e na urina (HOLFORD, 1987; MANZO-AVALOS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010).

O efeito do etanol em vários tecidos depende da sua concentração no sangue periférico, dependendo de muitos fatores como a dose e a concentração ingerida, o estado alimentado ou jejum, a idade e o sexo. As mulheres geralmente têm o maior pico de etanol no sangue em g/kg

comparado aos homens. Essa diferença na alcoolemia observada entre homens e mulheres deve-se ao fato de que as mulheres têm maior porcentagem de gordura e menor quantidade de água corporal, o que implica em menor volume hídrico para a biodistribuição do etanol. Além disso, algumas mulheres apresentam diminuição na concentração da enzima etanol desidrogenase (ADH), que oxida o etanol em acetaldeído (CEDERBAUM, 2012).

A metabolização do etanol ocorre principalmente no fígado (BEIER e MCCLAIN, 2010). O etanol é oxidado á acetaldeído por três vias metabólicas, conforme esquematizado na Figura 1: i) através da enzima etanol desidrogenase (ADH); ii) através do sistema de microsomal de oxidação do etanol (MEOS) formado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1); e iii) através da ação da catalase (ZAKHARI, 2006). Em indivíduos adultos não alcoolistas o metabolismo oxidativo do etanol ocorre através de uma via principal na qual a enzima citosólica ADH produz acetaldeído, uma molécula altamente reativa e tóxica, às custas da redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD^+) a sua forma reduzida (NADH) (ZAKHARI, 2013).

Em indivíduos adultos que são consumidores crônicos de etanol, uma segunda via, o MEOS, presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, metaboliza o etanol através do CYP2E1, que, como ADH, converte o etanol em acetaldeído (OHKUBO et al., 2009). A oxidação do etanol via sistema microsomal CYP2E1 consome NADPH da célula e pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (HO^\cdot) (ZAKHARI, 2013).

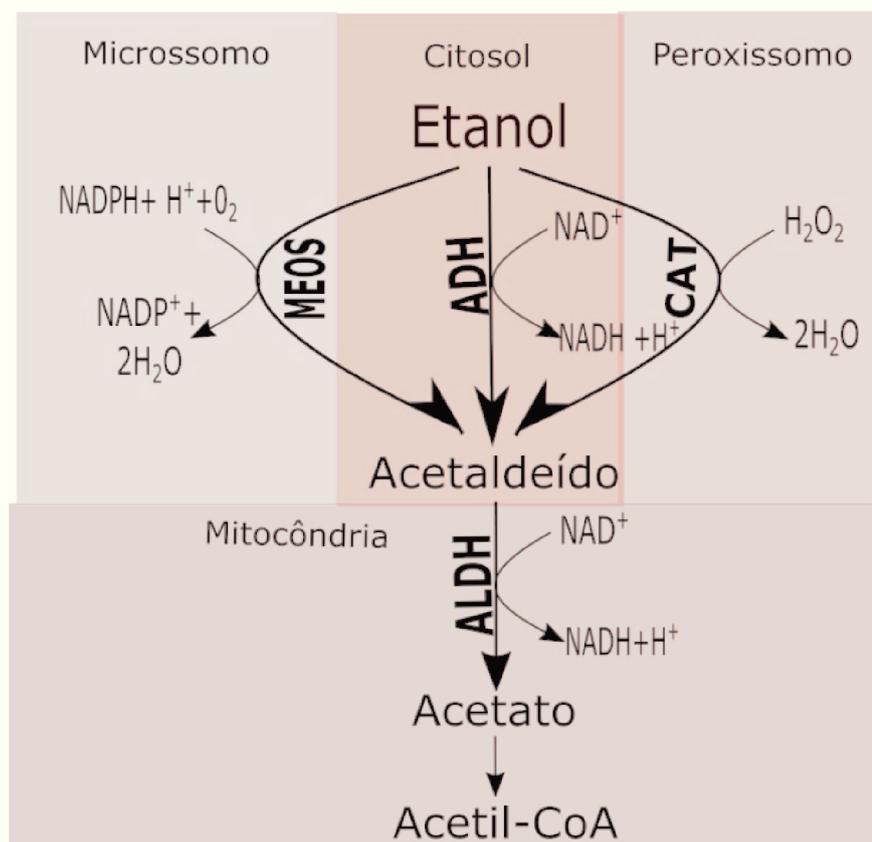
Outra via no qual o etanol pode ser metabolizado é pela enzima catalase, localizada nos peroxissomas. A atividade da catalase é dependente da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também tendo como produto final o acetaldeído. Esta é capaz de oxidar apenas uma pequena quantidade de etanol, cerca de 2% do total ingerido (AGARWAL, 2001).

Todas essas três vias oxidativas geram acetaldeído, que, em seguida, é rapidamente oxidado. Este processo é catalisado principalmente pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), localizada na mitocôndria, formando assim, o acetato e reduzindo o NAD^+ a NADH (ZAKHARI, 2013). O acetato, por sua vez, pode ser convertido em acetil-CoA, o qual pode ser oxidado no ciclo de Krebs, gerando CO_2 e água. Além disso, o acetil-CoA pode ser utilizado para gerar corpos cetônicos, aminoácidos, ácidos graxos e esteroides (AGARWAL, 2001).

Ambos ADH e de ALDH utilizam NAD^+ , o qual é reduzido para NADH. Conseqüentemente, durante a oxidação do etanol a relação NADH/NAD^+ é aumentada, alterando o estado redox celular e desencadeando uma série de efeitos relacionados com o

consumo de etanol. A metabolização de grandes quantidades de etanol altera a relação NADH/NAD, inibindo a metabolização de ácidos gordos, a síntese de proteínas e aumenta a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres (NORBERG, et al., 2003).

Figura 2- Metabolismo hepático do etanol.



A oxidação do etanol ocorre principalmente através da ação de três vias metabólicas: atividade da álcool desidrogenase (ADH), do sistema microsomal de oxidação ao etanol (MEOS) (CYP2E1) e da catalase. Todas as três vias tem como produto final o acetaldeído, que será então oxidado em acetato e água pela aldeído desidrogenase (ALDH) e por fim em Acetil-CoA, por ação da Acetil-CoA sintetase.

Fonte: do Autor

3.4. ETANOL E FÍGADO

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 1500g no humano adulto, representando de 2,5 a 4,5% da massa corporal total. Ele está situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, e é dividido em quatro lobos (os lobos principais são o direito e o esquerdo, na face anterior localiza-se o lobo quadrado e situado a face posterior o lobo caudado) com a sua região superior e arredondada inserida no domo do

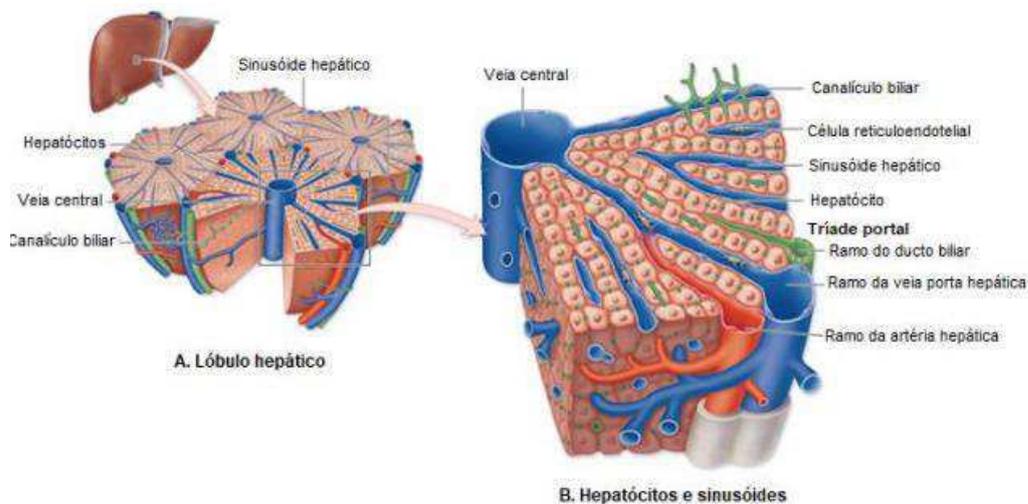
diafragma. O fígado é revestido por cápsula de tecido conjuntivo, conhecida como cápsula de Glisson. Cada lobo organiza-se em lóbulos, com as veias centrais no centro de cada lóbulo e as áreas portais na periferia (CORMACK, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MISDRAJI, 2014).

A maior parte do fígado é constituída por hepatócitos que compõem 60% da população de células hepáticas. Estes são células poliédricas, contendo um núcleo central com cromatina descondensada, apresentando um citoplasma amplo e eosinófilo (devido principalmente ao grande número de mitocôndrias), contendo 1-2 nucléolos no seu interior. São células polarizadas, que se relacionam com o canalículo biliar, com a membrana de hepatócitos vizinhos e com os capilares sinusoides. Os sinusoides transportam o sangue a partir da veia porta e da artéria hepática para a veia central e são revestidos pelas células endoteliais fenestradas, no lúmen sinusoidal estão os macrófagos hepáticos, denominados de células de Kupffer. Entre os hepatócitos e as células endoteliais hepáticas sinusoidais, situa-se um espaço, designado de espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MCCUSKEY, 2008; MIZUGUCHI et al., 2011).

Os hepatócitos são responsáveis por grande parte das funções exercidas no fígado. Na microscopia eletrônica as células hepáticas mostram-se com um núcleo grande e redondo, rico em organelas citoplasmáticas, incluindo retículo endoplasmático liso e rugoso, e muitas mitocôndrias, além de grânulos densos de glicogênio por todo o citoplasma (SOTO-GUTIERREZ; NAVARRO-ALVAREZ, KOBAYASHI, 2011; ROY-CHOWDHURY; ROY-CHOWDHURY, 2014).

Outros componentes estruturais do fígado são: estroma de tecido conjuntivo; veia central do lóbulo, terminais nervosos, vasos linfáticos, ducto biliar e os macrófagos, que no fígado são chamados de células de Kupffer, e são encontrados nos capilares sinusoides (figura 3) (LEE et al., 2001).

Figura 3 - Microestrutura do tecido hepático e as divisões em lóbulos.



Microestruturas dos lóbulos do fígado, contendo em sua maioria hepatócitos. A artéria hepática, a veia porta e a via biliar formam a tríade portal. O fígado recebe suprimento sanguíneo da veia porta hepática e das artérias hepáticas. A veia porta contém inúmeras ramificações pequenas, ligadas aos sinusóides. O sangue transita pelos sinusóides hepáticos até a veia central de cada lóbulo.

Fonte: Adaptado Mescher, 2010.

O fígado realiza diversas funções vitais, sendo responsável por manter a homeostasia e as funções fisiológicas do organismo. Dentre as diversas funções do órgão, destacam-se a regulação do metabolismo de diversos nutrientes, papel imunológico, síntese proteica e de outras moléculas, secreção da maioria das proteínas plasmáticas, como: a albumina, o angiotensinogênio, fatores de coagulação, proteínas carreadoras de ferro, proteínas do sistema complemento e proteínas que participam do transporte plasmático de colesterol e de triglicerídeos, armazenamento de vitaminas, degradação hormonal, secreção de vários hormônios como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), e metabolismo e a degradação de hormônios, fármacos e toxinas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MARONPOT et al., 2010).

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização do etanol, portanto é considerável que o etanol e seus metabólitos possam exercer um efeito citotóxico direto agindo como hepatotoxinas (SETH et al., 2011). A produção de acetaldeído é danosa ao fígado por desencadear diretamente inflamação, remodelação da matriz extracelular e fibrogênese (MELLO et al., 2008). Além disso, liga-se covalentemente a proteínas e DNA, levando à produção de aductos nos hepatócitos (SETSHEDI et al., 2010; NIEMELÄ, 2001), e também

estimula a sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) em células hepáticas que atingem um perfil pró-fibrogênico e pró-inflamatório (CHEN, 2002).

A metabolização do etanol via CYP2E1, que é induzido de acordo com o consumo de álcool, gera EROs, resultando em peroxidação lipídica, depleção de glutatona mitocondrial e depleção de S-adenosilmetionina (SETSHEDI et al., 2010). A CYP2E1, também gera EROs, como peróxido de hidrogênio e íons superóxido, que são responsáveis pelo perfil pró-inflamatório da lesão hepática relacionada ao etanol (SETH et al., 2011). Outro fator que pode desencadear a esteatose hepática, inflamação e fibrose é o lipopolissacarídeo (LPS), derivado da microbiota (SZABO, 2007; MELLO et al., 2009).

3.5. ETANOL E INTESTINO

O intestino de um adulto é um órgão altamente complexo e com várias funções essenciais. Sua principal função é a absorção de nutrientes, principalmente nos segmentos iniciais (CHIN et al., 2017). Carboidratos, proteínas, lipídios e outros nutrientes são absorvidos pelos enterócitos intestinais e são absorvidos em uma rede vascular altamente integrada (CHIN et al., 2017). A digestão é realizada pelas enzimas provenientes do pâncreas, que são despejadas no duodeno, e pelas enzimas presentes na membrana das células intestinais (CHIN et al., 2017; GUYTON e HALL, 2011).

A absorção dos nutrientes provenientes das reações enzimáticas digestivas ocorre no intestino delgado, por intermédio das microvilosidades intestinais. O intestino delgado está localizado na porção do tubo digestivo entre o estômago e o intestino grosso, no qual se divide em: duodeno, jejuno e íleo (GUYTON e HALL, 2011). Na porção do jejuno e íleo há a produção do suco entérico pelo epitélio intestinal, formado por enzimas digestivas (proteases, lactases, sacarases, maltases, entre outras) (CHIN et al., 2017; GUYTON e HALL, 2011).

Além de absorver nutrientes, o intestino tem um papel importante na imunidade. Dentro do intestino, os conteúdos luminais entram em contato com uma camada epitelial, que deve servir como uma barreira para o ambiente externo e proteger o organismo contra micróbios e patógenos nativos (comensais) (ALANA et al., 2017; TURNER, 2009). Além disso, a colonização por bactérias comensais no nascimento estimula o desenvolvimento do sistema imunológico e é necessária para a função imunológica adequada (ALANA et al., 2017; ROUND, 2009).

Para satisfazer adequadamente às demandas celulares dessas funções complexas, o epitélio intestinal é organizado em vilosidades, que se projetam para dentro do lúmen. As estruturas altamente complexas da vilosidade do intestino do adulto emergem ao longo do tempo de desenvolvimento. No início do desenvolvimento embrionário, o epitélio intestinal é uma estrutura relativamente plana, em forma de tubo, que sofre um processo chamado morfogênese das vilosidades, através do qual o intestino relativamente plano em forma de tubo dá origem a vilosidades e estruturas das criptas (ALANA et al., 2017; SHYER et al., 2013; MCAVOY, 1978).

O epitélio intestinal desempenha um papel central na demarcação de micróbios no intestino do sistema imune do hospedeiro. As células epiteliais colunares simples exibem adaptações físicas para manter a integridade da barreira, incluindo microvilosidades, junções apertadas, produção de peptídeos antimicrobianos e células especializadas de células epiteliais intestinais (Figura 4). As células epiteliais do intestino têm junções apertadas que consistem em zona oclusiva e ocludina (SZABO, 2011; VAROL et al., 2010; 2009; ARTIS, 2008).

Apesar do metabolismo de etanol de primeira passagem acontecer no estômago, a alta concentração de etanol pode atingir o duodeno e o jejuno superior, onde os efeitos diretos sobre a mucosa estão sendo estudados. Pesquisadores mostraram mecanismos envolvidos nos efeitos diretos do etanol sobre o intestino, como a inibição mediada pelo acetaldeído (metabólito do etanol) na expressão proteica da junção estreita do intestino (Rao et al., 2004; 2008), e redistribuição das proteínas das junções apertadas (occludina e ZO-1) como também junções aderentes (SETH, et al., 2004, 2007) resultando no rompimento da integridade intestinal.

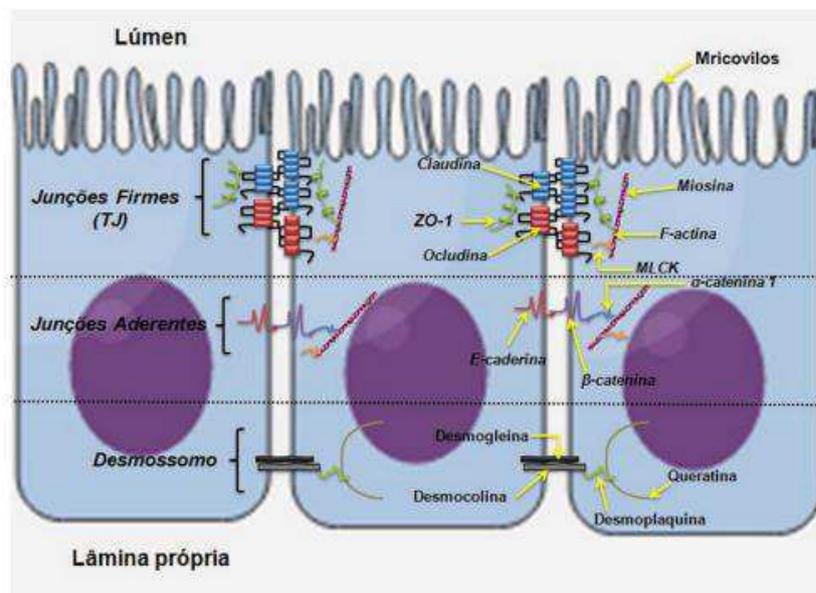
Tang e colaboradores (2009) mostraram que o etanol também atua via indução de óxido nítrico prejudicando o citoesqueleto dos microtúbulos das células epiteliais intestinais. Tanto o etanol como seus metabólitos afetam a integridade das junções apertadas no intestino (claudinas, ocludina), proteínas adaptadoras de membrana do citoesqueleto de actina, bem como diferentes componentes de sinalização intracelular, ocasionando na perturbação da permeabilidade do intestino (RAO et al., 2004; 2008; FERRIER, et al., 2006).

Assim, o etanol perturba a integridade funcional e estrutural das células epiteliais intestinais e resulta em hiperpermeabilidade das monocamadas de células intestinais e vazamento intestinal (BANAN et al., 1999; 2000; 2001; KESHAVARZIAN et al., 2001; KESHAVARZIAN e FIELDS, 2003; TANG et al., 2008). Uma das consequências do aumento da permeabilidade do intestino é o extravasamento do lipopolissacarídeo (LPS),

também conhecido como endotoxina, O LPS pode levar à esteatose hepática, uma vez que desencadeia uma cascata de reações e induz a inflamação (SZABO, 2007; MELLO et al., 2009).

O intestino abriga bilhões de microrganismos, mas, sob condições fisiológicas, o LPS entra na circulação portal para serem depurados pelas células de Kupffer (macrófagos residentes) e hepatócitos que possuem diferentes sistemas de reconhecimento de LPS (DUERKOP et al., 2009; WU e CEDERBAUM, 2009). O etanol prejudica a barreira intestinal, levando a níveis aumentados de LPS circulantes que se ligam ao receptor de superfície CD14 nas células de Kupffer hepáticas, produzindo EROs e estimulando a cascata de sinalização do receptor Toll-like 4 (TLR4) e assim promovendo a ativação do NF- κ B e a liberação de citocinas inflamatórias, notavelmente o fator de necrose tumoral (TNF- α) (PARLESAK et al, 2000; SU et al, 2000).

Figura 4 - Ilustração das células do intestino delgado e proteínas juncionais.



As membranas plasmáticas das células adjacentes, localizadas abaixo da base das microvilosidades, são unidas por meio das junções firmes. As proteínas formadoras dessas junções são claudinas, ocludina e ZO-1, que interagem com os filamentos do citoesqueleto (F-actina e Miosina). Mais abaixo se encontram as proteínas das Junções aderentes: E-caderina, α -catenina1, β -catenina, que interagem com a F-actina. Desmossomos, que estão localizados abaixo do complexo juncional apical é formado por interações entre desmogleína, desmocolina, desmoplaquina e filamentos de queratina.

Fonte: adaptado Rodrigues et al., 2016.

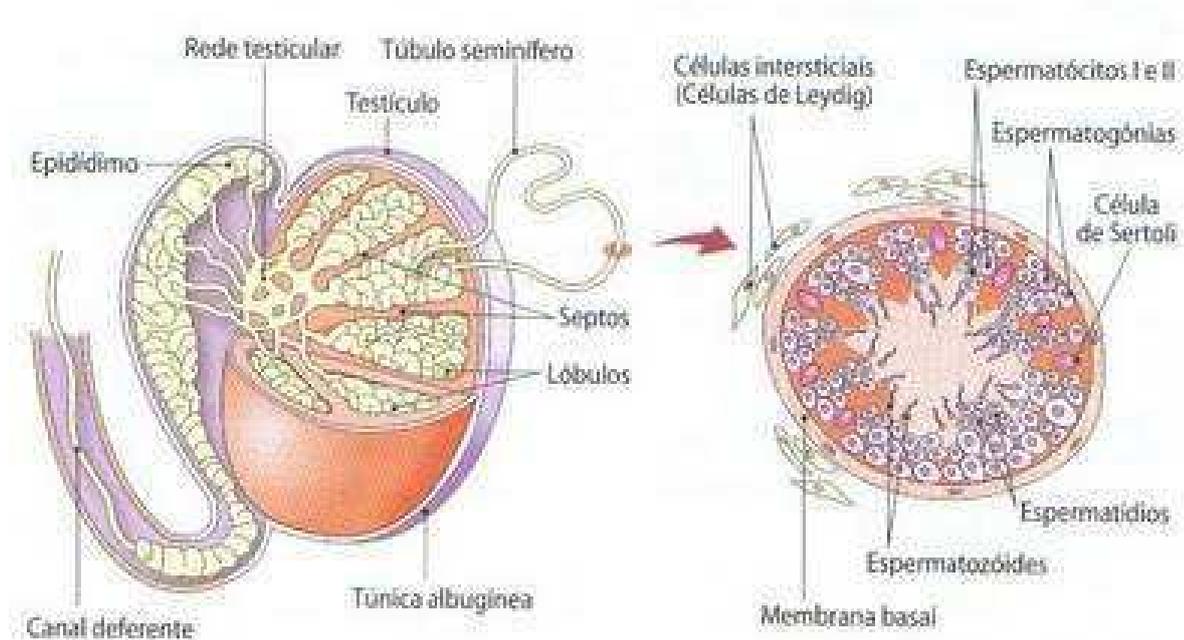
Como visto anteriormente, vários estudos demonstraram as consequências do consumo de bebidas alcoólicas por adultos na função do intestino, mas pouco se sabe sobre as consequências do etanol no intestino em desenvolvimento na exposição materna.

3.6. ETANOL E O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino é constituído de dois testículos ou gônadas masculinas, estes são ovóides, pareados e encapsulados, sua função consiste em promover à produção de gametas masculinos (espermatozóides), hormônios esteróides e protéicos, que são essenciais à função reprodutiva masculina (FAWCETT et al., 1970; SANTEN e BARDIN, 1973). O testículo é revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo chamada de túnica albugínea, que envia septos para o seu interior, dividindo-o em lóbulos.

Os lóbulos são divididos em dois compartimentos, o intersticial constituído de células de Leydig (que são responsáveis por produzir hormônios androgênio), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras de tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos; e um compartimento tubular, onde se encontra uma rede de túbulos seminíferos, responsável pela produção e transporte de espermatozoides. No lúmen tubular encontra-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides (RUSSELL et al., 1990; SLUKA et al., 2006).

Figura 5 - Ilustração esquemática do testículo e túbulo seminífero.



Os testículos possui uma capsula de proteção de tecido conjuntivo, nomeada túnica albugínea, que projeta septos para o seu interior, sendo dividido em lóbulos. Os lóbulos são constituídos no seu interstício de células de Leydig e túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos são constituídos de células de Sertoli e células germinativas (espermatócitos I e II, espermatogônias, espermatídios e espermatozoides).

Fonte: adaptado de NETTER FH, 2011

Os testículos possuem uma barreira hemato-testicular onde é criado um compartimento exclusivo de células germinativas isoladas em um ambiente especializado, protegendo as células germinativas, impedindo a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial (SHARPE et al., 2003; LOSS et al., 2007). Nos ratos com 15 a 21 dias de idade, as células de Sertoli deixam de se dividir, e junções entre as células de Sertoli vizinhas se desenvolvem, criando, assim, essa barreira (ORTH, 1982). O consumo de etanol na prenhez pode atravessar facilmente a placenta, assim conseguindo chegar até os testículos, já que a barreira hemato-testicular ainda não está completamente formada.

O consumo crônico de etanol pode causar alterações no trato reprodutivo masculino de mamíferos adultos (EMANUELE e EMANUELE, 2001). Os efeitos em longo prazo do consumo crônico de etanol incluem disfunção erétil, diminuição da libido e ginecomastia (BUFFUM, 1983). Um dos mecanismos possíveis desses efeitos é a redução da testosterona sérica causada pela diminuição da produção testicular e aumento da depuração metabólica no fígado (BUFFUM, 1983). Além disso, estudos têm encontrado evidências de lesões testiculares (MESQUITA et al., 2013) e diminuição do peso testicular (ADARAMOYE e ARISEKOLA, 2013) após exposição ao etanol.

Outros estudos já demonstram um aumento de apoptose (ZHU et al., 2000) e uma diminuição na proliferação em células testiculares (KOK e KIM, 2006). Também já foi demonstrado que a exposição ao etanol altera a expressão de proteínas no epidídimo (ARCO et al., 2003), podendo levar à diminuição da qualidade do esperma e diminuição da capacidade fértil dos gametas masculinos (DAMM e COOPER, 2010). O abuso prolongado de etanol em homens também é conhecido por causar alterações no volume seminal, na concentração de esperma, na percentagem de espermatozoides móveis, diminuição na concentração de testosterona e atrofia testicular, podendo levar em muitos casos à impotência e esterilidade (TADIC et al., 2000; MARTINI et al., 2004, MANEESH et al., 2006).

A oxidação do etanol ocorre como uma parte do metabolismo do etanol no fígado. Durante esse processo formam-se EROs que podem contribuir para lesões celulares, desempenhando um papel importante no dano ao sistema de reprodução causado pelo consumo de etanol (EMANUELE e EMANUELE, 2001). Monoski e colaboradores (2002) mostraram que o uso do etanol de forma "social" ou leve não parece interferir com a qualidade do sêmen. No entanto, a ingestão excessiva de etanol aguda tem efeitos adversos sobre a fertilidade masculina, causando diminuição das concentrações séricas de testosterona. Além disso, o uso

nocivo do etanol leva à diminuição da sensação e inervação peniana, podendo também contribuir para a disfunção erétil.

3.7. GLUTAMATO E AMINOTRANSFERASES

No fígado, as aminotransferases tem praticamente o mesmo papel que no SNC, essas enzimas catalisam a conversão de aspartato e alanina em oxalacetato e piruvato, respectivamente e, são parâmetros úteis na avaliação das lesões hepáticas, podendo ser utilizadas para diferenciar doença hepática alcoólica com alta especificidade (ISOLANI, 2013; MINCIS, 1997). Quando ocorrem lesões ou destruição das células hepáticas, há liberação dessas enzimas para a circulação sanguínea, sendo que a sua localização auxilia o diagnóstico e prognóstico de patologias hepáticas. Em dano hepatocelular a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2000).

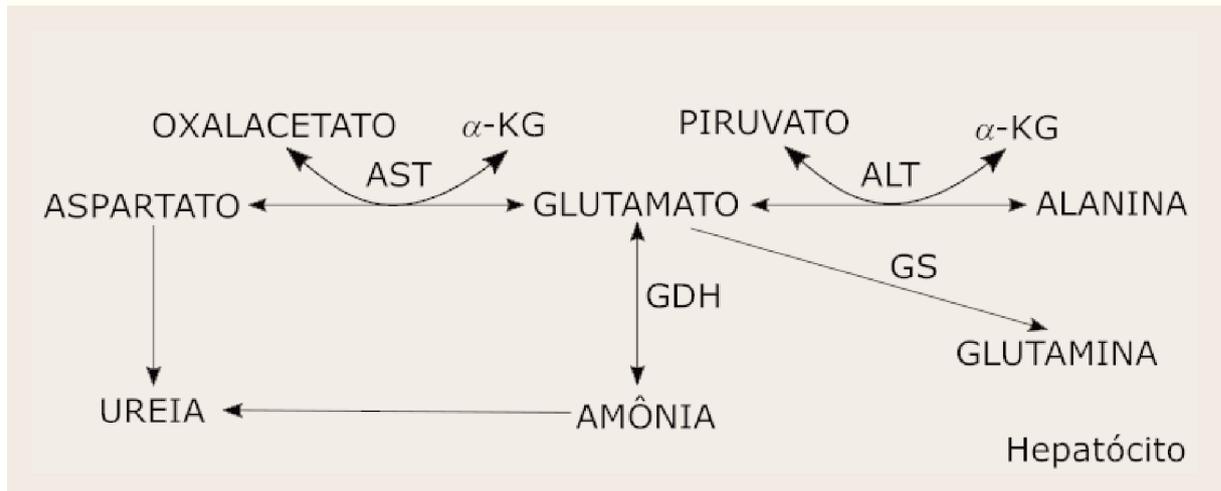
As aminotransferases catalisam a transferência reversível de uma amina de um aminoácido para um α -cetoácido. Essas enzimas, geralmente, transferem o grupo amino de vários aminoácidos para o α -cetoglutarato, para a conversão em NH_4^+ (LEHNINGER, 2000). A alanina aminotransferase (ALT) é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da aspartato aminotransferase (AST) está presente na mitocôndria (MURRAY et al., 1994).

O glutamato das células extra-hepáticas, possuem um importante papel no metabolismo da ureia, este consegue transferir seu grupo α -amino para o piruvato originando α -cetoglutarato e alanina. Assim a alanina formada pode ser transportada no sangue até o fígado. Uma vez nos hepatócitos, a ALT hepática transfere o grupo α -amino da alanina para o α -cetoglutarato, formando piruvato e glutamato (ADEVA et al., 2012). Assim, a enzima glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a desaminação do glutamato em α -CG, removendo o grupo amino (NH_3) do glutamato e liberando o para o ciclo da ureia (Figura 5). Já o esqueleto carbônico da alanina pode ser utilizado na síntese de glicose hepática a partir do piruvato (gliconeogênese) (KUNTZ, 2008).

A reação inversa ocorre quando o grupo α -amino do glutamato é transferido ao oxaloacetato produzindo α -cetoglutarato e aspartato, em uma reação catalisada pela AST, caso exista a necessidade de formação de um aminoácido específico para uma rota biosintética (ADEVA et al., 2012). O aspartato doa o grupo α -amino para o ciclo da ureia que acontece no

fígado (COOPER, 2011). O papel das aminotransferases no metabolismo hepático está representado na Figura 6.

Figura 6- Representação esquemática do papel das aminotransferases no fígado.



O glutamato pode ser convertido α -cetoglutarato pela transaminação realizada por uma aminotransferase, que transferem o grupo amino do glutamato para um grupo amino α -cetoácido gerando α -KG e um novo aminoácido. Alanina aminotransferase (ALT) converte glutamato em alanina, catalizado pela conversão de piruvato ao α -cetoglutarato (α -KG). A aspartato aminotransferase (AST) converte glutamato em aspartato, catalizado pela conversão de oxalacetato ao α -KG. O glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a reação de glutamato para α -KG liberando amônia. O glutamato é amidado a glutamina pela GS.

Fonte: adaptado Cooper, 2011.

No testículo e fluidos testiculares há a presença abundante de glutamato, mas ainda não foram bem definidos os mecanismos pelos quais o glutamato é compartimentalizado nos testículos de mamíferos, sendo este o principal aminoácido livre no sêmen, epidídimo e testículo na maioria dos mamíferos (MUSHAHWAR et al., 1973; HINTON, 1990). No sêmen, este aminoácido é encontrado no plasma seminal (LEE et al., 2011).

Como em outros tecidos, o glutamato testicular pode ser metabolizado em glutamina, já que concentrações elevadas de glutamina sintetase (GS) (enzima que metaboliza rapidamente qualquer glutamato disponível em glutamina) são expressas nesse tecido (HOLASH et al., 1993; VAN STRAATEN et al., 2006). Concentrações elevadas de glutamina, bem como as enzimas que a metabolizam estão presentes nos testículos, espermatogônias, espermátócitos e células de Sertoli (CASTELLO'N, 2003; GEIGERSEDER et al., 2003).

3.8. ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo ocorre em situações que as células são expostas a um ambiente pró-oxidante e os mecanismos defensivos antioxidantes são excedidos de forma a afetar o estado redox da célula, ocorrendo um desequilíbrio entre o mecanismo oxidativo e o sistema de defesa. Nos sistemas biológicos, os elementos pró-oxidantes provêm em sua maioria do oxigênio (ZHU et al., 2012).

EROs incluem os radicais livres, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidropéroxil (HO_2^{\bullet}), o radical hidroxil ($\bullet OH$), o óxido nítrico ($NO\bullet$), bem como outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO$). As EROs podem ser geradas durante radiação ultravioleta, raios-X, por poluentes na atmosfera, produzidas por neutrófilos e macrófagos durante inflamação, subprodutos de reações de transporte de elétrons nas mitocôndrias que é catalisada por outros mecanismos, xenobióticos, medicamentos, tabagismo, entre outros (VALKOA et al., 2006).

Os danos oxidativos gerados estão relacionados a diversas consequências fisiopatológicas como no processo de envelhecimento e de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite reumatoide, inflamação crônica, hipertensão, degeneração macular, Parkinson e Alzheimer. Sobre essas condições o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, que tem como função a inibição ou a redução dos danos causados às células pela ação das EROs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

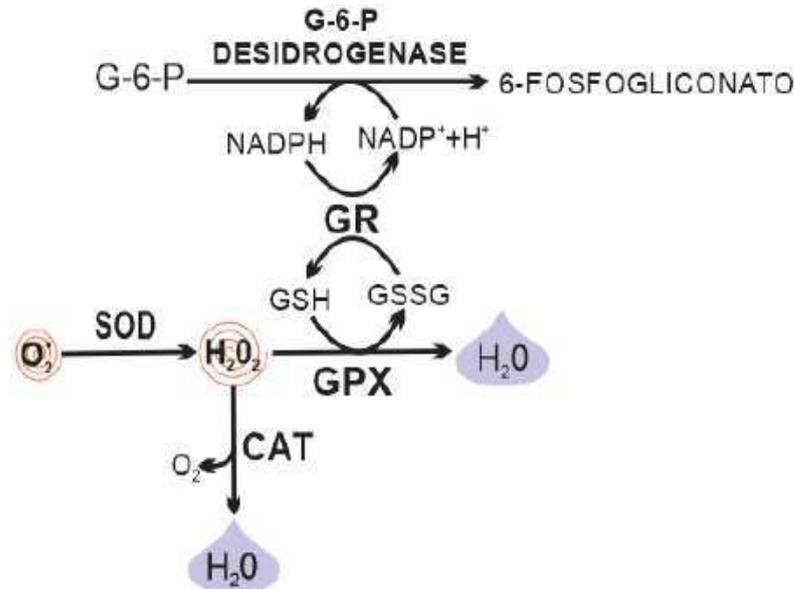
Esses danos oxidativos gerados pelas EROs são equilibrados pela ação de antioxidantes não-enzimáticos (endógenos ou nutricionais) e enzimáticos (VALKOA et al., 2006). Por meio da ação das enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), as células procuram manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, com isso evitando a formação do radical hidroxila, que é altamente reativo e deletério às células (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Os antioxidantes enzimáticos são divididos em defesas enzimáticas primárias e secundárias.

A defesa primária é composta por três enzimas que neutralizam as EROs: a SOD, que converte o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; a CAT, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular; e a GPx, que transfere dois elétrons da GSH para reduzir os peróxidos (Figura 7) (RAHMAN, 2007; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

A defesa secundária inclui a glutathiona redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A GR reduz a glutathiona a partir de sua forma oxidada (dissulfeto de glutathiona, GSSG) para sua forma reduzida (GSH). Esta reciclagem de GSH é fundamental no intuito de neutralizar mais espécies reativas. A G6PD regenera o NADPH, criando um ambiente redutor (figura 6) (RATNAM et al, 2006; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Figura 7 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas.



Defesas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR). Espécies reativas: radical ânion superóxido (O₂⁻). Peroxido de hidrogênio (H₂O₂).

Fonte: Do autor.

As enzimas glutathiona-S-transferase (GST) e a GR agem, respectivamente, detoxificando agentes eletrofílicos (como xenobióticos) e reduzindo o GSSG à GSH (Figura 6) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O principal antioxidante não enzimático é a GSH, considerada como o principal tampão redox tiol-dissulfeto da célula, abundante no citosol, núcleo e mitocôndrias. Geralmente, a capacidade antioxidante dos compostos tiólicos é devido ao átomo de enxofre, que pode facilmente acomodar a perda de um único elétron. Dentre as funções da GSH inclui-se a participação no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, bem como detoxificação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos lipídicos através da ação catalítica da GPx. No entanto, a depleção de GSH pode estar associada com a diminuição da proliferação

celular em células endoteliais vasculares e aumento da proliferação de fibroblastos (VALKOA et al., 2006).

3.9. γ -GLUTAMIL TRANSFERASE – GGT

A γ -glutamil transferase (GGT) está incorporada na superfície externa da membrana plasmática, e nas frações microssômicas envolvidas no transporte de aminoácidos. Se manifesta em ordem decrescente no túbulo proximal renal, fígado, pâncreas e intestino. Os níveis séricos da GGT são principalmente de origem hepática (LOMBA et al., 2013; HOCK et al., 2005; FIGLIE et al., 2002; DUFOUR et al., 2000).

A proteína γ -glutamil transferase (GGT), participa na reciclagem de aminoácidos da glutatona e conjugados de glutatona secretados para o meio extracelular, catalisando a transferência da porção de γ -glutamil da glutatona, ou conjugados de glutatona, para aceptores tais como aminoácidos e dipeptídeos. Esses aminoácidos são reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese de novo de GSH. A GGT também é responsável pela degradação da glutatona, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese proteica no intestino (MARES et al., 2005).

Valores elevados encontrados no soro podem estar envolvidas em obstrução biliar intra ou pós- hepática, câncer hepático, hepatite infecciosa e cirrose. A GGT é proteína álcool induzida, onde os níveis aumentados de álcool no soro refletem a indução de maior atividade da enzima. O mecanismo exato da elevação da GGT nos alcoolistas não é bem conhecido, mas poderia estar relacionado com um processo de indução enzimática e com uma lesão dos hepatócitos (HOCK et al., 2005; FIGLIE et al., 2002).

Dados prévios do grupo demonstraram que o etanol induz estresse oxidativo, disfunção glutamatérgica e déficit energético em hipocampo de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação (CESCONETTO et al., 2016). Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são conhecidos. Sendo assim, o estresse oxidativo, bem como a modulação do sistema glutamatérgico e do metabolismo energético podem ser alvos da toxicidade do etanol em outros tecidos de animais expostos a esta substância.

4. HIPÓTESE E DIVISÃO DE ESTUDO

Os efeitos do uso nocivo do etanol sobre diferentes tecidos corporais têm sido frequentemente demonstrados na literatura. No entanto, muito pouco se sabe sobre os efeitos da exposição materna ao etanol sobre os diferentes tecidos e células da prole durante o desenvolvimento. Neste contexto, este estudo pretende demonstrar os impactos do consumo de álcool pela mãe durante a prenhez e aleitamento sobre a prole. Hipotetiza-se que o etanol ingerido pela mãe induz estresse oxidativo e dano celular repercutindo em alterações histomorfológicas em células do sistema digestório e reprodutivo da prole.

Os efeitos do consumo materno de etanol durante os períodos de prenhez e aleitamento sobre a prole foi investigado utilizando-se um modelo experimental de exposição ao álcool em ratas Wistar. Para tal, ratas prenhas foram expostas a este toxicante na água de beber até os filhotes completarem 21 dias de vida pós-natal (momento do desmame). No dia do experimento, os filhotes de 21 dias de idade foram eutanasiados, o sangue foi coletado e os seguintes tecidos foram dissecados: duodeno, fígado, baço, rins, encéfalo e testículos. Inicialmente, no intuito de caracterizar o modelo experimental de exposição ao etanol foram determinados a ingesta hídrica, o consumo de ração, o ganho de massa corporal e alguns parâmetros zoométricos.

Os resultados desta tese estão divididos em 4 (quatro) partes, a saber:

- Parte I: Caracterização do modelo experimental de exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação.

- Parte II: Estudo dos efeitos da exposição materna ao etanol sobre parâmetros oxidativos, metabólicos e histomorfológicos no sangue periférico, fígado e intestino da prole aos 21 dias de idade pós-natal (desmame).

- Parte III: Efeitos da exposição materna ao etanol sobre os testículos de ratos imaturos. Para tanto, foram utilizadas abordagens experimentais para determinação de parâmetros oxidativos, modulação da atividade enzimática, bem como influxo de íons e metabólitos na membrana plasmática, vias de sinalização celular e análises morfológicas.

- Parte IV: Toxicidade *in vitro* do etanol sobre células de Sertoli. Os resultados apresentados neste capítulo foram realizados durante o doutorado sanduíche no Instituto Abel Salazar, na Universidade do Porto (Portugal), sob supervisão do Prof Carlos Pedro Fontes Oliveira.

Cada estudo apresentado (I, II, III e IV) contém a descrição dos resultados, bem como discussão e conclusões parciais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.MATERIAIS

O etanol absoluto foi obtido da Synth (Diadema, SP, Brasil). As substâncias radiotivas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (atividade específica 321 KBq/mg Ca^{2+}) e [^{14}C]-2-deoxi-D-glicose (^{14}C -DG), (atividade específica 9,25 GBq/mmol) e [^{14}C]-glutamato (atividade específica 1,85 MBq) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2.ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas gestantes, provenientes do Biotério Central da UFSC, as quais foram mantidas em gaiolas com controle do ciclo claro/escuro 12/12 h a 21 °C, com água e ração *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do CONCEA, em protocolo aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UFSC (CONCEA/UFSC#PP00854).

5.3.TRATAMENTO COM ETANOL

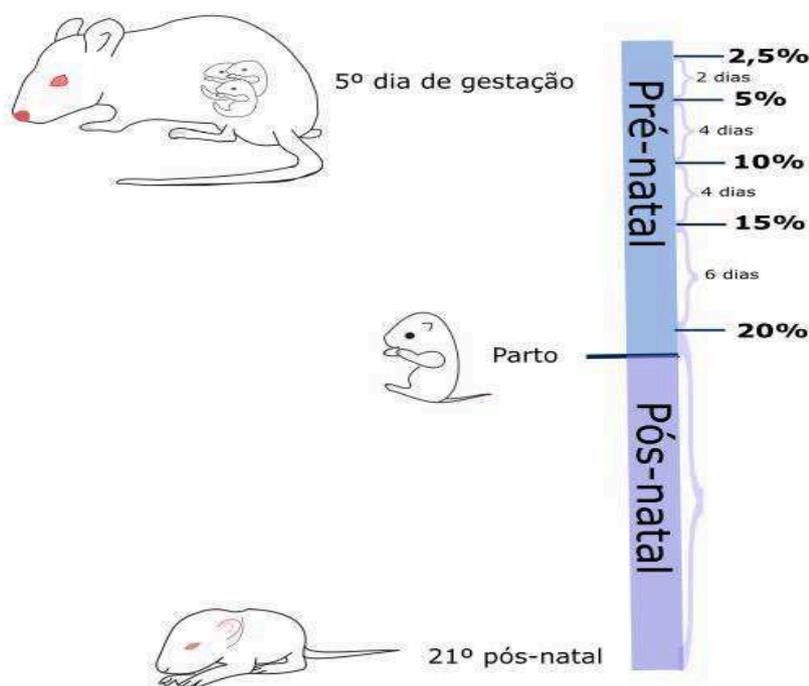
Ratas da linhagem Wistar fêmeas prenhas (5º dia de prenhez) foram randomizados em dois grupos: controle e tratado. O grupo controle recebeu água e ração *ad libitum* durante todo o período do experimento. Já o grupo tratado recebeu etanol P.A. diluído na água de beber e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Durante a prenhez e lactação as ratas permaneceram em caixas separadas individualmente e receberam ração *ad libitum* e etanol no grupo tratado, ou água no grupo controle, como única fonte de líquido. O dia do parto foi designado como dia 1 da lactação, e o dia 21, o dia final da lactação. Durante o período de aleitamento, os filhotes tiveram livre acesso ao leite materno.

O etanol foi administrado na água de beber, conforme método descrito por Cesconetto e colaboradores (2016). A partir do 5º dia de prenhez o etanol foi introduzido durante a prenhez

e a aleitamento; o tratamento iniciou com a dose de 2,5% de etanol diluído em água (v/v) e ao longo dos dias a concentração do etanol foi aumentando até atingir 20%. Resumidamente, no 5º dia de prenhez, as ratas foram expostas a 2,5% de etanol (v/v) na água de beber, *ad libitum*, durante dois dias, e nos dias subsequentes a concentração de etanol foi sendo aumentada da seguinte forma: 5% de etanol durante os quatro dias subsequentes, 10% durante quatro dias, 15% de etanol durante seis dias e posteriormente as ratas passaram a receber 20% de etanol até os filhotes completarem 21 dias de idade pós-natal, caracterizando um modelo de exposição materna subcrônica. A prole, portanto, foi exposta ao etanol durante todo o período de tratamento (via placentária e pelo leite materno).

Ao completarem 21 dias de idade os filhotes foram eutanasiados e alguns tecidos foram retirados para realização de análises bioquímicas e determinação de alguns parâmetros morfométricos (fígado, sangue, intestino, encéfalo, testículos, baço, rins). As análises bioquímicas e histomorfológicas apresentadas nesta tese foram realizadas em amostras de intestino, fígado, testículos e sangue periférico da prole.

Figura 8 - Representação esquemática do tratamento com etanol.



Ratas prenhas no quinto dia de gestação foram expostas a concentrações crescentes de etanol. A exposição se iniciou com 2,5% de etanol diluído em água durante dois dias, 5% de etanol diluído em água durante quatro dias, 10% de etanol diluído em água durante quatro dias, 15% de etanol diluído em água durante seis dias, e 20% de etanol diluído em água até o filhotes completarem 21 dias de idade.

Fonte: do autor

5.4.MEDIDAS ZOOMÉTRICAS E PESO DOS TECIDOS

O ganho de massa corporal dos filhotes foi monitorado diariamente após o sétimo dia de vida, realizado em balança analítica. Além disso, foram monitoradas as seguintes medidas zoométricas: comprimento naso-anal, perímetro cefálico e distância entre os olhos. Todas as medidas foram realizadas com uma régua com precisão de 0,1 cm. A partir dessas medidas, calculou-se o índice de massa corpórea, dado pela divisão do peso corporal pelo comprimento dos filhotes, no intuito de verificar o estado nutricional da prole.

O peso dos tecidos foram realizados após eutanásia dos animais. O fígado, testículos, baço e rins foram retirados e pesados em balança analítica de precisão. A partir disso, calculou-se o peso dos tecidos, dado pela divisão do peso corporal.

Todas as análises foram realizadas em filhotes de 21 dias de idade oriundos de ninhadas diferentes (diferentes mães).

5.5.COLETA DE SANGUE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO E PLASMA

Após eutanásia por decapitação, o sangue periférico dos filhotes foi coletado. Para obtenção do soro, após a coleta de sangue em microtubos plásticos sem anticoagulante, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 1000 X g e o soro separado imediatamente. Para obtenção de amostras de plasma, o sangue foi coletado em microtubos heparinizados e posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min à 1000 X g e o plasma separado imediatamente.

5.6.ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Para realização das análises hematológicas, o sangue foi coletado em microtubos de 500 µL heparinizados. No eritrograma foi realizada a contagem de plaquetas e de hemácias, a determinação do hematócrito, a concentração de hemoglobina, o MCV - volume corpuscular médio e a MCH - hemoglobina corpuscular média. No leucograma foram determinadas a contagem de leucócitos, bem como a contagem diferencial. As amostras de sangue foram analisadas de acordo com as instruções para utilização do equipamento “Hematology Analyzer BC-2800 Vet” (Mindra Bio-Medical. Eletronics Co. Ltd, Shenzhen, China). As extensões celulares das amostras de sangue foram coradas e analisadas por microscópio de luz.

5.7. CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS NO PLASMA

Os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase lipoproteica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerol-cinase formando glicerol-fosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio por ação do glicerol-3-fosfato oxidase. O peróxido de hidrogênio, por ação da peroxidase, reage com a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina de cor vermelha. A absorvância do complexo, medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos. Método realizado por “kit” comercial (Analisa), seguindo as instruções do fabricante.

5.8. CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL NO PLASMA

Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (CHE) formando colesterol livre que, após oxidação pelo colesterol oxidase (CHOD), forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, em reação oxidativa catalisada pela peroxidase, produz uma quinoneimina de cor vermelha. A absorvância do complexo formado, medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra. Método realizado por “kit” comercial (Analisa), seguindo as instruções do fabricante.

5.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRANSFERRINA SÉRICA

A concentração de transferrina foi avaliada em soro da prole a partir de método imunoturbidimétrico. A metodologia fundamenta-se na adição de anticorpos específicos anti-transferrina na amostra, esses se ligam a transferrina presente no soro e formam um complexo insolúvel, o qual fornece uma turbidez cuja intensidade é detectada em 340 nm, sendo proporcional à quantidade de transferrina na amostra de soro. Método realizado por “kit” comercial (Analisa), seguindo as instruções do fabricante.

5.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SORO E FÍGADO

A concentração de ferro foi determinada em soro e em fígado da prole. Para isso, a massa do tecido hepático foi determinada e o tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 200 mM,

pH 7,4 (1:10 m/v). Para a realização da técnica, 50 µL de soro ou homogeneizado tecidual foram adicionados em 200 µL de tampão contendo hidroxilamina, pH 4,0. Logo, foram acrescentados 5 µL de ferrozina, com subsequente incubação em banho-maria a 37°C por 10 min. Desse modo, os íons férricos foram dissociados da proteína pela ação do tampão ácido e reduzidos a íons ferroso pela hidroxilamina. Após a adição de ferrozina houve a formação de um complexo cuja absorbância mensurada em 560 nm é proporcional à quantidade de ferro na amostra. Os valores foram expressos em µg/dL (soro) ou µg/g de tecido (GOODWIN; MURPHY; GUILLEMETTE, 1966).

5.11. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGUÍNEA

A concentração de glicose sanguínea foi realizada pelo método da glicose oxidase, utilizando-se um “kit” comercial (LabTest), e o protocolo seguiu as instruções do fabricante. O método baseia-se na reação da glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. Resumidamente, para determinar a concentração de glicose sanguínea, utilizou-se 10 µL de soro e adicionado 1 mL de reagente de cor (glicose oxidase) sobre o mesmo. Para finalizar o procedimento as amostras foram colocadas a 37 °C por 10 min. Posteriormente foi realizada a leitura a 500 nm.

5.12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE A INSULINA-I (IGF-1)

O fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-1) sérico foi analisado por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA). O método seguiu as instruções do fabricante.

5.13. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E TESTICULAR

Para determinação do glicogênio, os tecidos (fígado e testículos) foram removidos dos filhotes de 21 dias de idade controles e tratados. A massa do tecido foi determinada e digerido com KOH 33% (m/v) sob fervura a 100°C por 20 min. Após a fervura, foi adicionado etanol 96% e novamente, as amostras foram submetidas à fervura seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (KRISMAN, 1962).

5.14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES INTESTINAIS

O segmento do duodeno foi removido, lavado em solução de NaCl 0,9%, secado sobre papel filtro, pesado, cortado, homogeneizado com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno/mL salina). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado (4000 x g por 10 min) para remover núcleos e “debris” de células. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das dissacaridases na membrana dos enterócitos. Alíquotas de sobrenadante foram incubadas a 37 °C durante 5 min com 56 mM do dissacarídeo/substrato (maltose, sacarose ou lactose) em tampão maleato 0,1 M (pH 6,0). A atividade das dissacaridases intestinais maltase, lactase e sacarase foi determinada pela concentração de glicose produzida pela hidrólise do dissacarídeo correspondente, utilizando-se o método da glicose oxidase descrito anteriormente. A concentração de glicose foi determinada utilizando-se o “kit” comercial da Labtest e o método seguiu de acordo com as recomendações do fabricante. A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína (corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto) (Dahlqvist, 1984). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951). Amostras de intestino de filhotes de ratas controles e expostas ao etanol foram utilizadas em todos os experimentos. Todos os ensaios foram realizados utilizando-se o “N” amostral de 6 animais por grupo experimental (controles e expostos ao etanol) e as análises foram realizadas em duplicata para cada amostra e para cada uma das enzimas ensaiadas.

5.15. GLUTAMINA SINTETASE

Porções dos tecidos (fígado e testículos) foram homogeneizadas em 150 μ L de tampão de lise (Imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. 50 μ L deste sobrenadante foi adicionado em 100 μ L de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl₂ 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sodio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida por adição de 200 μ L de uma mistura contendo FeCl₃ 3,7 mM; Ácido tricloroacético 1,2 M; HCl 10 M e água. O produto da reação, γ -glutamilhidroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína. (SHAPIRO e STADTMAN, 1970; COSTA et al., 2012).

5.16. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE

Os tecidos retirados foram homogeneizados em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As atividades das enzimas ALT e AST foram determinadas através de reações colorimétricas. Na reação, a alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato reagem com a 2-4- dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína. Método realizado por “kit” comercial Dolles, seguindo as instruções do fabricante.

5.17. ATIVIDADE DA γ -GLUTAMIL TRANSFERASE - GGT

Porções do fígado, intestino e testículos de ratos imaturos expostos ou não ao etanol foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. A atividade enzimática da GGT foi realizada através da seguinte reação: o grupo glutamil, da γ -glutamil-p-nitroanilida (substrato) é transferido pela GGT para a glicilglicina (acceptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorbância que pode ser medida num comprimento de onda de 530 nm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados da atividade da GGT foram expressos como U/L/ μ g proteína. Método realizado por “kit” comercial Dolles, seguindo as instruções do fabricante.

5.18. LACTATO DESIDROGENASE - LDH

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

5.19. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR e GST, assim como dos marcadores de danos oxidativos (TBARS e proteína carbonilada - PC), os tecidos foram pesados e homogeneizado com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 m/v), e uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al., (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min).

5.20. SUPERÓXIDO DISMUTASE- SOD

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Em uma placa de 96 poços uma curva de amostras é feita (5, 10, 15, 20, 40 μ l) após foi adicionado glicina 50 mM, pH 10.2, foram adicionados 5 μ L de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2.0. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/g) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

5.21. CATALASE - CAT

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 μ L desta solução na placa de 96 poços, com acréscimo de 20 μ L da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 5 minutos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.22. CONTEÚDO DE GSH

Para determinar o conteúdo de GSH em fígado e testículos dos filhotes, porções de tecidos foram homogeneizadas com solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 (m/v). As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. O conteúdo de glutathiona foi determinado segundo o método descrito por Beutler *et al.* (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 μ L da amostra foi acrescentada na cubeta contendo 950 μ L de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 μ L de DTNB 2,5 mM. Após cerca de 2 min obtem-se a máxima

formação de TNB, que foi medido espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

5.23. LIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogeneizado através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, MDA (malondialdeído), produzindo uma base de Schiff de coloração Rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (BIRD; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação da amostra (100 μL) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 μL de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração do cromóforo Rosa foi detectada 535 nm. Os valores obtidos foram expressos em nmol MDA.g^{-1} .

5.24. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E DE NITROGÊNIO (ERNS).

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), enquanto para formação de ERNs foi utilizada dihidrorodamina (DHR), permeáveis as células. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente 2',7' diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF), que é retido nas células. O H_2DCF é transformado no 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente. Na presença de ERNs e peroxidases celulares, DHR 123 é convertido no fluoroforo Rhodamina - 123 (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Fatias de tecido foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, com posterior centrifugação (960 xg por 10 min a 4°C). Em placa preta de 96 poços, 10 μL de H_2DCFDA 1 mM ou ou DHR 123 1 mM (preparado em DMSO e protegido da luz) foram adicionados em 90 μL de sobrenadante, seguido de uma incubação no escuro a 37°C por 30 min. O produto foi detectado em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

5.25. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α e IL-6)

Para avaliar as concentrações de TNF- α e IL-6 em fatias de fígado foram utilizados *kits* comerciais disponíveis (BD Biosciences®), com anticorpos monoclonais específicos para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizados de acordo com o fabricante, e os valores realizadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). As concentrações de citocinas foram estimadas por interpolação a partir da curva padrão de cada citocina, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de TNF- α e IL-6 foram expressos em pg/mg de proteína.

5.26. ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da MPO em fatias de fígado e intestino foram determinadas através do método descrito por Rao e colaboradores (1993). O método se baseia na reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO) na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando oxigênio que oxida a o-dianisidina, formando uma substância de coloração Rosa, que foi mensurada. Portanto, 20 μ L do homogenato da amostra (HTAB) foi transferida para placas contendo 150 μ L de meio de reação (0,167 mg.mL⁻¹ de odianisidina 2HCl, 0,0005% de H_2O_2 , H_2O destilada e NaH_2PO_4 50 mM). Após 30 min de incubação em temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica 1%. A densidade óptica foi medida em 450 nm em placas de Elisa e comparadas com uma curva padrão de atividades conhecidas de MPO (0,7 a 140 mU.mL⁻¹).

5.27. CAPTAÇÃO DE [¹⁴C]-GLUTAMATO

Para o captação de glutamato, porções de testículos foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = $CaCl_2$ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, $MgSO_4$ 0,65 mM, Na_2HPO_4) para estabilização do tecido. Posteriormente o meio foi trocado e captação foi iniciada com a adição de 0,2 μ Ci [¹⁴C]-glutamato, com subsequente incubação por 10 minutos nesse “meio de captação”. A captação foi interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 200 μ l de HBSS gelado. Para solubilização do tecido adicionou-se 300 μ L de uma solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01%. Após a completa

solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio no meio de incubação, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para dosagem de proteína. Os resultados foram expressos como nmol [^{14}C] - glutamato/ μg proteína/min. (ZAMONER et al., 2007).

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

Para determinar o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ porções de testículos foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C , em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4 . Após, o meio foi trocado por HBSS fresco com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido incubado durante 5, 15, 30 ou 60 minutos. Posteriormente, o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM, pH 7) interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 10 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e $300 \mu\text{L}$ de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra e determinada a concentração de proteínas em cada amostra. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína (ZAMONER et al., 2007).

5.29. INFLUXO DE [^{14}C]-2-DESOXI-D-GLICOSE

Porções de testículos foram pré-incubadas em solução salina balanceada de Hanks, durante 15 min para estabilização. O tecido foi incubado por 30 ou 60 min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose $0,2 \mu\text{Ci/mL}$. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado e o tecido lavado por 3 vezes com HBSS fresco, e lisado em solução NaOH 0,5 M. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida e uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como pmol [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose /mL/mg proteína. (ZAMONER et al., 2007).

5.30. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

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

5.31. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para análise ultraestrutural do fígado e testículos dos filhotes expostos ou não ao etanol, após a eutanásia, porções do duodeno, fígado e testículo foram imersas em solução fixadora constituída de glutaraldeído (GTA) 2,5% e tampão cacodilato (Caco) de sódio 0,1M (pH 7,2) por 72 horas, seguidos de três lavagens com tampão Caco de sódio. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão Caco 0,1 M, pH 7,2, durante 2 horas a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens, de 10 minutos cada, em tampão Caco de sódio 0,1 M. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 15 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e polimerizado em estufa a 70°C por 24 horas. Foram realizadas secções ultrafinas em ultramicrótomo Leica acoplado à navalha de diamante, e contrastadas por 30 minutos com acetato de uranila 5% e posteriormente por 5 minutos com citrato de chumbo 1%, de acordo com Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em MET, marca Jeol, modelo JEM 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

5.32. MICROSCOPIA DE LUZ

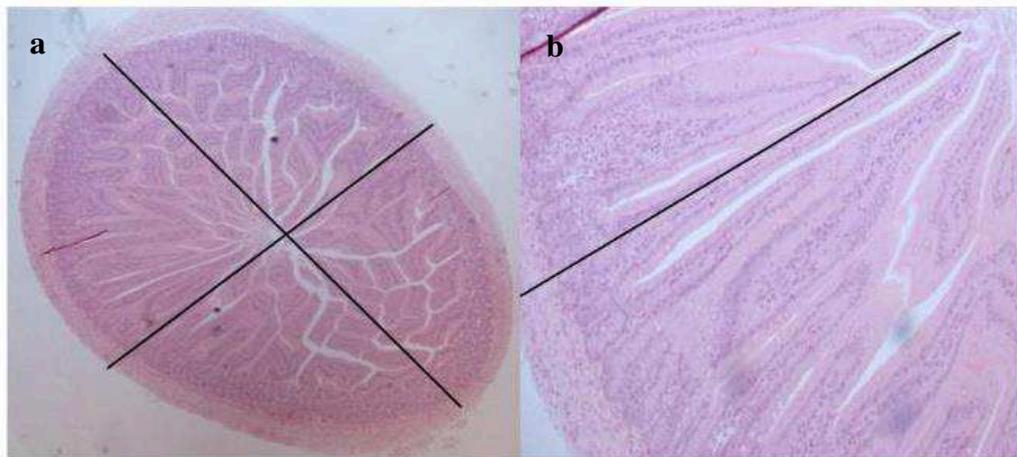
Para análise histomorfológica de duodeno, fígado e testículos de ratos expostos ou não ao etanol, porções desses tecidos foram imersas em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e ósmio por 24 horas. Posteriormente processados com uma sequência de lavagens de 15 minutos com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, e em seguida, desidratados em etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos cada. A pré-infiltração e a infiltração foram feitas com historesina glicol metacrilato, e finalmente emblocados na mesma resina com adição do endurecedor. Para

obtenção das lâminas, os blocos foram cortados em micrótomo, com 4 μm de espessura e dispostos 4 cortes por lâmina. Para coloração das amostras foram utilizadas as colorações de HE (Junqueira e Junqueira, 1983) e PAS (Lindén et al., 2008).

Foram realizadas capturas de imagens com equipamento digitalizador de imagens Axio Scan e analisadas com sistema Zeiss Blue, as lâminas coradas em HE na objetiva de 4X e 20X foram utilizadas para medidas morfológica (intestino), de 40X e 100X para contagem de células (testículo, fígado) em lâminas coradas com PAS na objetiva de 40x foram utilizadas para contagem de células caliciformes do intestino, em lâminas coradas com PAS na objetiva 40x para quantificação da intensidade de cor na identificação de glicogênio em cortes de fígado.

Para medida da luz intestinal do duodeno, foram realizadas medidas do diâmetro vertical e horizontal externo, com posterior obtenção da sua média aritmética, de cada corte (Figura 9a). As medidas das vilosidades do duodeno foram realizadas considerando todas as vilosidades íntegras de 3 regiões diferentes por corte, sendo a vilosidade correspondente a distância desde o ápice da vilosidade até o término da camada serosa, descontando o tamanho da cripta (Figura 9b).

Figura 9 - Imagem demonstrativa da realização das medidas de diâmetro (a) e altura da vilosidade (b) do duodeno.



Fotografias ilustrativas do (a) intestino delgado de ratos de 21 dias em objetiva de 4X com demonstração das medidas para aferição de diâmetro, (b) fotografia de fatia de duodeno de rato de 21 dias em objetiva de 20X para demonstração das medidas de altura da vilosidade.

Fonte: do autor

5.33. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5.34. METODOLOGIA APLICADA NO DOUTORADO SANDUÍCHE NA UNIVERSIDADE DO PORTO - PORTUGAL

5.34.1. Cultura de células de sertoli (SCS) – linhagem SERW3

As células de Sertoli de ratos imaturas da linhagem SERW3, células foram cultivadas em DMEM:F12 1:1, contendo 10% de soro de bovino fetal inativado e cultivadas a 33 °C (5% de CO₂ em ar) até o momento do experimento, realizado sete plaqueamentos. As células foram tratadas com diferentes concentrações de etanol (10, 50 e 200 mM), por 6 ou 24 horas.

5.34.2. Estudo da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico). O sal MTT, de coloração amarela, é reduzido a cristais de formazan, de coloração púrpura, na mitocôndria das células viáveis por ação de desidrogenases mitocondriais. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória e é diretamente proporcional ao número de células viáveis. (Terry et al., 2016, Mosmann, 1983). Para o ensaio de citotoxicidade, as células SERW3 foram cultivadas em uma placa de cultura de 24 poços, deixadas a crescer por 48 horas. Posteriormente, as células foram expostas a 10, 50 ou 200 mM de etanol por 6 ou 24 horas. Após o período de exposição, as células foram lavadas em PBS e incubadas com 50 μ L de MTT (5 mg / mL, dissolvidos em PBS) por 2 horas a 37°C, protegido da luz. Em seguida, para a solubilização dos cristais de formazan, dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço e uma alíquota de 100 μ L de

cada amostra foi transferida para uma placa de cultura de 96 poços. A densidade óptica das amostras foi determinada a 570 nm e a leitura do DMSO foi utilizada como o branco.

5.34.3. Extração total de proteínas

Resumidamente, a extração de proteínas foi realizada usando tampão M-PER, suplementado com 100 mM de ortovanadato de sódio (AppliChem, Nürnberg, Alemanha) e 1% de “cocktail” de inibidores de protease (Bimake, Alemanha). As células foram homogeneizadas em temperatura ambiente durante 10 minutos e depois, centrifugadas a 14000 x *g* durante 20 minutos. A concentração de proteína foi determinada usando “Kit” de Ensaio de Proteína Pierce BCA (Termo Fisher scietific), no qual diferentes concentrações de BCA foram usadas como padrões para calibração. A absorbância foi determinada a 595 nm.

5.34.4. Western Blot

Após determinação da concentração de proteínas nas amostras de SCs tratados ou não com etanol pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad Laboratories), foi realizada corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% e transferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (GE Healthcare). As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos: antimonocarboxilate-transportador 4 (MCT4) (1:1000, SC-50329, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemanha), ou anti-lactato desidrogenase (LDH) (1:10000, ab52488, Abcam, Cambridge, Reino Unido), e Total OXPHOS WB Antibody Cocktail (1:1000, MitoSciences, MS604). O anticorpo monoclonal anti- α -tubulina (1:5000, T9026) foi utilizado para controle de carga de proteína em todas as análises de Western blot. Anti-IgG de coelho IgG-AP (1:5000, NIF1317; GE Healthcare) ou de anti-IgG de rato IgGpIgM-AP (1:5000, NIF1316, GE Healthcare) foram utilizados como anticorpos secundários. As membranas foram reveladas com substrato ECF (GE Healthcare) durante 5 minutos e digitalizadas com Molecular Imager FX Pro mais MultiImager (Bio-Rad Laboratories). A densidades de cada banda foi obtida através do Software BIO-PROFIL Bio-1D da Quantity One (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France), utilizando metodologia padrão. Os valores obtidos foram normalizados com a respectiva densidade de banda correspondente a proteína total.

5.34.5. Ensaio enzimático de lactato desidrogenase (LDH)

Foi espectrofotometricamente utilizando um Kit de ensaio enzimático de LDH (Thermo Scientific, Waltham, MA) de acordo com as instruções do fabricante. A LDH é uma enzima citoplasmática que é liberada no espaço extracelular quando a membrana está danificada e, portanto, é considerada como um indicador de toxicidade celular (BURD e Usategui-Gomez, 1973). Para analisar o efeito do etanol na membrana plasmática, o ensaio de LDH foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O kit mede a LDH extracelular através de uma reação enzimática que produz o formazan vermelho, que é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio. Resumidamente, 50 µl de meio celular foram transferidos para uma placa de 96 poços e adicionados 50 µL de mistura de reagentes de LDH. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e a atividade de LDH analisada por absorvância espectrofotométrica a 490 nm.

5.34.6. Ensaio Sulforrodamina B – SRB

A SRB é um corante de aminoxantina rosa com dois grupos sulfônicos que se ligam aos resíduos básicos de aminoácidos em condições ácidas, e se dissociam sob condições básicas. Como a ligação de SRB é estequiométrica, a quantidade de corante extraído de células é diretamente proporcional à massa das células. Após o tratamento com ou sem álcool as células foram fixadas em solução (1% ácido acético + 99% Metanol) a -20°C. Após retirar a solução de fixação e secar a placa é adicionado 500 uL de solução 0.05% SRB em 1% ácido acético em água, a cada poço por 1h a 37° C; depois do tempo de incubação os poços com as células foram lavados com 1% ácido acético em água; com a placa completamente seca, adicionar 250 uL de Tris 10mM pH=10 a cada poço, e agitar 10 minutos. A leitura foi realizada em 545 nm.

5.34.7. JC1- tetraetil benzimidazole-carbocyanine

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial em células expostas ao etanol, foi realizado o ensaio JC-1. O teste denominado JC1 tem como objetivo medir o potencial da membrana mitocondrial. As células foram cultivadas em uma placa de cultura de 96 poços, deixadas a crescer 48 horas e tratado. Após 6 e 24 horas de tratamento, as células foram lavadas em PBS e incubadas por 30 minutos a 37°C com 2 µM de JC-1. Em seguida, a solução foi

descartada e meio de cultura sem FBS foi adicionado. A acumulação de JC1 nas mitocôndrias é relativa ao potencial da membrana mitocondrial. O JC-1 forma agregados que emitem uma intensa fluorescência vermelha que é detectada em 550/590 nm (excitação/emissão), associado a um elevado potencial de membrana. No entanto, quando JC-1 permanece como um monômero exibindo fluorescência verde que é detectado a 485/535 nm (excitação/emissão), está associado a um potencial de membrana baixo e, portanto, de células não saudáveis. A fluorescência foi determinada nos comprimentos de onda mencionado. A razão de agregados/ monômeros foi calculada como um parâmetro da mitocôndria viabilidade.

5.34.8. Ressonância magnética nuclear de próton (RMN-1H)

Os espectros de RMN-1H foram analisados como descrito anteriormente (Alves et al., 2011). Fumarato de sódio (concentração final de 10 mM) foi utilizado como referência interna (6,50 ppm) para quantificar os seguintes metabólitos presentes em solução (multiplete, ppm): lactato (duplete, 1,33); alanina (duplete, 1,45), H1-a-glucose (duplete, 5,22) piruvato (simples, 2,35) e glutamina (tripleto, 2,13, 2,45, 3,77), representado abaixo. As áreas relativas de ressonâncias de RMN-1H foram quantificadas usando a rotina de ajuste de curvas fornecida com o sistema espectral NUTS pro TM NMR. Programa de análise (Acorn, NMR Inc., Fremont, CA, EUA).

O consumo ou produção de metabólitos por célula foi calculado medindo a variação acumulada do metabólito (versus tempo zero) após 24 horas e dividindo-o pelo número total de células em cada placa.

5.34.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Turkey, quando necessário, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A PREENHEZ E LACTAÇÃO

Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para compreender os efeitos do consumo de álcool durante a gestação. Em modelos animais, a ingestão de bebidas alcoólicas durante a prenhez pode levar a uma variedade de problemas no desenvolvimento, que incluem: déficits na formação do sistema nervoso central (SNC); deficiência no crescimento e comprometimento das habilidades cognitivas. O aparecimento dos sintomas pode variar e muitas vezes é dependente do período de desenvolvimento em que o etanol foi consumido e a quantidade ingerida (AUTTI-RAMO e GRANSTROM, 1991).

Modelos animais estão sendo usados por similaridade a condição humana, e já estão sendo identificados em um ou mais modelos animais de exposição pré-natal ao álcool algumas das principais características da Síndrome Alcoólica fetal (SAF) (espectro mais grave da desordem alcoólica fetal) como dimorfismo craniofacial, anormalidades do SNC, comprometimento no neurodesenvolvimento e deficiência do crescimento (GOODLETT e HORN, 2001). Assim, semelhante à variabilidade observada em humanos, não existe um único modelo animal que reproduz as características dos espectros do alcoolismo fetal (CUDD, 2005; HANNIGAN, 1996).

Com o intuito de investigar os efeitos do consumo materno de etanol no desenvolvimento da prole, inicialmente caracterizou-se o modelo experimental onde ratas Wistar prenhas foram expostas a concentrações crescentes de etanol até os filhotes completarem 21 dias de idade pós-natal. No dia do experimento, alguns parâmetros zoométricos relacionados às características do espectro de desordem alcoólica fetal, como massa corpórea, massa e volume de alguns órgãos foram determinados nos grupos controle e exposto ao etanol. A ingestão de água e nutrientes pelas ratas, bem como o desenvolvimento dos filhotes foram monitorados durante todo o tratamento com etanol. A eutanásia dos animais foi realizada quando os filhotes completaram 21 dias de idade pós-natal.

6.1.1. Objetivos específicos:

Desenvolver um modelo de exposição pré-natal e pós-natal ao etanol que:

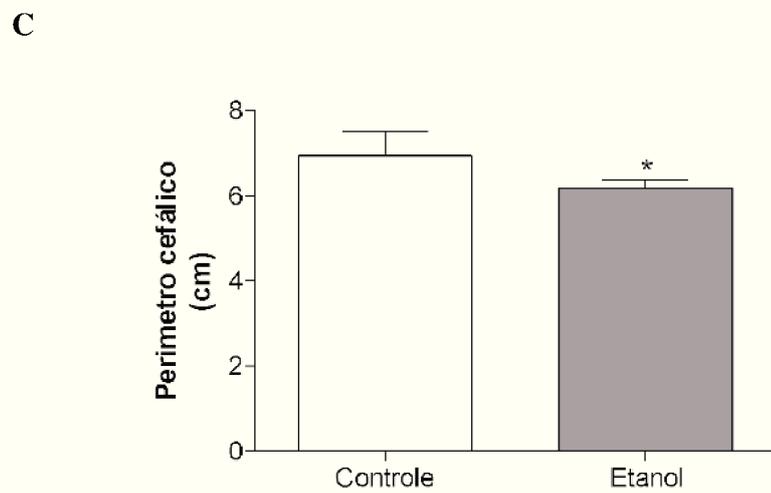
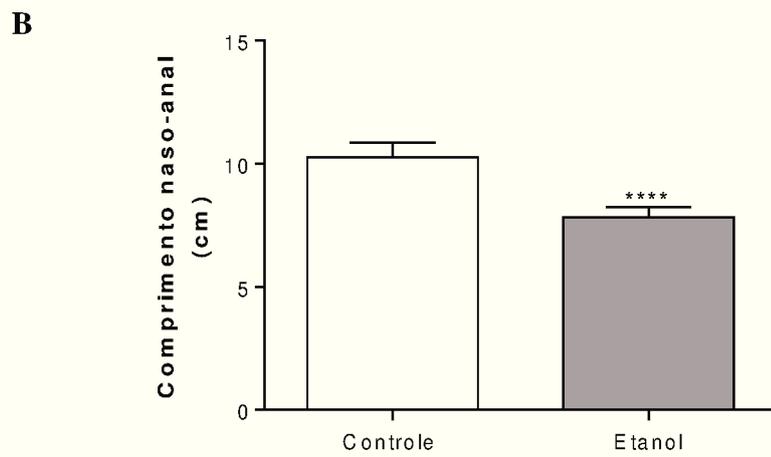
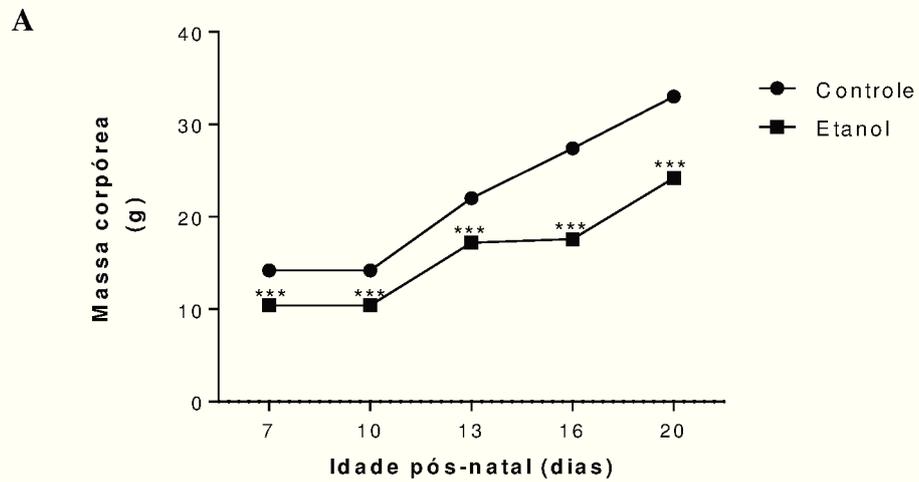
- Produzisse um consumo voluntário e estável de concentrações moderadas de etanol ao longo da prenhez;
- Não afetasse a saúde e bem-estar do animal;
- Não afetasse significativamente os cuidados maternos;
- Apresentasse características associadas a síndrome alcoólica fetal.

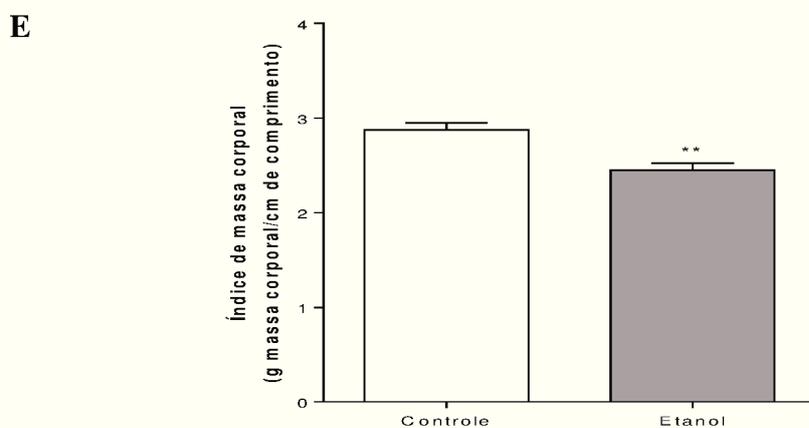
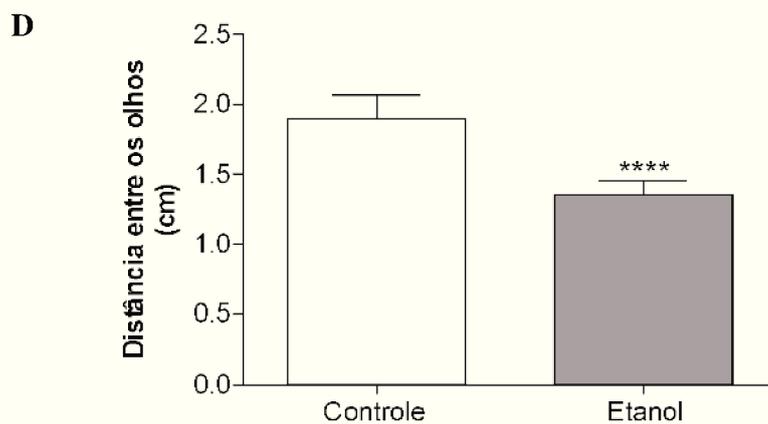
6.1.2. Impactos da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação parâmetros morfométricos da prole

O consumo materno de água e ração foi monitorado durante os períodos gestacional e lactacional das ratas controles e expostas ao etanol, no qual não mostrou diferenças significativas entre os grupos (CESCONETTO et al., 2016).

Os resultados mostraram que a exposição ao etanol diminuiu o ganho de massa corporal dos filhotes (Figura 10A), o comprimento do corpo (Figura 10B), a circunferência da cabeça (Figura 10C) e a distância entre os olhos (Figura 10D) dos filhotes de ratas tratadas com álcool durante a prenhez e aleitamento. Os dados demonstram que a exposição materna ao etanol induz a atraso no desenvolvimento dos filhotes. Adicionalmente, observou-se por meio da diminuição na razão massa corpórea/comprimento dos filhotes (Figura 10E), que os mesmos apresentavam-se desnutridos. A prole das ratas expostas ao etanol durante a prenhez e lactação apresentaram menor tamanho e baixa massa corporal quando comparada a prole de ratas controles, demonstrando comprometimento no crescimento e no estado nutricional.

Figura 10 – Impactos do etanol na massa corporal e parâmetros morfométricos dos filhotes de ratas expostas durante a prenhez e aleitamento.





Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.1.3. Efeitos no modelo de exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação em medidas de peso dos tecidos em ratos de 21 dias de idade.

Para avaliar os efeitos do álcool no tamanho e massa dos tecidos e órgãos dos animais expostos ao etanol durante a prenhez e lactação, ao completarem 21 dias de idade foram realizadas algumas medidas biométricas e comportamentais associadas ao desenvolvimento.

Os resultados mostraram que o período de abertura dos olhos foi retardado nos filhotes de ratas expostas ao etanol durante a prenhez e lactação. Além disso, a massa total do fígado, dos testículos, rins e baço da prole de ratas expostas ao etanol apresentou-se diminuída em relação ao grupo controle. Não foram encontradas alterações na massa, volume e dimensão

cerebral, assim como a normalização da massa do órgão com a massa corporal do animal (Tabela 1).

Tabela 1. Comparações de antropometria e medidas de composição corporal

	Controle	Etanol
Idade da abertura dos olhos	15 dias	19 dias
Massa encéfalo (g)	1,199 ± 0,03993	1,118 ± 0,03971
Volume do encéfalo (mL)	1,300 ± 0,08165	1,167 ± 0,1054
Dimensão cerebral (volume cerebral (mL) /comprimento do animal (cm))	0,1284 ± 0,009206	0,1488 ± 0,01256
Massa total do fígado (g)	0,8935 ± 0,01844	0,5646 ± 0,01921 ***
Relação do fígado (massa do tecido (mg) /peso total do animal (g))	0,03064 ± 0,0007308	0,02946 ± 0,0008214
Peso total do testículo	0,1315 ± 0,004149	0,07891 ± 0,004517***
Relação do testículo (massa do tecido (mg) /peso total do animal (g))	0,004419 ± 0,0001233	0,005247 ± 0,0001596***
Peso total do rim	0,3537 ± 0,006301	0,2432 ± 0,007709***
Relação do rim (massa do tecido (mg) /peso total do animal (g))	0,01212 ± 0,0001699	0,01270 ± 0,0003757
Peso total do baço	0,1169 ± 0,002774	0,07870 ± 0,006921***
Relação do baço (massa do tecido (mg) /peso total do animal (g))	0,004006 ± 9,380e-005	0,004091 ± 0,0003079

Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: *** p<0,001 comparado com o controle.

Fonte: do autor

Ao completarem 21 dias de idade os animais foram anestesiados para registro fotográfico do tamanho e estrutura corporal. A Figura 11 apresenta uma diferença visível entre o tamanho dos filhotes dos grupos controles e expostos ao etanol. Fica evidente o atraso no crescimento do grupo exposto em relação ao grupo controle.

Figura 11 - Ilustração dos filhotes expostos ou não ao etanol durante a gestação e aleitamento.



Fotografia representativa das diferenças encontradas no tamanhos dos animais com 21 dias de idade expostos ou não ao etanol durante a prenhez e lactação.

Fonte: do autor.

6.1.4. Discussão

Para melhor compreender os efeitos teratogênicos do etanol durante a prenhez e aleitamento em vários sistemas do organismo, dependerá da escolha do modelo a ser implementado. A idade dos ratos do nosso modelo de 21 dias, reverte-se ao seu desmame (SENGUPTA, 2013; BAKER et al., 2005), equivalente ao desmame em humanos que é de aproximadamente 6 meses (180 dias) (American Academy of Pediatrics, 2005). Como 21 dias de idade os animais são considerados sexualmente imaturos, a idade média que os ratos atingem a puberdade é de 50 dias após o nascimento e atingem a maturidade sexual em 38 dias pós-natal o que equivale a idade de 11,5 anos em humanos (SENGUPTA, 2013; LONG e EVANS, 1920)

A maioria dos estudos sobre os efeitos do etanol sobre o feto tem utilizado ratos e uma ampla variedade de concentrações de etanol, assim como o modo de administração e o tempo de exposição. Os métodos mais comuns adicionam etanol na dieta líquida de livre acesso ou não, intubação, administração parenteral ou por gavagem. Todos os protocolos descritos produzem um grau variável de estresse materno, que por sua vez, pode induzir a um viés nos efeitos do etanol, devido ao estresse materno (SLONE e REDEI, 2002; WARD e WAINWRIGHT, 1989). Alguns modelos experimentais utilizam soluções de etanol adoçadas com sacarina (CZACHOWSKI et al., 1999; ROBERTS et al., 1999; TOMIE et al., 2002) e uma

modificação da sacarose (SLAWECKI et al., 1997) na água de beber para estabelecer um consumo consistente e voluntário de álcool.

Bebidas alcoólicas consumidas durante o aleitamento pode levar a uma diminuição na produção de leite (MENNELLA, 2001). Concentrações de etanol foram encontradas no leite materno, equivalente a 2% da alcoolemia materna, o que pode causar efeitos adversos na criança, alterando a qualidade do sono, o desenvolvimento neuromotor e, conseqüentemente, o aprendizado (BURD et al., 2007; MENNELLA, 2001).

O modelo experimental proposto no presente estudo foi estabelecido a partir dos diversos estudos descritos na literatura. A definição das concentrações de etanol a serem adicionadas nas soluções está de acordo com o que é observado em humanos no consumo de bebidas alcoólicas, considerando-se que a concentração de 10% ou menos está correlacionada com variadas cervejas, 15% mimetiza bebidas fermentadas com alto teor alcoólico, e a de 20% podem ser encontradas em alguns tipos de vinhos e “caipirinhas” (SPANAGEL, 2000). O modelo experimental de administração de doses crescentes de etanol na água de beber das ratas prenhas (5º dia de prenhez) até o período do desmame (21 dias de idade pós-natal) não afeta a ingestão hídrica das ratas, sugerindo que o modelo proposto não induz desidratação nos animais (CESCONETTO et al., 2016). Além disso, o consumo diário de ração pelas ratas durante a prenhez e o aleitamento também não foi alterado pela exposição ao etanol. Portanto, o modelo experimental utilizado no presente estudo, padronizado no grupo de pesquisa, parece ser um modelo adequado para estudar os efeitos do consumo materno de etanol sobre a prole.

Outros modelos experimentais de exposição crescente de etanol têm sido descritos na literatura (ALLAN et al., 2003; CHOI et al., 2005). Os protocolos experimentais propostos por Allan e colaboradores (2003) e por Choi e colaboradores (2005) mostraram que iniciando o tratamento com etanol em períodos prévios a gestação, com uma dose baixa e crescente ao longo dos dias, auxilia no tratamento e os animais não apresentam rejeição ao etanol. Entretanto, estudos sugerem que o consumo de sacarose induz hiperfagia, obesidade e disfunção cardiovascular em ratas prenhas (AHMED et al., 2019). Além disso, solução de sacarose administrada para ratas prenhas afetou o metabolismo da prole aumentando a glicemia de jejum dos filhotes (KENDIG et al., 2015). No modelo experimental utilizado no presente estudo as ratas receberam apenas etanol na água de beber, no intuito de estudar o efeito do consumo dessa substância isoladamente durante a prenhez e lactação.

Dentre as vantagens do método proposto neste estudo, destaca-se que os animais estão livres para beber a quantidade que desejarem de etanol, o que reduz o estresse da manipulação

em comparação às técnicas mais invasivas, e é geralmente mais seguro (ou seja, resulta em menos mortes de animais). No entanto, esse método não permite o controle da dosagem precisa ou tempo de consumo do etanol. Segundo Weinberg e Bezio (1984), a autoadministração do etanol em roedores em uma dieta líquida tem provado ser um modelo muito eficaz para indução de SAF.

Os efeitos adversos encontrados nas exposições ao etanol durante a prenhez incluem: aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro, baixo peso ao nascer, anomalias de crescimento, retardo mental, perímetro cefálico menor e SAF (RUSSELL et al., 1998). Nosso modelo mostrou baixo peso e anomalias do crescimento, perímetro cefálico menor e dimorfismo ósseo (dados não mostrados) quando comparados ao grupo controle.

Murillo- Fuentes e colaboradores (2001) usaram um modelo de exposição pré-natal e pós-natal de 20% de álcool não encontraram efeito significativo do etanol sobre o peso ao nascer, mas o consumo de leite e o comportamento de sucção foram reduzidos em filhotes cuja mãe continuou a consumir 20% de etanol, Allan e colaboradores (2003) não encontraram diferença significativa no peso dos filhotes entre os grupos controle com 10% de etanol e sacarina.

Alguns estudos em animais e humanos demonstraram o retardo de crescimento intrauterino entre os filhos expostos ao álcool no pré-natal, com menor peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento (JACOBSON et al., 2004; GREENE et al., 1991). Estes déficits de crescimento pré-natal foram mostrados persistir durante a infância em vários casos de estudos em humanos (CARTER et al., 2007; JACOBSON et al., 2004; DAY et al., 2002). Outros estudos demonstraram atraso no crescimento fetal relacionado ao álcool em crianças que possuíam o espectro mais leve da síndrome alcoólica fetal (DAY et al., 2002; SAMPSON et al., 1994; COLES et al., 1991).

Considerando o que foi exposto, bem como dados prévios do grupo (CESCONETTO et al., 2016), o modelo experimental proposto neste estudo parece ser um modelo eficaz de indução de SAF em roedores, para estudos de exposição ao álcool durante a prenhez e aleitamento.

6.1.5. Conclusão Parcial

Com os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que o modelo de exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação é eficaz para estudos sobre as consequências do uso materno do etanol. O modelo mostrou ser de fácil implementação e manutenção no laboratório, prezando

o bem-estar, diminuindo o estresse causado pelo manuseio dos animais. O modelo não mostrou rejeição pelos animais, o que torna a forma adaptativa com o álcool eficaz, administrado em concentração crescente, começando com uma concentração baixa (2,5%, v:v) e aumentando gradativamente até atingir a concentração de 20% (v:v).

Assim, a utilização do modelo experimental descrito abre inúmeras perspectivas de trabalhos futuros.

6.2.PARTE II: ESTUDO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO ETANOL DURANTE A PREENHIZ E LACTAÇÃO SOBRE O FÍGADO, INTESTINO E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DA PROLE

Diversos estudos associam o consumo de etanol durante a gestação com anormalidades do SNC, transtornos neuropsiquiátricos e defeitos cardíacos congênitos (BURD et al., 2003; RILEY et al., 2004; BURD et al., 2007a; 2007b). Além de prejudicar o SNC, a exposição materna ao etanol pode afetar diversos órgãos e tecidos da prole. Estudos mostram que crianças que foram expostas a bebidas alcoólicas *in útero*, nasceram com hipoplasia renal (subdesenvolvimento do órgão) (GOETZMAN et al., 1975; DUNIGAN e WERLIN, 1981), agenesia (rim ausente), e hidronefrose (edema renal devido a drenagem anormal) (HANSON et al., 1978). Boggan e colaboradores (1979) notificaram taxas aumentadas de anomalias renais após exposição pré-natal ao etanol em ratos.

No fígado, alguns estudos mostraram hiperbilirrubinemia, causando a icterícia dos recém-nascidos (VAN DYKE et al., 1982; HOFER e BURD, 2008). Dunigan e Werlin (1981) mostraram no seu estudo níveis elevados das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) além do aumento no nível de bilirrubina em sangue de recém-nascidos. A toxicidade causada pela exposição ao etanol *in utero* pode ocasionar neuropatia entérica que se apresenta na infância como pseudo-obstrução intestinal crônica, condição em que os intestinos são incapazes de contrair para empurrar alimentos, fezes ou ar através do intestino, provocando dor abdominal e constipação (UC et al., 1997).

No presente estudo foram avaliadas as consequências da exposição materna ao etanol durante a prenhez e aleitamento sobre o fígado, intestino e alguns parâmetros sanguíneos na prole. Várias evidências mostram que o órgão mais afetado negativamente pela exposição pré-natal ao etanol é o encéfalo, mas há algumas anormalidades mostradas em outros sistemas como o coração, rim, fígado, trato gastrointestinal e sistemas endócrinos, que ainda são inconclusivos. A importância de identificar alterações em diversos órgãos será fundamental para fornecer o conhecimento essencial para a possível prevenção de danos causada pelo etanol na criança.

Neste trabalho, foi utilizado um modelo experimental de exposição materna ao etanol durante os períodos gestacional e lactacional, com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas induzidas no fígado, intestino e soro da prole aos 21 dias de idade. Foram determinados o conteúdo de GSH, de marcadores de dano oxidativo TBARS e DCF, assim como a atividade das enzimas GS, GGT, AST, ALT, LDH e de algumas enzimas antioxidantes no intestino e

fígado da prole. Além disso, a atividade das dissacaridasas sacarase, maltase e lactase foram determinadas no duodeno e alguns parâmetros hematológicos foram determinados em amostra de sangue de filhotes de ratas controles e expostas ao etanol durante a prenhez e o aleitamento.

6.2.1. Objetivos específicos

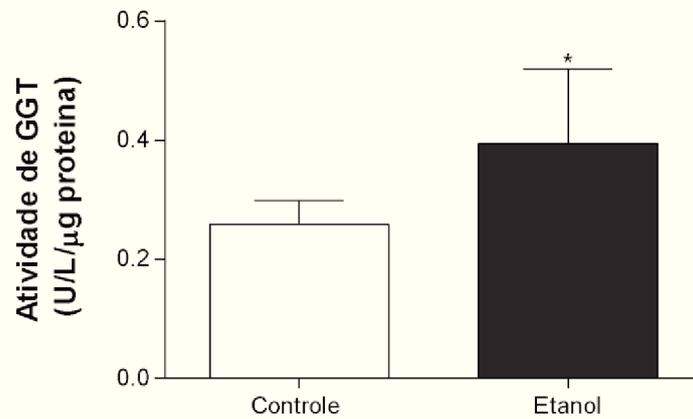
Estudar o efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e aleitamento na prole sobre:

- A atividade da GS, aminotransferases, estresse oxidativo e o conteúdo de glicogênio hepático;
- A atividade das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes, SOD, CAT, GGT e GSH em células hepáticas de ratos de 21 dias de idade;
- Possíveis mudanças histológicas no tecido hepático e intestinal dos ratos;
- As concentrações de ferro e transferrina bem como nas concentrações de colesterol, glicose e triglicérides plasmáticos em ratos imaturos;
- A digestão de carboidratos através da determinação da atividade da GGT e das dissacaridasas em intestino de ratos imaturos;

6.2.2. Determinação da atividade das aminotransferases e da γ -glutamil transferase induzida por exposição materna ao etanol.

A atividade das aminotransferases ALT e AST e da GGT foi determinada com o intuito de verificar possível lesão no fígado dos filhotes após exposição materna ao etanol. Estes são marcadores de disfunção hepática aguda, e alterações nos níveis de GGT podem indicar toxicidade alcoólica (aguda e crônica). Os resultados mostraram aumento na atividade da GGT (figura 12) sem alterar a atividade da ALT e AST em fígado de filhotes expostos ao etanol na prenhez e lactação (figura 13).

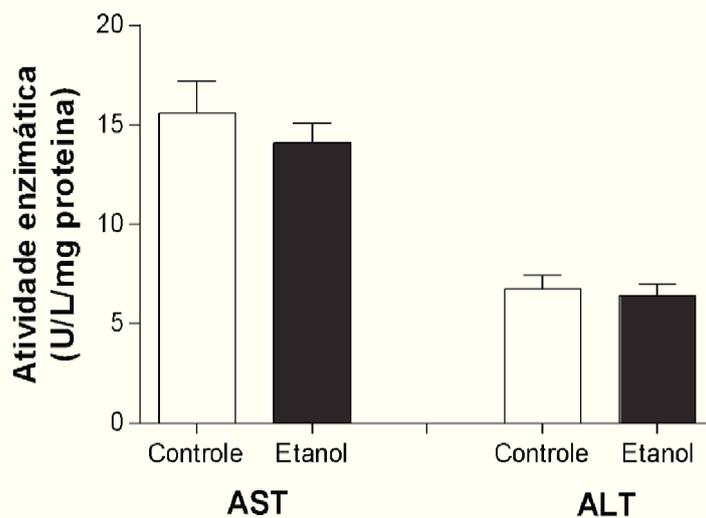
Figura 12 - Efeito do etanol sobre a atividade de γ -glutamil transferase (GGT) no fígado de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na gestação e lactação.



A atividade da GGT foi avaliada através da reação onde o substrato gamaglutamil-p-nitroanilida é transferido pela GGT para a molécula aceptora glicilglicina, com liberação de p-nitroanilina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 13 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT no fígado de ratos de 21 dias de idade.



A atividade das aminotransferases foi mensurada no homogeneizado do fígado dos animais controle e tratados com 21 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

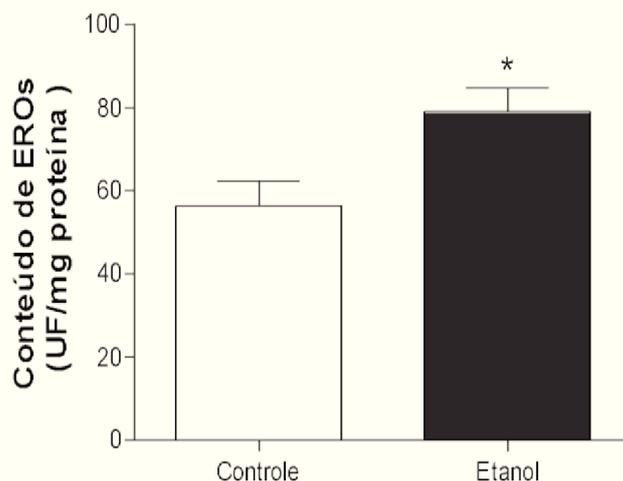
6.2.3. Efeitos da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação na produção de espécies reativas de oxigênio e marcador de dano lipídico em fígado de ratos de 21 dias de idade.

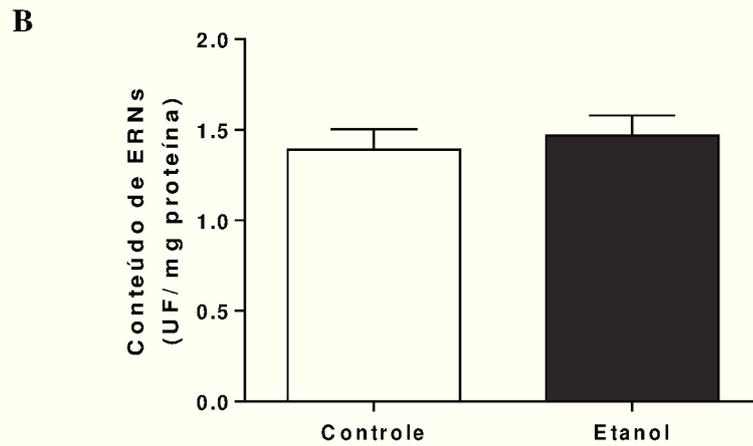
No intuito de estudar se a exposição ao etanol induz a geração de EROs e ERNs no fígado de ratos imaturos, foram utilizadas sondas que na presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tornam-se fluorescentes. Conforme demonstrado na Figura 14A e 14B, houve um aumento significativo no conteúdo de EROs sem alterar o conteúdo de ERNs no fígado do grupo tratado com etanol, quando comparado com o controle.

Com o objetivo de investigar os efeitos do etanol no fígado de filhotes expostos a concentrações elevadas de etanol na prenhez e lactação sobre o estresse oxidativo, foram avaliados vários parâmetros bioquímicos tais como as defesas antioxidantes enzimáticas, não enzimáticas e a concentração de peroxidação lipídica (TBARS). Os resultados mostraram que a exposição ao etanol aumenta as concentrações de TBARS no fígado de ratos expostos ao etanol (Figura 15).

Figura 14 - Efeitos da exposição materna ao etanol na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (A) e de nitrogênio (ERNs) (B) no fígado de ratos imaturos.

A

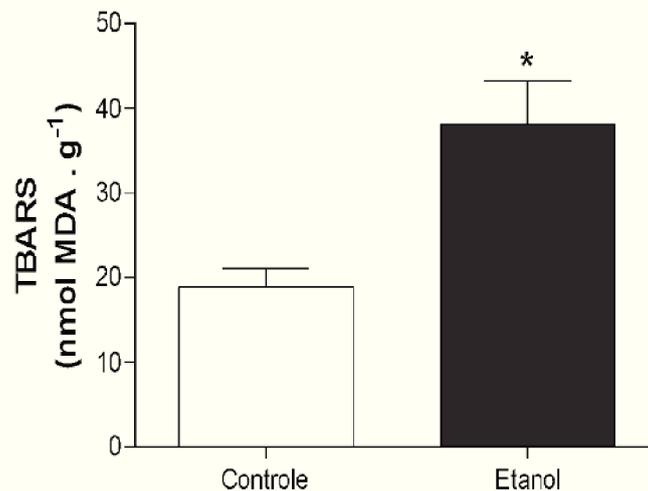




A formação de EROs e ERNs foram determinada pela oxidação do H_2DCF a DCF e DHR123 convertido em rodamina 123, respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 15 - Efeito do etanol na peroxidação lipídica em fígado de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez e lactação.



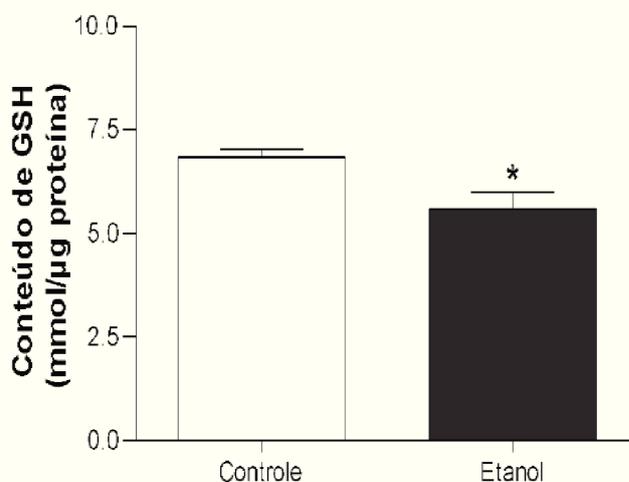
Fatias de fígado de animais controles e tratados foram homogeneizadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) durante 60 min. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.4. Efeitos da exposição ao etanol no sistema de defesa antioxidante em fígado de ratos de 21 dias de idade.

Para investigar o efeito da exposição materna ao etanol nos marcadores bioquímicos relacionados aos sistemas de defesa antioxidantes hepático de ratos imaturos, foram analisadas as concentrações de GSH, bem como a atividade da SOD e da CAT. A GSH é o principal antioxidante não enzimático do organismo e apresenta diversas funções de proteção contra os danos oxidativos. A Figura 16 mostra diminuição no conteúdo de GSH em fígado de ratos expostos ao etanol durante os períodos gestacional e pós-natal. A Figura 17A e 17B demonstram o aumento significativo na atividade enzimática da SOD e da CAT, respectivamente. Esses resultados confirmam a participação de eventos oxidativos no mecanismo de toxicidade do etanol.

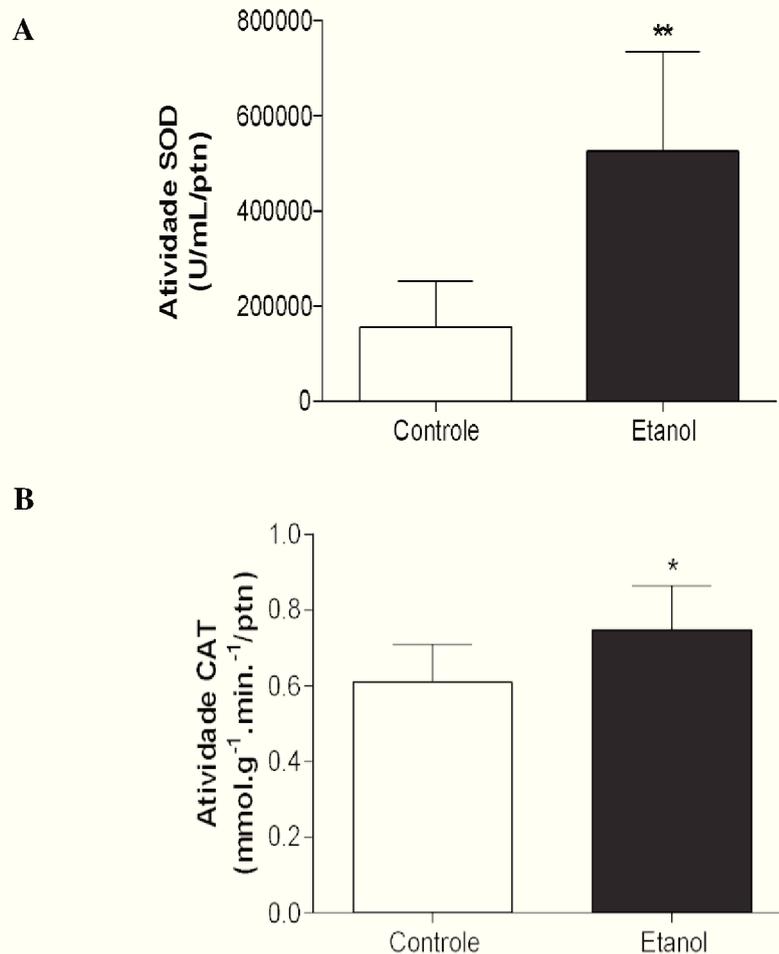
Figura 16 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação no conteúdo de GSH em fígado da prole aos 21 dias de idade.



As amostras de fígado foram homogeneizadas e transferidas para uma cubeta (50 μ L) seguida da adição de 100 μ L uma solução contendo DTNB (2,5 M), após 2 min ocorreu a formação do TNB. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 17 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação na atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B) em fígado da prole aos 21 dias de idade.



A atividade das enzimas antioxidantes foi mensurada no homogeneizado do fígado dos animais controle e tratado com 21 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

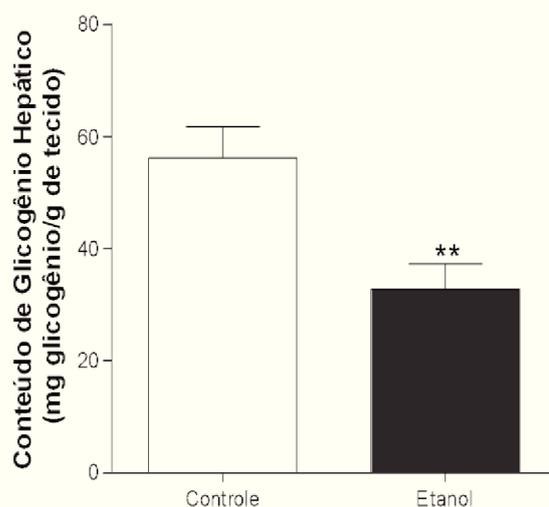
Fonte: do autor

6.2.5. Efeito da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação no conteúdo total de glicogênio hepático em filhotes de 21 dias de idade.

O conteúdo de glicogênio hepático foi avaliado no intuito de verificar os efeitos da exposição materna ao etanol no metabolismo hepático. A figura 18 mostra que a exposição ao etanol durante a prenhez e lactação provoca diminuição significativa no conteúdo de glicogênio hepático da prole. Esses dados sugerem fortemente que a exposição ao etanol pode alterar o metabolismo e a função do fígado. A Figura 28 demonstra que a exposição materna ao etanol

também aumenta a glicemia da prole, confirmando que a toxicidade dessa substância para a prole, que acarreta em alterações sistêmicas importantes.

Figura 18 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e lactação no conteúdo total de glicogênio hepático.



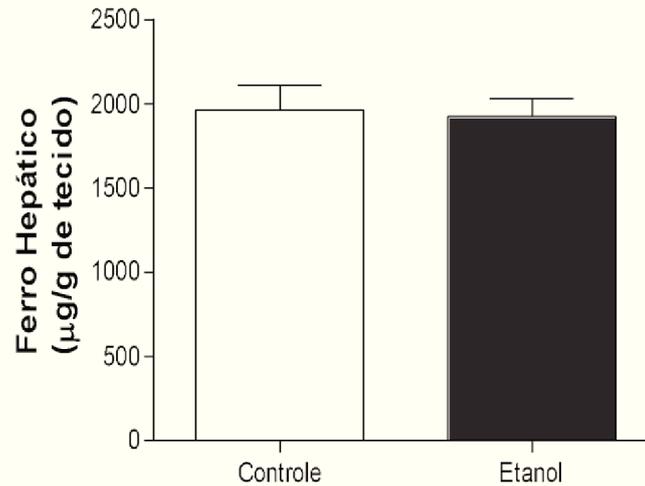
Conteúdo total de glicogênio hepático em animais com 21 dias de idade expostos ao etanol ou não durante a prenhez e lactação. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor.

6.2.6. Efeito da exposição ao etanol durante a prenhez e lactação na concentração de ferro hepático em filhotes de 21 dias de idade.

O fígado desempenha um papel fundamental no armazenamento e transporte do íon ferro. Aumento nas concentrações desse íon no fígado estão associadas a situações patológicas. Com a finalidade de investigar possíveis alterações nas concentrações de ferro tecidual em filhotes expostos ao etanol durante os períodos gestacional e pós-natal, avaliou-se a concentração de ferro armazenada no fígado. Os resultados demonstraram que a exposição materna ao etanol não altera a concentração de ferro hepático (Figura 19).

Figura 19 - Efeitos da exposição materna pré e pós-gestacional ao etanol na concentração de ferro hepático em ratos imaturos.



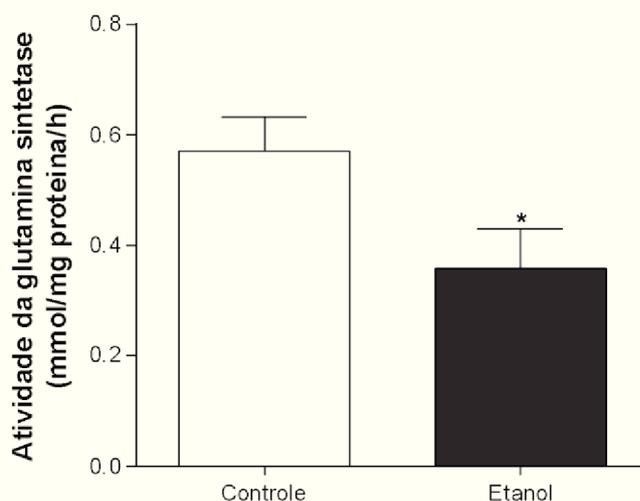
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student.

Fonte: do autor

6.2.7. Efeito do etanol sobre o sistema glutamatérgico no fígado de ratos expostos durante a prenhez e lactação.

No intuito de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos induzidos pelo etanol sobre o fígado de ratos imaturos foi analisada a atividade da glutamina sintetase (GS), enzima envolvida na amidação de glutamato a glutamina. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol foi capaz de diminuir a atividade da GS podendo levar a um comprometimento na metabolização do glutamato do fígado (Figura 20).

Figura 20- Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade da GS no fígado da prole de 21 dias de idade.



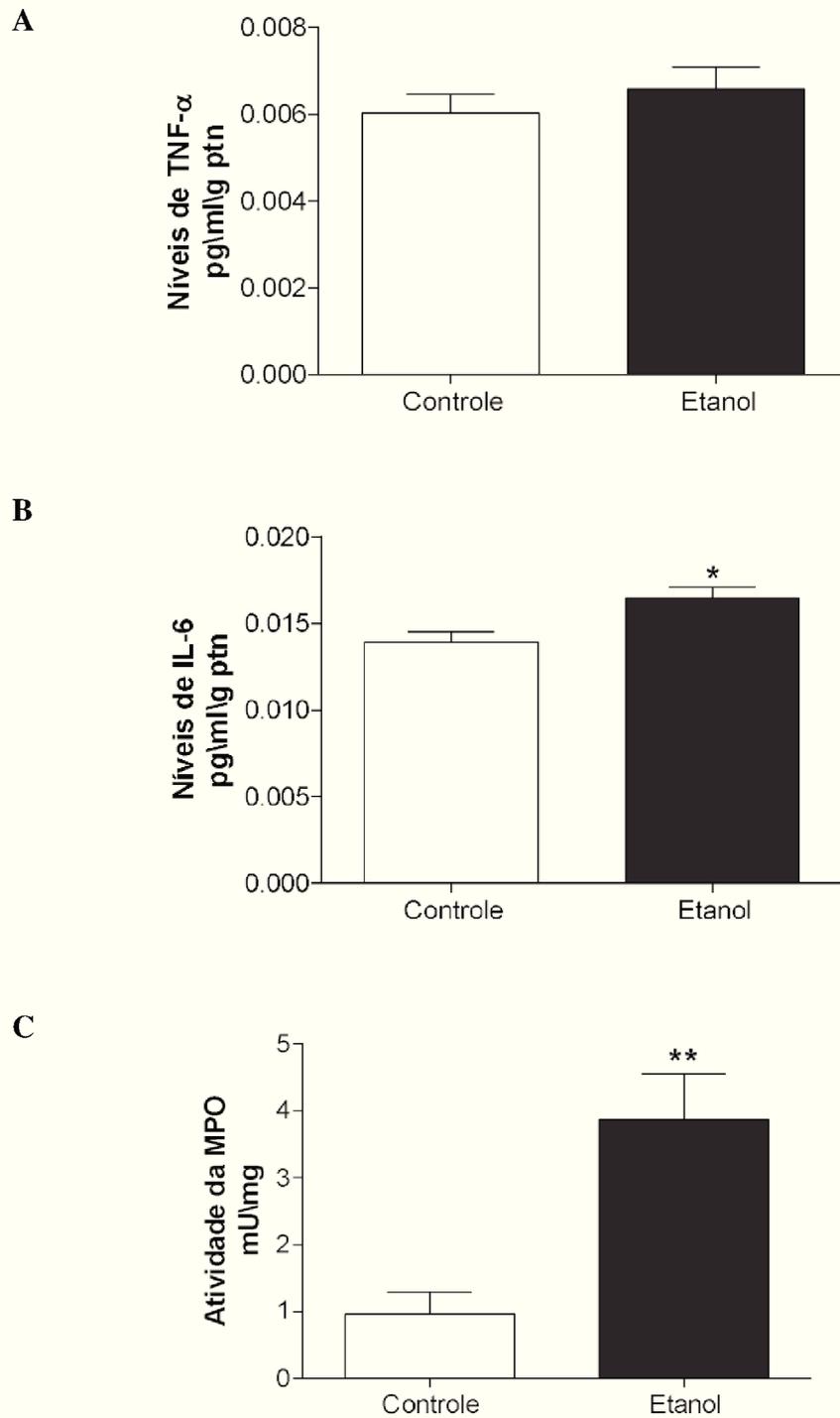
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.8. Efeitos da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação sobre parâmetros inflamatórios.

Para compreender os efeitos da exposição materna ao etanol sobre parâmetros inflamatórios, foram determinados o conteúdo de TNF- α e IL-6, bem como a atividade da MPO como marcadores inflamatórios em homogeneizado de fígado. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol não foi capaz de alterar o conteúdo de TNF- α , mas foi observado um aumento significativo no conteúdo de IL-6 e na atividade da MPO (Figura 21 A, B, C respectivamente) quando comparados ao grupo controle.

Figura 21- Efeito da exposição materna ao etanol sobre os níveis de TNF- α e IL-6 e atividade da MPO no fígado de ratos imaturos.



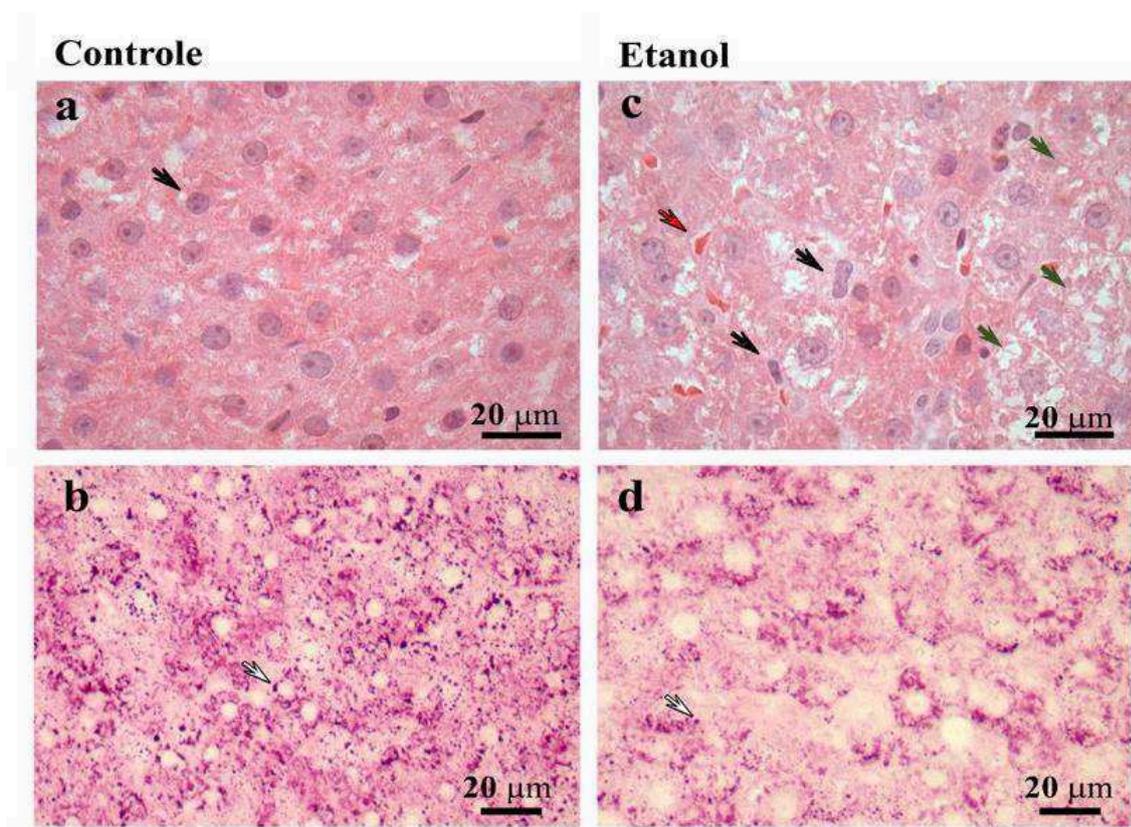
O imunocnteúdo de TNF- α (A) e IL-6 (B) foi determinado pela técnica de ELISA e a atividade da MPO (C) foi mensurada por método colorimétrico no fígado de ratos imaturos, conforme especificado na metodologia. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.9. Avaliação da morfologia hepática da prole exposta ao etanol durante a prenhez e lactação

Com o propósito de avaliar o efeito do etanol sobre a morfologia do fígado de ratos imaturos após exposição durante a prenhez e lactação, cortes histológicos de fígado de ratos de 21 dias de idade foram corados com hematoxilina-eosina (Figura 22 a-c). Os resultados mostraram que a histomorfologia do fígado da prole é modificada pela exposição materna ao etanol. Pode-se observar nas fotomicrografias a presença de grandes vacúolos, presença de hemácias (figura 22 c) (seta vermelha), e núcleos irregulares (figura 22 c) (seta preta). Para avaliar o conteúdo de glicogênio nos cortes histológicos de fígado de ratos imaturos, as lâminas foram coradas com PAS (Figura 22 b-d) e a intensidade de grânulos de glicogênio foram quantificadas (seta branca).

Figura 22 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na morfologia hepática de ratos imaturos.



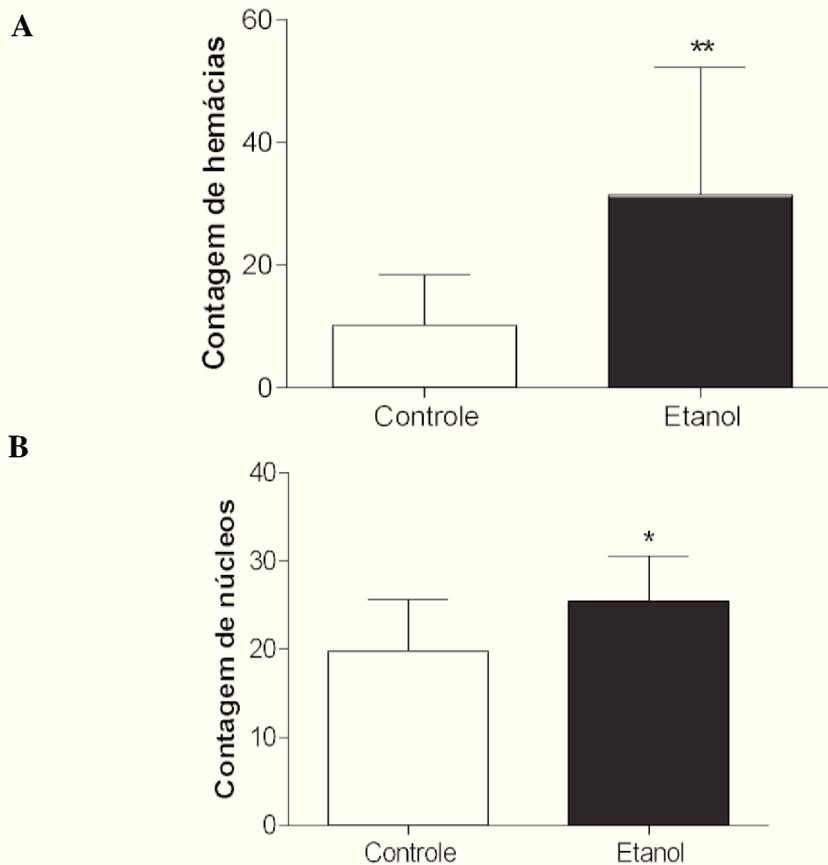
Microfotografias representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina (a-c) e PAS (b-d) de tecido hepático de ratos controles e expostos ao etanol durante a prenhez e o aleitamento. Seta preta: núcleo, seta vermelha: hemácias, seta branca: glicogênio, seta verde: vacúolos. Aumento = 40X (Barra = 20μm).

Fonte: do autor

Foram realizadas contagem de hemácias e núcleos nas microfotografias coradas com HE no aumento de 40X (figura 23A e B, respectivamente) e quantificada a intensidade de cor pelo software ImageJ (figura 24) no aumento de 40X para quantificação do conteúdo de glicogênio hepático de cortes histológicos corados com a técnica de PAS. A exposição materna ao etanol mostrou alteração no número de hemácias e de núcleos, assim como no conteúdo de glicogênio hepático.

O glicogênio hepático quantificado nas imagens histológicas coradas com PAS em cortes de fígado expostos ao etanol, corroboram com as análises bioquímicas realizadas na quantificação do conteúdo de glicogênio (Figura 18).

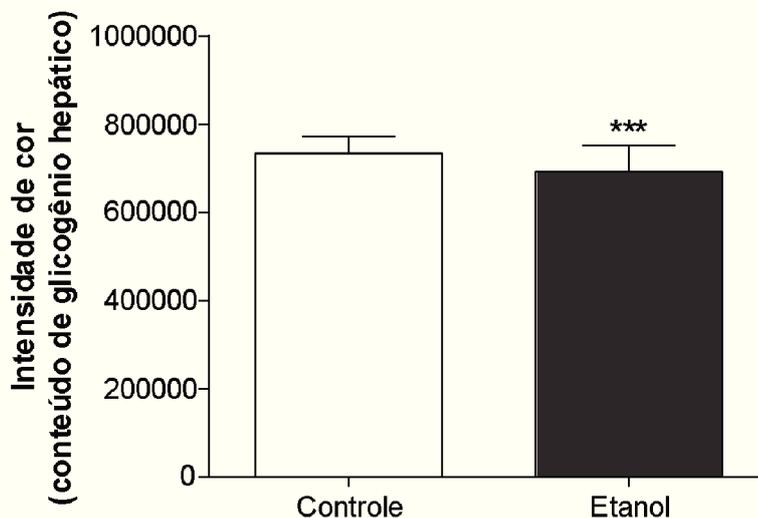
Figura 23 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a contagem de núcleos (A) e hemácias (B) de microfotografias de fígado de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação com 21 dias de idade.



As análises foram realizadas em micrografias obtidas em microscópio de luz com a objetiva de 40X. Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 24- Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol sobre o conteúdo de glicogênio em microfotografias de fígado de ratos expostos ao etanol com 21 dias de idade.



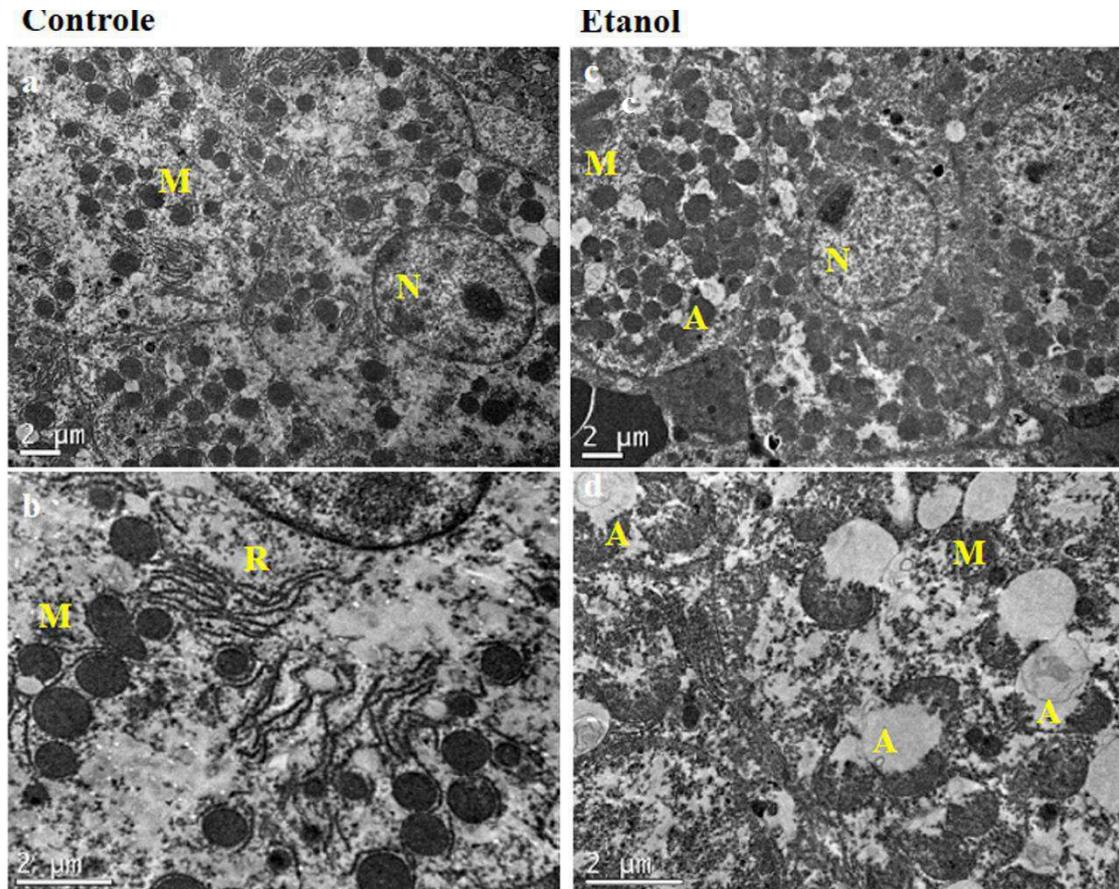
A análise foi realizada em microfotografias obtidas em microscópio de luz com a objetiva de 40X, coradas com PAS, no programa "ImageJ". Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.10. Avaliação das características microestruturais do fígado de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação por MET

Foram realizadas análises de imagens obtidas por MET do fígado de animais controles e expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. No grupo controle observou-se que integridade dos hepatócitos. O citoplasma dessas células apresentou mitocôndrias íntegras. No grupo tratado observou-se aumento no número de mitocôndrias, algumas com ruptura de membrana e perda de crista mitocondrial, além de mitofagia (autofagia mitocondrial) (Figura 25).

Figura 25 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de preparações histológicas do fígado de ratos imaturos.



Micrografia eletrônica de transmissão de células do fígado. Figura a-b. Grupo controle. Figura a. Visão geral dos hepatócitos, núcleo (N) e mitocôndrias (M). Figura b. Mitocôndrias com conteúdo homogêneo (M) e retículo (R). Figuras c-d. Grupo etanol. Figura c. Visão geral dos hepatócitos, citoplasma com grande quantidade de mitocôndrias, núcleo (N) e mitocôndrias (M). Figura d. Mitocôndrias dilatadas sem conteúdo interno, com perda de cristas (M) e autofagia (A).

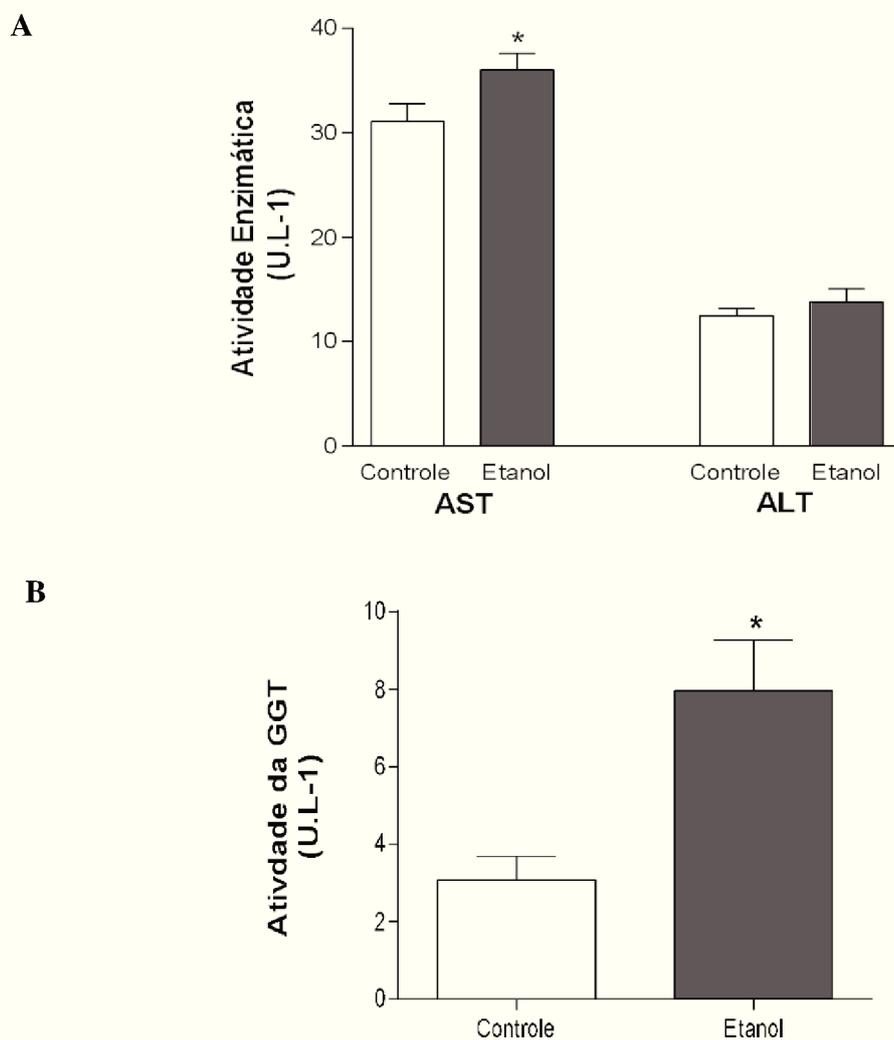
Fonte: do autor

6.2.11. Marcadores periféricos de hepatotoxicidade induzida por exposição materna ao etanol no soro de filhotes de 21 dias de idade.

Quando existe uma lesão no fígado, enzimas intracelulares extravasam das células hepáticas lesionadas e percorrem a circulação sanguínea, sendo possível a detecção no soro. As consequências ao fígado causadas pela exposição ao etanol em filhotes de 21 dias de idade foram monitoradas por análise quantitativa a partir da atividade da ALT, AST, bem como da

GGT, as quais são enzimas utilizadas na prática clínica como marcadores periféricos de lesão hepática. Conforme indicado na figura 27 (A e B), os resultados evidenciaram hepatotoxicidade induzida pelo etanol, devido ao aumento na atividade da AST e da GGT no soro dos ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação.

Figura 26 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na atividade das enzimas: (A) alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e (B) γ -glutamil transferase (GGT) em soro de ratos imaturos.



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

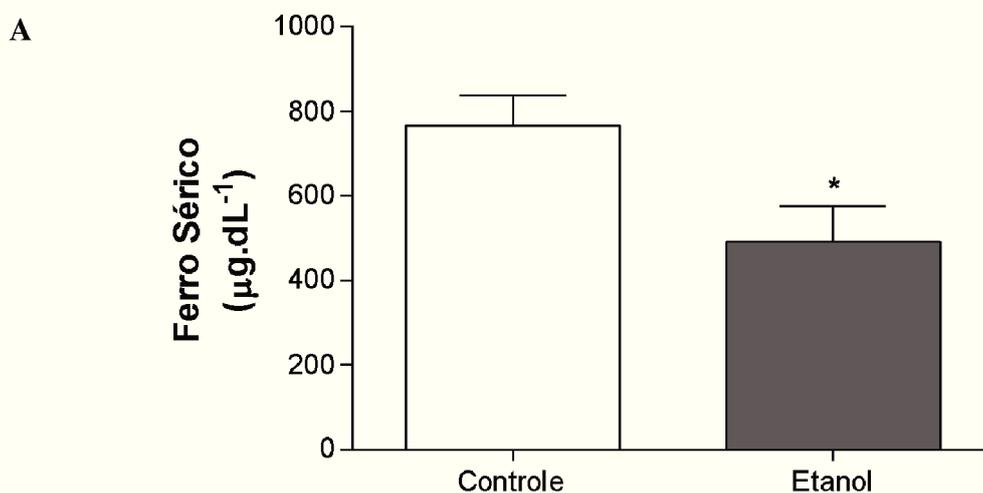
Fonte: do autor

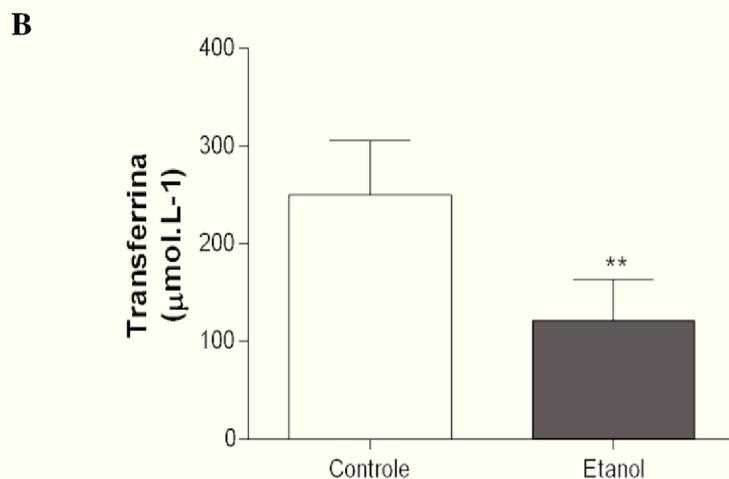
6.2.12. Consequências da exposição materna ao etanol nas concentrações e no transporte de ferro e transferrina em soro de ratos imaturos de 21 dias de idade.

Apesar de não terem sido observadas alterações no conteúdo de ferro hepático, os resultados demonstraram que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação induzem diminuição na concentração de ferro sérico (Figura 27A), sugerindo possível diminuição na quantidade de ferro total no corpo.

A transferrina é uma importante proteína transportadora de ferro no sangue periférico, que é sintetizada pelo fígado. Considerando-se a exposição materna ao etanol induziu dano hepático, como demonstrado nos resultados de morfologia tecidual, bem como a diminuição nas concentrações de ferro sérico, a concentração de transferrina foi determinada no soro dos animais controles e tratados. Como indicado na figura 27B, a exposição ao etanol acarretou em diminuição na concentração de transferrina sérica. Esses dados corroboram a hepatotoxicidade do etanol.

Figura 27 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na concentração de ferro e transferrina sérico em ratos imaturos.





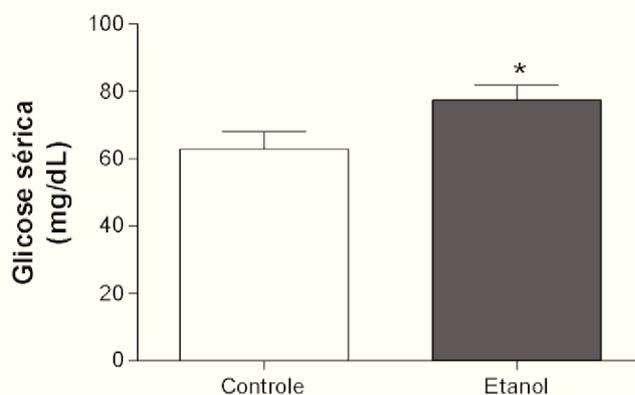
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.13. Consequências da exposição materna ao etanol na glicemia de ratos imaturos de 21 dias de idade.

O fígado exerce um papel fundamental no controle da glicemia, em especial no estado de jejum através do controle no metabolismo do glicogênio e da gliconeogênese. Conforme mostrado neste estudo, a exposição materna ao etanol diminui o conteúdo de glicogênio hepático (Figura 18 e 24), que pode estar associado ao aumento na glicemia de filhotes expostos ao etanol (Figura 28).

Figura 28- Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na glicemia em soro de ratos imaturos.



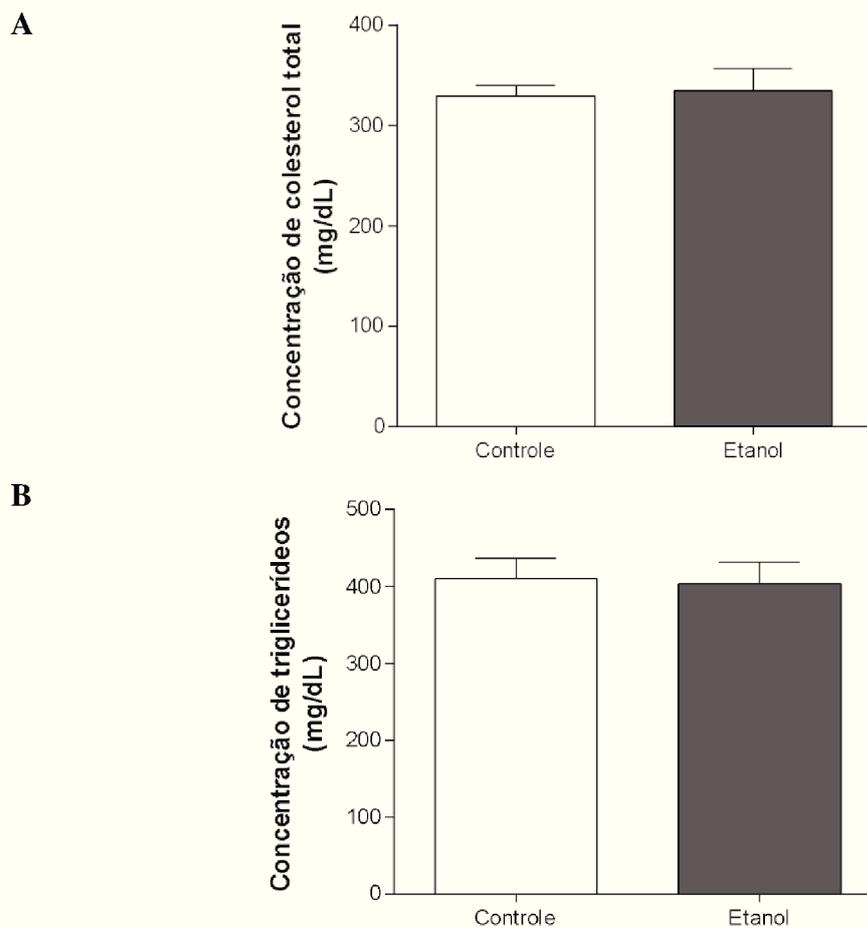
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.14. Efeitos da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação sobre as taxas de colesterol e triglicerídeos no soro de ratos de 21 dias de idade.

Para contribuir com os resultados anteriores, avaliou-se os níveis de colesterol total e triglicerídeos no soro de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. O colesterol é um componente fundamental para a integridade das células e para a produção de hormônios. Entretanto, o excesso de colesterol na circulação pode ser danoso ao organismo. Já a elevação dos triglicerídeos no soro está associada a aumento do risco de doenças coronarianas. Nossos resultados não mostraram nenhuma alteração significativa nestes dois parâmetros (figura 29A e B).

Figura 29 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e lactação nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos no soro de ratos imaturos.



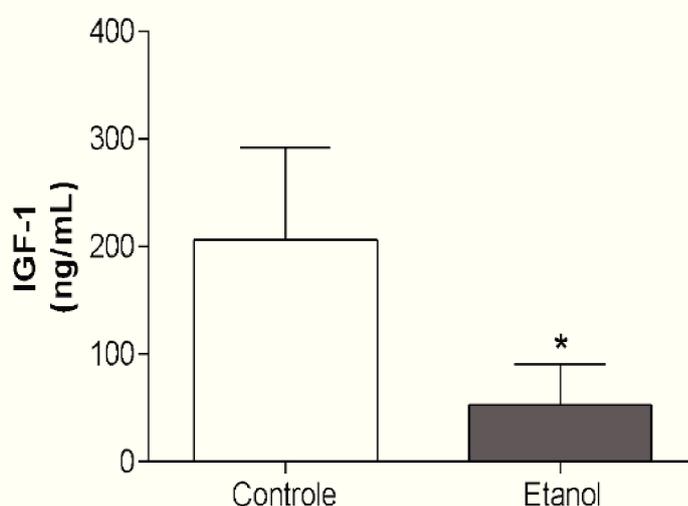
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.15. Efeito do etanol sobre os níveis de IGF-1 no sangue de filhotes de 21 dias de idade exposto durante a prenhez e aleitamento.

Para investigar os efeitos da exposição materna ao etanol sobre os níveis de IGF-1, o soro foi utilizado. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol induz a diminuição dos níveis de IGF-1 no soro de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação (Figura 30).

Figura 30 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e aleitamento nos níveis do fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-1).



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.16. Efeito a exposição materna ao etanol durante a prenhez e aleitamento em parâmetros hematológicos dos filhotes de 21 dias de idade

Para avaliar os parâmetros hematológicos da prole, realizou-se o hemograma completo no sangue periférico dos filhotes de 21 dias expostos ou não ao etanol. Os resultados mostraram diminuição significativa nos seguintes parâmetros: contagem de glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYMPH), monócitos (MON), granulócitos (GRAN) e de plaquetas (PTL), bem como aumento na amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW) e diminuição do plaquetócrito (PCT) no grupo etanol quando comparado ao controle, sem alterar os outros parâmetros (Tabela 2). Observou-se, portanto, que o plaquetograma dos animais expostos ao

etanol durante a gestação e aleitamento foi afetado significativamente em relação ao grupo controle, com diminuição da contagem de plaquetas e do plaquetócrito (PCT) (a percentagem do volume de plaquetas sobre o volume total de sangue), bem como no tamanho das plaquetas. A série vermelha de células sanguíneas não foi alterada pela exposição materna ao etanol.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos da prole de ratas expostas ao etanol durante a prenhez e o aleitamento.

	Controle	Etanol
WBCx10⁹/L	5,16 ± 0,83	1,96 ± 0,44**
LYMPH x10⁹/L	3,40 ± 0,46	1,24 ± 0,34**
MON x10⁹/L	0,26 ± 0,088	0,088 ± 0,023*
GRAN x10⁹/L	1,50 ± 0,29	0,75 ± 0,17*
LYMPH%	66,66 ± 1,69	55,49 ± 8,68
MON%	4,78 ± 0,87	4,78 ± 0,87
GRAN%	28,56 ± 1,39	28,64 ± 5,35
RCB x10¹²/L	4,94 ± 0,24	5,30 ± 0,42
HGB g/L	93,60 ± 5,41	107,10 ± 10,47
HCT %	31,68 ± 1,94	35,64 ± 3,17
MCV fL	66,78 ± 0,80	67,05 ± 0,80
MCH pg	19,68 ± 0,30	20,00 ± 0,39
MCHC g/L	66,78 ± 0,80	67,05 ± 0,71
RDW %	19,12 ± 0,66	38,91 ± 21,02
PLT x10⁹/L	596,75 ± 76,50	355,90 ± 41,90**
MPV fl	7,28 ± 0,28	7,99 ± 0,28
PDW	15,72 ± 0,16	16,28 ± 0,14*
PCT %	0,42 ± 0,053	0,28 ± 0,030**

Contagem de glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYMPH), monócitos (MON), granulócitos (GRAN), contagem de eritrócitos (RCB), hemoglobina (HGB), hemoglobina corpuscular média (MCH), volume corpuscular médio (MCV), concentração da hemoglobina corpuscular média (MCHC), largura de distribuição das células vermelhas (RDW), plaquetas (PTL), volume média das plaquetas (MPV), amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW), plaquetócrito (PCT). Os resultados são expressos como média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: **p<0,01 comparado com o controle.

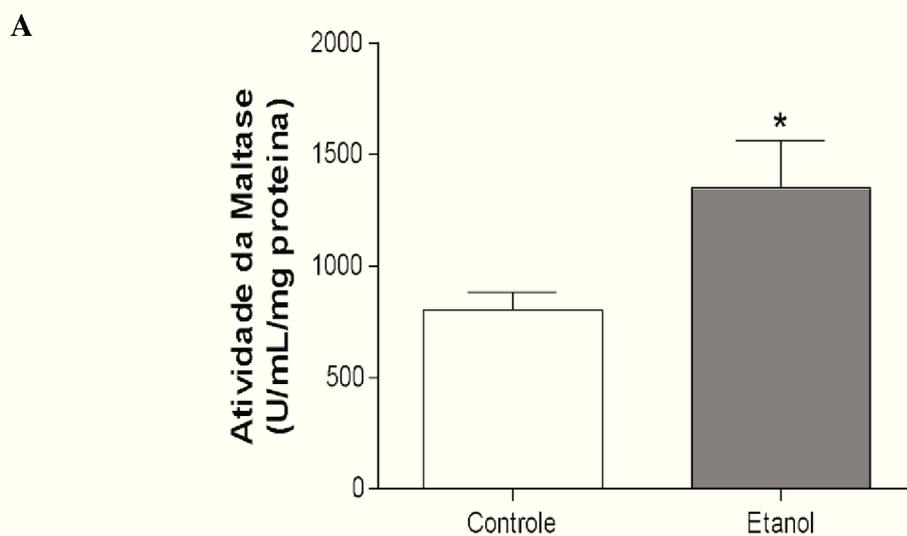
Fonte: do autor

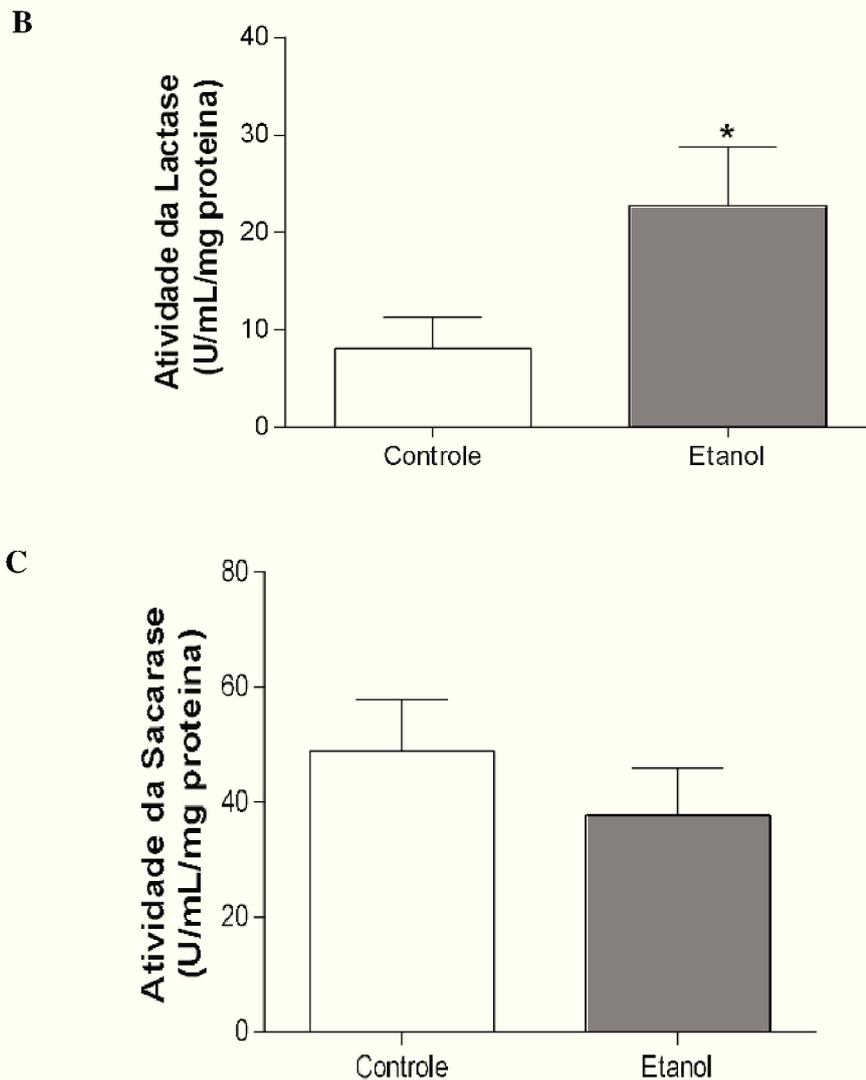
6.2.17. Efeito da exposição materna ao etanol na atividade das dissacaridases intestinais em filhotes de 21 dias de idade.

Considerando-se que a exposição materna ao etanol diminuiu o conteúdo de glicogênio hepático e aumentou a glicemia da prole, investigou-se os possíveis efeitos dessa exposição sobre as dissacaridases intestinais sacarase, lactase e maltase. Estas enzimas catalisam a hidrólise dos dissacarídeos sacarose, lactose e maltose, respectivamente, para que os monossacarídeos liberados sejam então absorvidos pelos enterócitos. Conseqüentemente, alterações na digestão dos dissacarídeos pode interferir na sua absorção, bem como na glicemia.

As Figuras 31A e 31B demonstraram que a exposição materna ao etanol aumenta a atividade das dissacaridases intestinais maltase e lactase no duodeno da prole. Por outro lado, a atividade da sacarase (Figura 31C) não foi alterada pela exposição ao etanol.

Figura 31 - Efeito da exposição ao etanol durante a gestação e aleitamento na atividade das dissacarídases maltase (A), lactase (B) e sacarase (C) no duodeno da prole.





Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

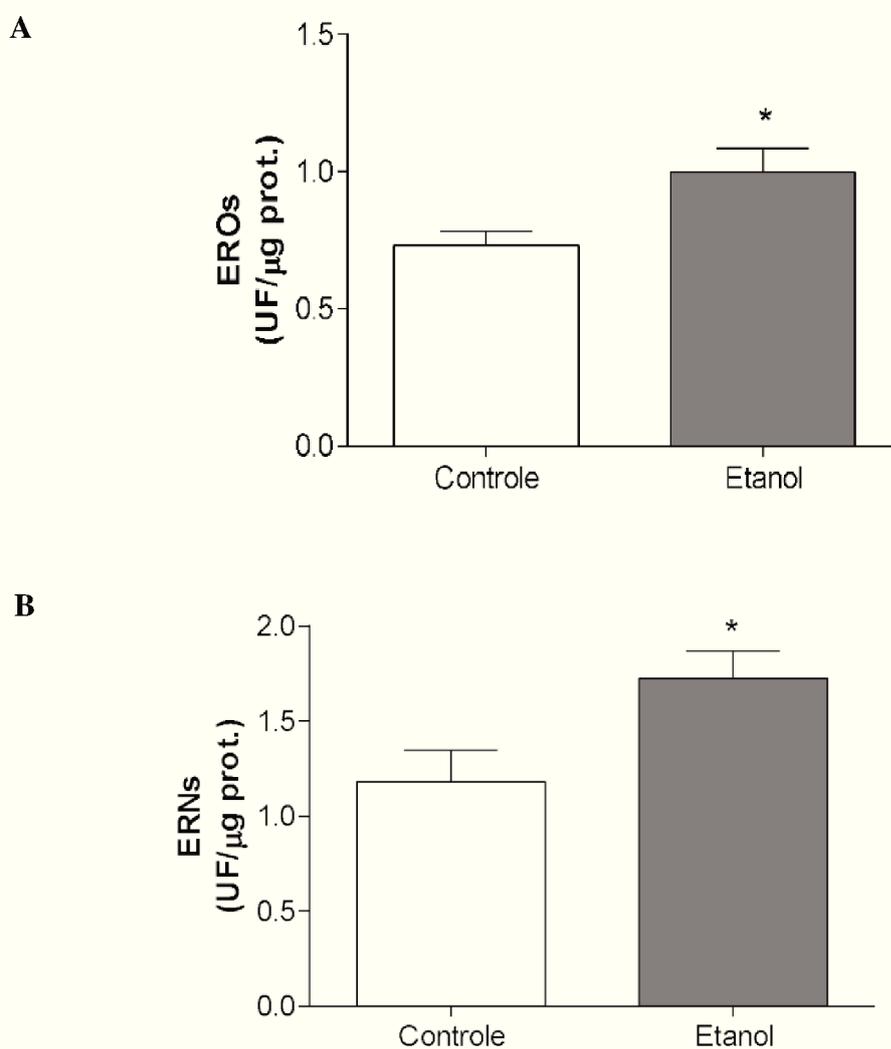
Fonte: do autor

6.2.18. Efeitos da exposição materna ao etanol sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo no duodeno de ratos imaturos

Para verificar o estado redox no duodeno dos filhotes de ratas expostas ao etanol durante a prenhez e lactação, alguns parâmetros bioquímicos foram mensurados, como a formação de EROs e de ERNs, bem como a atividade das enzimas GGT, SOD e CAT. Os resultados evidenciaram aumento significativo na geração de EROs e ERNs em fatias de duodeno dos animais expostos ao etanol, quando comparado ao grupo controle (Figura 32A e B).

Uma vez estabelecido o aumento na produção de EROs e ERNs no intestino da prole após exposição materna ao etanol, avaliou-se os efeitos dessa exposição sobre as defesas antioxidantes enzimáticas e a atividade da GGT neste tecido. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e aleitamento provoca o aumento na atividade da SOD associado a diminuição significativa na atividade da CAT e da GGT no duodeno dos filhotes expostos ao etanol quando comparados ao controle (Figura 33).

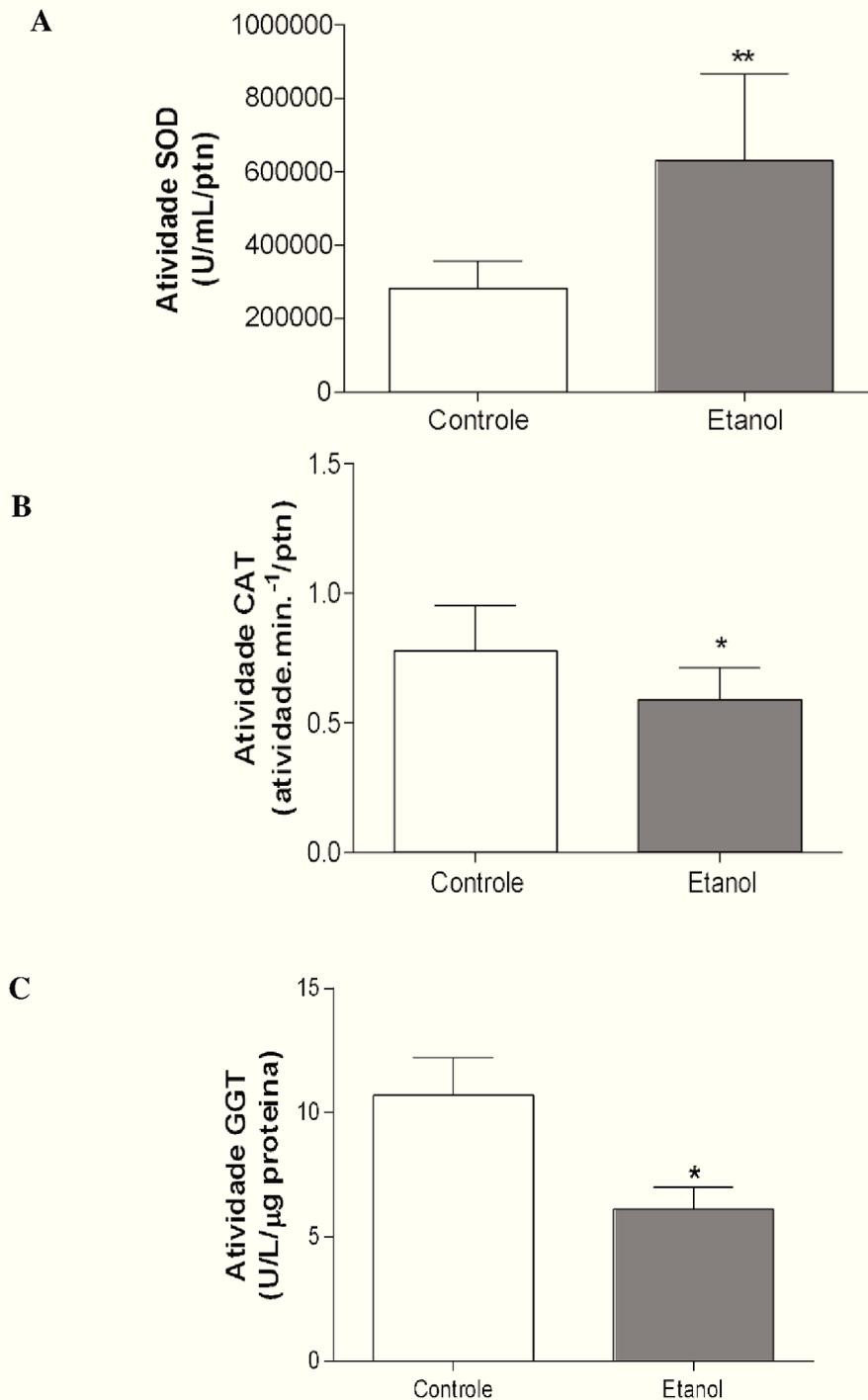
Figura 32 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação sobre parâmetros associados ao estado redox no intestino da prole.



Foram avaliados em homogeneizados de tecido as concentração de espécies reativas de oxigênio (A) e nitrogênio (B) no intestino de ratos imaturos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

Fonte: do autor

Figura 33 - Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) e GGT (C) em intestinos de ratos imaturos.



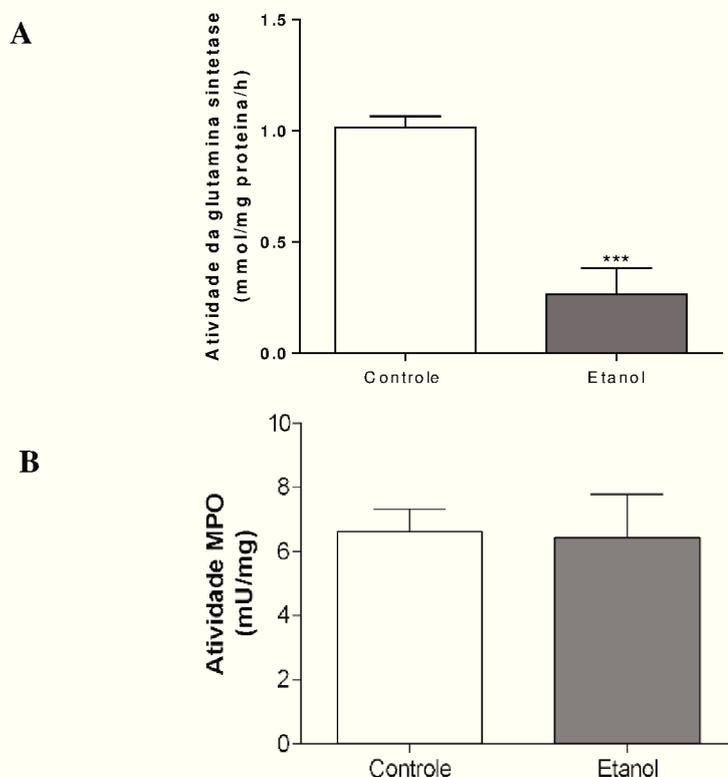
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.19. Efeitos da exposição ao etanol sobre a no intestino de ratos imaturos na atividade MPO e glutamina sintetase (GS)

A glutamina é uma importante fonte energética para o epitélio intestinal, sendo também utilizada para a síntese de nucleotídeos. No intestino, a glutamina atenua as reações que impulsionam inflamação sistêmica mediada pelo intestino, minimizando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, avaliamos a atividade da glutamina sintetase, enzima que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato, em amostras de duodeno de filhotes expostos ao etanol durante a gestação e lactação. Os resultados mostraram diminuição significativa na atividade desta enzima no intestino da prole (Figura 34A), e conseqüentemente, menor síntese de glutamina no duodeno de ratos expostos ao etanol. Considerando-se o papel da glutamina minimizando processos inflamatórios no intestino, verificou-se também a atividade da mieloperoxidase em amostras de duodeno da prole. Os resultados mostraram que a atividade da MPO não é alterada pela exposição paterna ao etanol (Figura 34B).

Figura 34 - Efeito da exposição da exposição materna ao etanol na atividade glutamina sintetase e da MPO em intestinos de ratos imaturos.



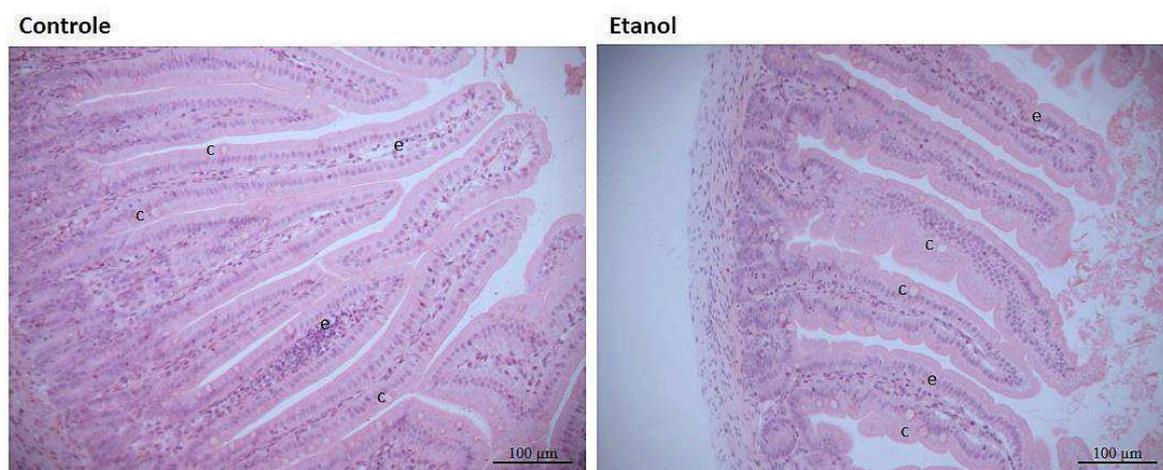
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.20. Análise histomorfológica e morfométricas de cortes de duodeno de animais expostos ou não ao etanol através de microscopia de luz

Para avaliar se a toxicidade induzida pelo etanol altera a morfologia do intestino de ratos imaturos após exposição durante a prenhez e lactação, cortes histológicos de intestino, na porção do duodeno de ratos de 21 dias de idade foram corados com hematoxilina-eosina. Os resultados mostraram que a morfofisiologia do fígado da prole é modificada pela exposição materna ao etanol. Nas imagens comparativas de corte histológico do duodeno de animais controles e de animais do grupo tratado com etanol observa-se maior espaçamento entre as vilosidades, contendo células caliciformes e enterócitos (figura 35). Foram realizadas análises morfométricas por meio de medidas de altura das vilosidades e diâmetro do intestino em preparações histológicas de amostras de duodeno coradas com hematoxilina-eosina de animais controles e expostos ao etanol. Os resultados mostraram um aumento significativo no diâmetro do intestino e uma diminuição na altura das vilosidades no grupo exposto ao etanol (Figura 36A e B, respectivamente). Também foi realizado a contagem de células caliciformes nos cortes histológicos coradas com PAS, os resultados mostraram menor número de células caliciformes no grupo exposto ao etanol quando comparado ao controle (figura 37).

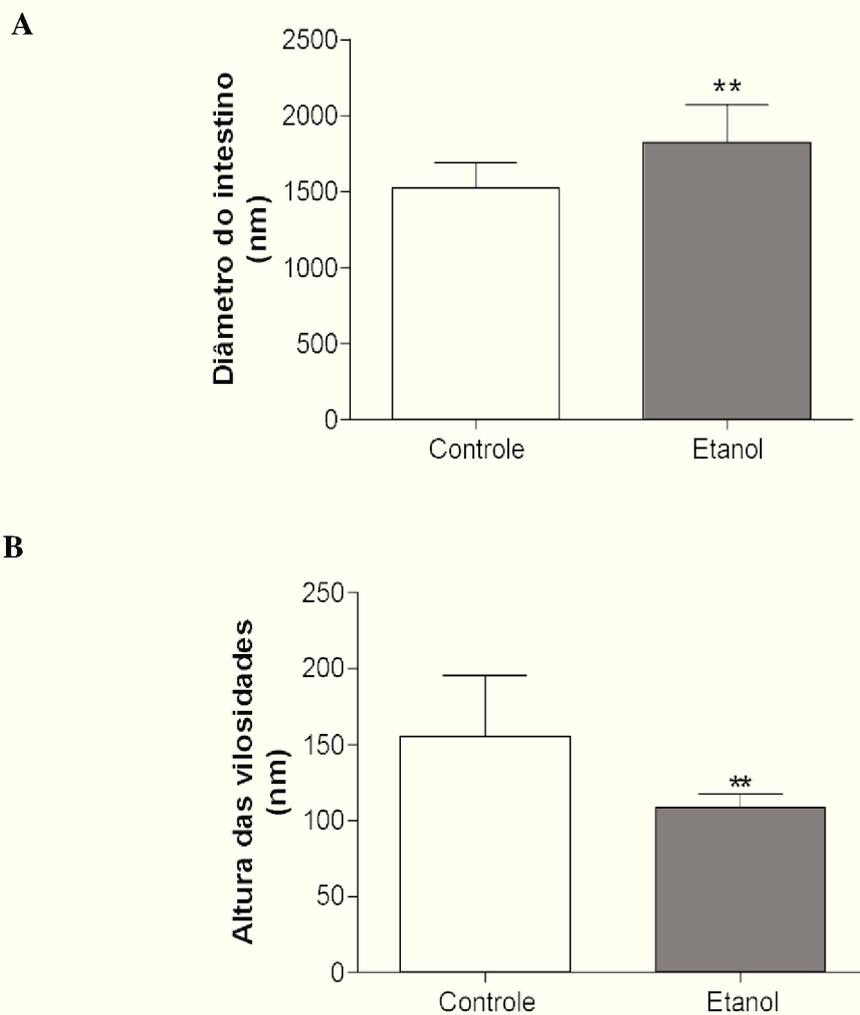
Figura 35 - Análise da histomorfologia e morfométrica de cortes de duodeno de animais expostos ou não ao etanol através de microscopia de luz.



Cortes transversais de intestino de animais de 21 dias de idade analisados em microscopia de luz. Animal controle e animal exposto ao etanol durante a prenhez e aleitamento. Coloração: HE, objetiva: 20X. Células caliciformes (C), enterócitos (E).

Fonte: do autor

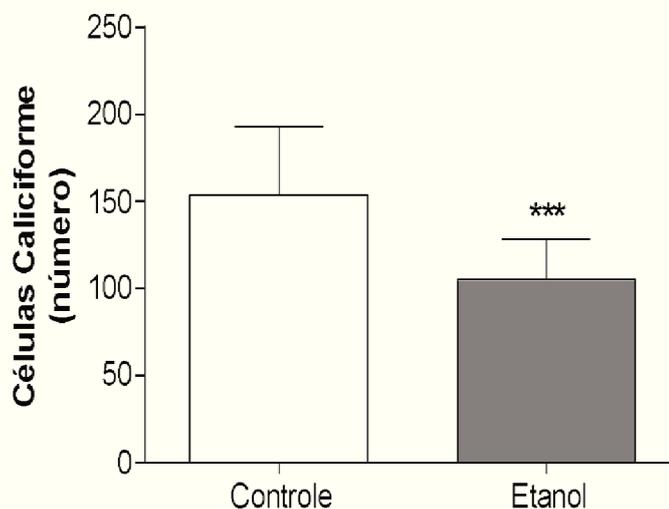
Figura 36 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação na medida da (A) altura das vilosidades e (B) diâmetro do duodeno, realizadas em imagens de microscopia de campo claro, objetiva de 10X, do intestino de ratos imaturos.



Medidas do intestino de animais de 21 dias de idade exposto ou não ao etanol analisados em microscopia de luz. Coloração: HE, objetiva: 10X. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 37 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação no número de células caliciformes do intestino de ratos imaturos.



Contagem de células caliciformes do intestino de animais de 21 dias de idade analisados em microscopia de luz. Coloração: PAS, objetiva: 20X Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.2.21. Discussão

Embora as consequências negativas de utilizar etanol durante a gravidez e os efeitos da SAF são bem conhecidos, ainda há mulheres grávidas que continuam a consumir etanol durante a gravidez. Das quatro milhões de gestações anuais nos Estados Unidos, 40% das mulheres ingerem etanol durante a gravidez e 3-5% das mulheres ingerem excessivamente durante a gravidez (FLOYD e SIDHU, 2004). A SAF não é considerada um distúrbio genético e, portanto, a intervenção precoce nas mães que abusam de etanol é fundamental na prevenção na gravidade da doença (YOUNG et al., 2014).

Estudos recentes vêm mostrando a associação entre SAF e anormalidades do SNC, transtornos neuropsiquiátricos e defeitos cardíacos congênitos. Poucos estudos englobam a combinação de diferentes órgãos associando a SAF com defeitos congênitos em tecidos variados. Neste contexto, este estudo investigou os efeitos do etanol sobre o fígado, parâmetros sanguíneos e intestino de ratos imaturos expostos durante a prenhez e lactação a este agente

tóxico, com o intuito de investigar os mecanismos relacionados ao sistema glutamatérgico, ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo.

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização do etanol, assim, tem sido considerado o órgão mais afetado pelo uso nocivo do etanol, juntamente com o cérebro. O etanol e seus produtos bioativos, como o acetato, o acetaldeído, ésteres de etanol e de ácidos graxos, aductos de etanol-proteína, têm sido considerados como hepatotoxinas que exercem, direta e indiretamente, efeitos tóxicos no fígado (ROCCO, et al.; 2014), geralmente associados a danos oxidativos.

As principais vias para síntese e desaminação de aminoácidos são pela reação de transaminação catalisada por aminotransferases como a ALT e a AST, permitindo que aconteça a interconversão entre o metabolismo de proteínas e de carboidratos durante condições de estresse, assim atendendo a alta demanda de energia do organismo (BALÁZS, 1965). Considerando-se que não foram observadas alterações nas aminotransferases hepáticas após exposição materna ao etanol, sugere-se que as reações de transaminação não são afetadas neste modelo pelo etanol no tecido hepático.

Investigamos a atividade da GGT, em fígado de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação, sendo esta enzima amplamente utilizada como marcador de dano hepático. Nossos resultados mostraram um aumento na atividade da GGT juntamente com a diminuição da concentração de GSH induzidos pela exposição materna ao etanol corroborando com o dano hepático e indução de estresse oxidativo no fígado da prole.

A função principal da GSH é proteger as células contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres (BUKOWSKA, 2003). A diminuição vista em nossos resultados na concentração de GSH pode ser parcialmente explicada pelo uso direto da GSH como tripeptídeo redutor das EROs produzidas pelo etanol. Em um estudo o etanol mostrou diminuir os níveis de GSH, principalmente nas mitocôndrias, caracterizadas por altos níveis de GSH que são necessários para eliminar as EROs geradas durante a atividade da cadeia respiratória. As mitocôndrias não sintetizam a GSH, mas importam do citosol usando uma proteína transportadora incorporada na membrana mitocondrial. O etanol pode estar interferindo com a função desta proteína transportadora, conduzindo assim à depleção de GSH mitocondrial (FERNANDEZ-CHECA et al., 1997).

Já a GGT é responsável pela degradação extracelular da GSH aumentando assim a disponibilidade de aminoácidos para serem captados pela célula e reutilizados na síntese de novo de GSH e assim, repor a concentração da GSH intracelular (ZHANG e FORMAN, 2009),

sugerindo assim o aumento da atividade da GGT. Esta enzima é indicadora de doenças hepáticas, e seus níveis elevados mostram disfunções no fígado causado principalmente pelo etanol (MURRAY et al., 1994).

O fígado quanto exposto a grandes quantidades de etanol sofre inúmeras mudanças morfológicas e fisiológicas que são consequências de estresse oxidativo e inflamação. O dano hepático induzido pelo etanol está principalmente ligado à produção excessiva de EROs nos hepatócitos (CEDERBAUM et al.; 2009). Já foi sugerida que a exposição aguda ou crônica ao etanol está ligada a mitocôndria como fonte significativa de EROs nos hepatócitos. A capacidade do etanol de aumentar a produção de EROs mitocondrial está associada com seu metabolismo ou com alterações no sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (BAILEY et al.; 2001).

A explicação deste processo está no metabolismo do etanol no fígado, começando com etanol desidrogenase (ADH), formando o acetaldeído, a formação deste agente instável é destrutivo a células do fígado, podendo reagir com DNA e criar aductos que resultam em lesão tecidual, também estimulam a regulação de citocinas desencadeando uma resposta inflamatória. O acetaldeído é metabolizado em acetato pela acetaldeído desidrogenase (ALDH) (AMBADE e MANDREKAR, 2012). A segunda via de degradação do etanol é através do sistema microsomal catalisado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP2E1), responsável pela degradação do etanol em condições de consumo crônico. O CYP2E1 quando ativado causa a liberação de EROS (ânions superóxido e radicais hidroxila), levando ao estresse oxidativo e à morte celular. Além disso, a formação de acetato a partir de etanol aumenta a relação NADH/NAD⁺ nas mitocôndrias e no citoplasma.

Excesso de NADH provoca a inibição da beta-oxidação mitocondrial e acumulação de lipídios intracelulares (DE MINICIS e BRENNER, 2008). Além disso, as EROs geradas pelo CYP2E1 podem peroxidar as enzimas mitocondriais e peroxissômicas que estão envolvidas na beta-oxidação (acil-CoA desidrogenase, carnitina palmitoil transferase-1), esta alteração pode resultar na deposição de ácidos graxos e no desenvolvimento de esteatose hepática (SID et al.; 2013).

Os resultados do nosso estudo mostraram um aumento EROs pela análise de oxidação do H₂DCF a DCF e também um aumento da concentração de TBARS indicando dano oxidativo lipídico, mas não alterou o conteúdo de ERNs. Corroborando com os nossos resultados, alguns estudos mostraram a indução de EROS e aumento de malondialdeído (MDA) (NIEMELA et al.; 1995; NIEMELA, 2001; WILLIS et al.; 2002; PANCHENKOA et al.; 2014).

Para proteção da célula, existe um sistema de defesa enzimática e não-enzimático que atua como detoxificadora do agente, constituída por glutathiona reduzida (GSH), SOD, CAT, GPx, entre outros (RAHMAN, 2007). Com isso, avaliamos essas enzimas em nosso modelo de exposição ao álcool no fígado de ratos imaturos. Os resultados demonstraram um aumento significativa da SOD e CAT, corroborando com o aumento de EROs no grupo exposto ao etanol. A SOD é uma enzima que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxido. A CAT funciona para catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (RAHMAN, 2007).

Drever e colaboradores (2012), mostraram em seu estudo, que em camundongos de 18 dias, tratados com uma única dose de etanol na prenhez (dia 8), diminuiu a expressão das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT) no cérebro fetal, sem diferença no fígado ou placenta fetal. Nossos resultados indicam uma ativação da defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio.

O fígado está envolvido no metabolismo de carboidratos (síntese de glicose e armazenamento de glicogênio), proteínas (conversão de amônia em ureia, entre outros), lipídios, armazenamento de vitaminas e metais (ferro, na forma de ferritina, e cobre), formação da bile, excreção de bilirrubina, biotransformação de substâncias endógenas (hormônios) e xenobióticos (SOTO-GUTIERREZ et al., 2011). Considerando o papel do fígado no metabolismo, investigou-se o efeito da exposição materna ao etanol no conteúdo de glicogênio hepático e nas concentrações de ferro hepático da prole. Os carboidratos são principalmente estocados na forma de glicogênio nos músculos e no fígado, além de outros tecidos (ZOIS et al., 2014). Nossos resultados mostraram diminuição significativa no conteúdo de glicogênio hepático, tanto no teste bioquímico como na quantificação em histologia por coloração PAS, de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. Por outro lado, o conteúdo de ferro hepático não foi alterado pela exposição ao etanol. Esses resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram que a SAF causa diminuição no conteúdo de glicogênio hepático (SINGH et al., 1986; SIMM E MURDOCH, 1988; TESTAR et al., 1988). Entretanto, ainda precisam ser esclarecidos os mecanismos envolvidos nesse efeito.

Também foi investigado o envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos do etanol sobre o fígado de ratos imaturos. Os resultados mostraram diminuição na atividade da GS, enzima envolvida no metabolismo do glutamato, tendo como função a amidação de glutamato a glutamina. Além disso, a GS tem vários fatores que regulam a sua atividade tais como glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina. O fígado

desempenha um papel central no metabolismo da glutamina, pois é capaz de absorver ou liberar quantidades significativas de glutamina de acordo com as necessidades metabólicas do organismo. A glutamina possui algumas funções importantes como a proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o controle do equilíbrio ácido básico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, entre outros, sua função pode estar comprometida pela exposição ao etanol. (ARDAWI, 1990; NEWSHOLME et al.; 2003; SANTOS et al.; 2007).

O consumo crônico de álcool aumenta a permeabilidade do intestino, resultando em níveis elevados de endotoxina portal (lipopolissacarídeo, LPS). O LPS então ativa as células de Kupffer no fígado para produzir espécies reativas de oxigênio e TNF- α (HRITZ et al., 2008; ZHAO et al., 2008; PUROHI et al., 2006; MCCLAIN et al., 1999), ocasionando a inflamação e lesão hepática. Células de Kupffer ativadas por LPS também produzem citocinas hepatoprotetoras (como IL-6) e anti-inflamatórias (como IL-10 e adiponectina) que desempenham papéis compensatórios na melhora da doença do fígado (COHEN, 2010; ROYCHOWDHURY et al., 2009). Estes efeitos estão diretamente relacionados com o tempo de exposição e dose ingerida (MESSINGHAM et al., 2002).

Nossos resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de citocina IL-6 e atividade da MPO, mas não alterou os níveis de TNF no grupo exposto ao etanol quando comparados ao grupo controle.

As citocinas IL-6 e IL-10 desempenham papéis na redução da lesão hepática alcoólica e inflamação através da ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3) (GAO, 2005). A elevação da IL-6 foi relatada em pacientes com doença hepática alcoólica e se correlaciona com a gravidade da doença (HILL et al., 1992). No entanto, estudos usando modelos animais revelam que a IL-6 protege contra a lesão hepática induzida pelo etanol. Estudos mostraram que camundongos deficientes da citocina IL-6 são mais suscetíveis à esteatose induzida por etanol e lesão hepática (EL-ASSAL et al., 2004; HONG et al., 2002)

Mandrekar e colaboradores (2006) e Nagy (2003) demonstraram que exposição crônica ao álcool frequentemente está associada à expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias em especial o TNF. A expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela exposição ao álcool ocasiona lesões teciduais mediadas por inflamação.

O consumo de etanol tem como consequência a doença hepática crônica, que pode progredir de esteatose ou fígado gordo a esteato-hepatite para fibrose até cirrose ou até o câncer de fígado (TESTINO et al., 2012). Para avaliar as consequências do uso do etanol no fígado de

ratos de 21 dias de idade exposto ao etanol durante a prenhez e lactação examinamos histologicamente os fígados destes animais por coloração de eosina e hematoxilina, as fotomicrografias obtidas por microscopia de luz mostram a presença de grandes vacúolos, possivelmente de gordura, nos hepatócitos de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. Alguns estudos em ratos adultos expostos ao etanol foi analisado o fígado através de microscopia de luz de campo claro no qual mostraram um acúmulo de gotículas de gordura por coloração eosina e hematoxilina, esta acumulação de gordura nos hepatócitos desenvolve a doença do fígado gordo (esteatose), que progride hepatite e fibrose e, finalmente, leva à cirrose hepática (AROOOR et al., 2011; HAN et al., 2013; TAKAHIRO et al., 2014; PARK et al., 2014).

Kaçkaya e Akay (2005) mostraram alterações na histologia do fígado com degeneração citoplasmática dos hepatócitos e aumento do número de megacariócitos, em feto de ratos que receberam etanol durante a prenhez. Shen e colaboradores (2014) mostraram em seu estudo que ratas prenhas que receberam somente etanol por gavagem durante a prenhez, causaram em sua prole um maior acúmulo de pequenas gotículas lipídicas em torno da veia central, a maioria das quais era esteatose micro-vesicular. Em nosso estudo foram realizadas algumas colorações (SUDAN black, III, IV e vermelho neutro) para investigar o acúmulo de gordura em fatias de fígado de ratos expostos ao etanol durante a prenhez e aleitamento, o que não mostrou alterações significativas entre o grupo controle e etanol (dados não mostrados). Também não foram encontradas gotículas de gordura em fatias de fígado no grupo tratado pelo método MET. Por outro lado, os dados do presente estudo demonstram maior número de núcleos e de hemácias no grupo exposto ao etanol, sugerindo que a exposição materna ao etanol está associada a hepatopatia com hemorragia na prole.

Foi observado que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e aleitamento apresentou mitocôndrias com perda de cristas e mitotofagia em cortes histológicos de fígado da prole. A autofagia mitocondrial, ou mitofagia, é um processo de sequestro autofágico e degradação lisossômica da mitocôndria que ocorre em resposta à privação de nutrientes, lesão mitocondrial e necessidade de remodelação citoplasmática, conforme as mudanças de demanda bioenergéticas (CZAJA et al., 2013; KIM et al., 2007). A autofagia também pode ocorrer por estímulos estressores, como a exposição aguda ao etanol (WILLIAMS et al., 2015).

Ding e colaboradores (2010a e 2011) e Williams e colaboradores (2015) demonstraram que a estimulação da mitofagia reduziu a esteatose aguda e a hepatotoxicidade em modelo de rato com consumo de etanol. Ainda não está esclarecido se a autofagia é uma característica

morfológica comum em células em processo de morte, ou um processo para manter as células vivas sob condições estressoras (KROEMER e LEVINE, 2008).

Além dos efeitos da exposição materna ao etanol sobre o tecido hepático, avaliaram-se também alguns parâmetros bioquímicos no sangue periférico de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. Nesse contexto, a GGT sérica foi investigada como um biomarcador de dano hepático em caso por compostos toxicantes. Embora GGT não seja encontrada em todos os tecidos, apenas a isoforma hepática é detectável em soro (ROSALKI et al.; 1970). Clinicamente, este teste tem sido utilizado para a avaliação de lesões hepáticas e seus níveis séricos podem aumentar em resposta à exposição de uma variedade de substâncias, principalmente o etanol (SILLANAUKKEE et al.; 2000). Os nossos resultados evidenciaram o aumento na atividade da GGT no soro dos ratos expostos ao etanol, indicando hepatotoxicidade. Tais achados também foram descritos por Dunigan e Werlin (1981) os quais relataram aumento na atividade da GGT sérica bem como a atividade das aminotransferases em pacientes de 11 semanas de idade com SAF.

Além da GGT, nossos resultados mostraram aumento na AST sérica de animais expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. A AST, existente tanto na forma mitocondrial quanto citoplasmática, é encontrada principalmente no coração, fígado, músculo esquelético e rim. Já a ALT, exclusivamente citoplasmática, é encontrada principalmente no fígado e no rim. A AST e a ALT são duas enzimas frequentemente mensuradas em exames laboratoriais, sendo amplamente utilizadas como marcadores de lesão hepatocelular aguda ou crônica e doenças cardíacas. A relação entre as duas fornece perspectiva clínica sobre várias doenças hepática, enquanto a AST é muito útil para a detecção ou estimativa de gravidade de infarto agudo do miocárdio, elevações das transaminases também são observadas em hepatite viral e tóxica, na mononucleose, cirrose, carcinoma hepático primário ou metastático, pancreatite, traumatismo extenso e no choque prolongado (REJ, 1989).

Nosso estudo de exposição materna e lactacional ao etanol em fígado de ratos imaturos mostrou uma diminuição significativa tanto nas concentrações de ferro como de transferrina. O ferro é um elemento essencial ao nosso organismo e participa em inúmeras reações bioquímicas, como catalisar reações de transferência de elétrons, de fixação de nitrogênio ou de síntese do DNA, assegurar o transporte de oxigênio, com isso possui um efeito tóxico por reagir com oxigênio (ANDREWS, 2008). O ferro ingerido através dos alimentos (Fe^{2+}) é rapidamente oxidado no estômago (Fe^{3+}), e após é absorvido pelo duodeno e pelo jejuno proximal, o ferro é rapidamente ligado a transferrina na circulação sanguínea e transportado para todas as células

do corpo e depois é armazenado sob a forma de ferritina no fígado (principal órgão de armazenamento de ferro) (ANDREWS, 2008).

Nossos resultados não mostraram alteração na concentração de ferro no fígado, mas essa diminuição de ferro sérico pode estar envolvida com anemia, já que o ferro depositado no organismo é muito importante para a produção de células vermelhas, sendo de fundamental importância para a hemoglobina. O acoplamento do ferro à eritropoietina gera a produção de novas células vermelhas. Se um destes componentes estiver ausente, ocorre a anemia, os efeitos da deficiência são decorrentes da anemia e do esgotamento de enzimas essenciais para os tecidos. A deficiência de ferro é mais comum em crianças e mulheres grávidas (MILLER, 2013).

O ferro é especialmente crítico durante a gravidez devido ao rápido desenvolvimento celular tecidual envolvido no crescimento fetal, Rufer e colaboradores (2012) demonstraram que o estado nutricional materno, especificamente a deficiência de ferro, pode ser um fator importante no comportamento neurológico e no crescimento no modelo de SAF em ratos. Ratas prenhas com uso de etanol e com deficiência de ferro tiveram filhotes que apresentaram reduções significativas no crescimento somático, na aprendizagem associativa, na mielinização e na sobrevivência neuronal. Em contraste, quando ocorreu a suplementação de ferro adequado, o dano ao desenvolvimento neurológico do etanol foi atenuado e déficits modestos na aprendizagem, no crescimento corporal e na neuroanatomia foram encontrados. Este estudo pode explicar ao menos em parte, a baixa concentração de ferro sérico em nosso modelo e análises sanguíneas para confirmação de anemia foram realizadas, no qual não apresentou um quadro de anemia no nosso modelo de exposição ao etanol em ratos de 21 dias de idade, podendo estar relacionada com anemia tardia em relação a idade que foi analisado.

Muitos são os efeitos causados ao feto quando o etanol é ingerido durante a prenhez. Estudos já mostram alterações na homeostase da glicose desde o nascimento até a vida adulta, foram demonstrados níveis elevados de glicose no sangue destes animais em comparação aos que não foram expostos ao etanol (VILLARROYA e MAMPEL, 1985; CHEN et al.; 2004; CHEN e NYOMBA, 2004), estes achados corroboram com uma pesquisa feita em humanos expostos ao etanol *in útero* (CASTELLS et al., 1981). Outro estudo mostrou hiperglicemia e respostas hiperinsulinêmicas ao teste de tolerância à glicose (HERPER et al.; 2014). Nem todos os estudos encontrados mostraram hiperglicemia (BUNOUT et al., 1989; BUNOUT, 1999; PROBYN et al., 2013). Essa diferença pode estar relacionada a variações experimentais em

relação ao consumo de etanol ou de alimentos. Nossos resultados são similares aos estudos demonstrando um aumento nos níveis de glicose sanguínea.

Neste estudo realizamos análises dos níveis de triglicerídeos e colesterol, onde não se observou nenhuma alteração nesses parâmetros. Pennington e Pennington (2006) avaliaram no modelo de dieta líquida isocalórica, o efeito do consumo materno de etanol durante a gravidez nos perfis de lipoproteína na prole adulta, mensurados por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, e observaram aumento significativo nos parâmetros de colesterol e triglicerídeos. Estes resultados encontrados foram diferentemente do nosso estudo, que não foi utilizado nenhum parâmetro calórico no álcool, assim pode ser explicada a diferença entre os estudos.

Investigamos os níveis de IGF-1 no soro de filhotes expostos ao etanol durante a prenhez e aleitamento. Foi observado uma diminuição significativa nos níveis de IGF-1, quando comparados ao grupo controle. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são uma família de proteínas que fazem parte de um complexo sistema de sinalização (IGF-1 e IGF-2), receptores, proteínas de ligação a IGF e proteases (TORRES-ALEMAN, 2010). O IGF-1 é citoprotetor e alterações nessa sinalização peptídica podem estar envolvidas na patogênese de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão (LEGGIO et al., 2008; MALBERG et al., 2007).

García-Marchena e colaboradores (2017) mostraram em seu estudo níveis baixos de BDNF e IGF-1 em pacientes com síndrome de abstinência ao álcool. Ni e colaboradores (2015), Shen e colaboradores (2014) mostraram em seu estudo baixos níveis séricos de IGF-1, em filhotes com exposição pré-natal ao etanol. Srivastava e colaboradores (1995) mostraram que a supressão no IGF-1 induzida pelo álcool causa um crescimento corporal reprimido e interfere com a maturação e a função de vários sistemas. Além disso, a redução do IGF-1 circulante para o feedback sobre o hipotálamo reduz ainda mais a secreção de GH (DEES et al. 2009).

Ao nascimento, os níveis plasmáticos de IGF-1 estão em 50% dos níveis dos adultos e aumentam gradualmente durante toda a infância com um pico durante a puberdade, quando o IGF-1 desempenha um papel crítico na maturação dos órgãos reprodutivos e no crescimento dos ossos longos. Após a puberdade, os níveis diminuem novamente lentamente para atingir o nível do adulto. O IGF-1 pode controlar sua própria secreção através de feedback negativo no nível do hipotálamo e pituitária, reduzindo a síntese e liberação de GH (hormônio do crescimento). GH e IGF-1 regulam importantes processos fisiológicos no corpo, tais como

crescimento e desenvolvimento pré e pós-natal (GIUSTINA et al., 2008) e metabolismo de carboidratos e lipídios (MOLLER e JORGENSEN 2009).

O consumo excessivo do álcool causa diversas alterações a nível da medula óssea, estão descritas alterações nas linhas eritroide, granulocítica e megacariocítica, assim como, anemia, leucopenia, trombocitopenia e aumento do volume corpuscular médio (VCM), que a nível periférico são as mais evidenciadas (COSTA et al., 2007). O álcool também pode provocar a deficiência de elementos essenciais para a formação do eritrócito, que pode ser atribuído à menor ingestão, absorção, captação, retenção hepática e maior excreção urinária. Assim, o eritrócito formado tem tamanho maior que o normal e recebe o nome de macrócito (MAIO et al., 2000).

Nosso modelo animal de exposição ao álcool durante a prenhez e lactação, mostraram alterações significativas diminuindo glóbulos brancos (WBC), linfócitos, monócitos, granulócitos, contagem plaquetária e aumentando de PDW (tamanho das plaquetas) em comparação ao controle de ratos de 21 dias de idade, sem alterar os outros parâmetros. Costa e colaboradores (2007), encontraram diferenças significativas em pacientes com doença hepática alcoólica crônica. O grupo com doença hepática alcoólica crônica apresentou uma contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, valores absolutos de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e plaquetas significativamente inferiores aos encontrados na população controle. O VGM, PDW, a hemoglobina globular média e o RDW apresentam valores significativamente superior no grupo de doentes. Em relação ao volume plaquetário médio (VPM) não encontraram diferenças.

A importância de manter os níveis normais de células brancas, é para proteger o corpo contra infecções, os glóbulos brancos participam de muitos tipos de respostas imunológicas e inflamatórias. Existem dois tipos de leucócitos: linfócitos, que são responsáveis pela produção de anticorpos e pela imunidade mediada por células; e fagócitos que são responsáveis pela ingestão e morte de microrganismos (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos). Considerando que os fagócitos, formam uma importante linha de defesa contra microrganismos invasores, os distúrbios, em termos de função ou de quantidade dessas células, geralmente resultam no aumento da suscetibilidade a infecções. O quadro de neutropenia aumenta o risco de infecções nos casos de rompimento de mucosas ou de barreiras cutâneas, ou no tratamento com corticosteróides, assim, correndo o risco de infecções causadas por organismos patogênicos que colonizam as superfícies do corpo, principalmente pele, orofaringe e TGI. (LANE e BERLINER, 2015). Nossos resultados, mostraram alteração nos glóbulos

brancos e plaquetas, o que indicam distúrbios afetando a medula óssea ou as plaquetas, sendo importante realizar mais testes.

No presente estudo utilizou-se um modelo experimental de exposição materna ao etanol durante os períodos gestacional e lactacional, no intuito de identificar se essa exposição acarretaria em dano oxidativo e alterações histomorfológicas no intestino de ratos de 21 dias de idade. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol provoca estresse oxidativo e alterações ultraestruturais no intestino da prole. Dentre essas alterações destaca-se o maior espaçamento das vilosidades e diminuição na produção de muco no intestino destes animais.

Com o intuito de investigar os efeitos do etanol durante a prenhez e lactação na exposição materna, avaliamos a atividade das dissacaridases intestinais de ratos imaturos. O intestino é um órgão fundamental para a absorção de glicose e demais nutrientes. Assim, a integridade funcional do intestino é um fator importante para absorção e distribuição de glicose para outros tecidos através da circulação seja eficiente (KELLETT et al., 2005). As dissacaridases presentes no intestino são importantes para homeostase energética, pois hidrolisam os dissacarídeos provenientes dos alimentos (BERTRAND et al., 2015). As dissacaridases de maior importância são a maltase, sacarase e a lactase, estas são encontradas no lado luminal da membrana das células da mucosa intestinal. A maltase tem como função hidrolisar a maltose em duas moléculas de glicose, a sacarase hidrolisa a sacarose, produzindo a glicose e a frutose, a lactase hidrolisa a lactose em galactose e glicose. Após a liberação dos monossacarídeos, estes são transportados para o interior do enterócito (KRASIKOV et al., 2001).

Nossos resultados mostraram um aumento da atividade da maltase e da lactase, sem alterar a atividade da sacarase. Os animais expostos ao etanol durante a prenhez e lactação, estavam sendo alimentados unicamente pelo leite materno, explicando o aumento destas enzimas. Este aumento pode explicar os níveis elevados de glicose encontrados nos animais expostos ao etanol, já que a maltase libera duas moléculas de glicose e a lactase uma molécula de glicose e uma de galactose. O aumento na atividade das dissacaridases no intestino delgado de ratos expostos ao etanol pode estar envolvido direta ou indiretamente no aumento da glicemia observada nesses animais.

A mucosa intestinal desempenha um papel importante no metabolismo do etanol, uma vez que a superfície epitelial incorpora o etanol no sistema sanguíneo por difusão passiva, sendo responsável por aproximadamente 80% da sua absorção e os outros 20% são absorvidos pela mucosa gástrica (NORBERG et al., 2003). Um estudo de intoxicação aguda por etanol em camundongos mostrou que o álcool pode induzir a expressão do CYP2E1 intestinal e que essa

indução está correlacionada com maior liberação de endotoxinas e translocação de bactérias do fígado (ABDELMEGEED et al., 2013). O CYP2E1 ativado pode produzir estresse oxidativo e dano tecidual como resultado de EROs, e esse estresse oxidativo pode danificar a função da barreira intestinal (FORSYTH *et al.*, 2013).

Avaliamos a produção de EROs e ERNs, assim como as atividades da SOD e CAT, nossos resultados mostraram que a exposição materna ao álcool aumenta EROs, ERNs, SOD e CAT no intestino de ratos de 21 dias de idade. Banan e colaboradores (1999) mostraram aumento de EROs (DCF) e da SOD. Cho e Song (2018) mostraram em fêmeas adultas que receberam 3 doses de álcool 5 g/kg/dose, o aumento do estresse nitroxidativo no colón com níveis elevados de CYP2E1. Alguns estudos em ratos adultos mostraram que o etanol aumenta o estresse oxidativo e iNOS no intestino, ocasionando lesão oxidativa tecidual e consequentemente vazamento intestinal (BANAN et al., 2001; 2000; 1999). Uma das principais causas de dano ao intestino induzido pelo etanol é o aumento de EROs e ERNs, através da ativação de enzimas/genes pró-oxidantes enquanto suprime os níveis de antioxidantes (SONG et al., 2014; LU et al., 2008).

A GGT, como visto anteriormente, é uma enzima presente nas membranas celular e nas frações microssômicas envolvidas no transporte de aminoácidos da membrana celular, presente no rim, fígado, pâncreas e também no intestino (HOCK, 2005), catalisa a transferência do grupo gama glutamil de peptídeos e outros compostos para outros peptídeos, aminoácidos e água. É uma enzima etanol induzida, pois os níveis aumentados de etanol no soro refletem a indução de maior atividade da enzima, principalmente no fígado (FIGLIE et al., 2002). Persson (1991) mostrou a atividade da GGT aumentada o que pode, em parte, explicar a elevação do GGT no soro após beber pesado. Ao contrário dos resultados encontrados do intestino de adultos, nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa da atividade de GGT comparado aos animais que não foram expostos ao etanol.

Avaliamos a atividade MPO no intestino de ratos exposto ao etanol durante a prenhez e lactação como um marcador de respostas inflamatórias. O etanol não alterou a atividade da MPO na mucosa do intestino, acredita-se que o etanol não leva a processos inflamatórios no intestino de ratos imaturos neste modelo, mas Tang e colaboradores (2009) demonstraram um aumento da atividade da MPO na mucosa do cólon de ratos adultos expostos ao etanol na dosagem de 8 g/kg/dia duas vezes por dia durante 12 semanas. Estudos complementares precisam ser realizados para contribuir com o resultado obtido sobre a inflamação no intestino do nosso modelo animal de exposição ao etanol.

O etanol é uma molécula capaz de interagir com uma variedade biomoléculas, incluindo proteínas e carboidratos de membranas (BARRY et al., 1994). Dentre os efeitos tóxicos do etanol e de seu metabólito (acetaldeído), destaca-se o comprometimento da permeabilidade do epitélio intestinal bem como diversos distúrbios da mucosa intestinal (SEITZ et al., 2001; OMANN et al., 2000). No epitélio gastrointestinal a mucosa é coberta por um muco protetor, composto principalmente de glicoproteínas–mucinas, sintetizado pelas células superficiais (células caliciformes), células estas sensíveis às agressões sofridas pela mucosa, podendo sofrer alteração pela exposição ao etanol (DEPLANCKE e GASKINS, 2001).

Ao avaliar a histomorfologia do intestino dos ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez e aleitamento, foi observado em cortes de intestino delgado corados com HE, diferenças na morfologia do intestino, como o diâmetro intestinal significativamente maior, assim como a altura das vilosidades mais curtas e uma diminuição do número de células caliciformes no grupo exposto ao etanol em comparação ao grupo controle. Cho e Song (2018) também observaram em análise morfométrica do intestino coradas com HE, que ratos adultos expostos ao álcool apresentavam uma altura das vilosidades significativamente mais curta em comparação com os ratos de controle, o “encurtamento” das vilosidades induzido pela exposição ao etanol pode ser um dos fatores associados a prejuízos na absorção de nutrientes.

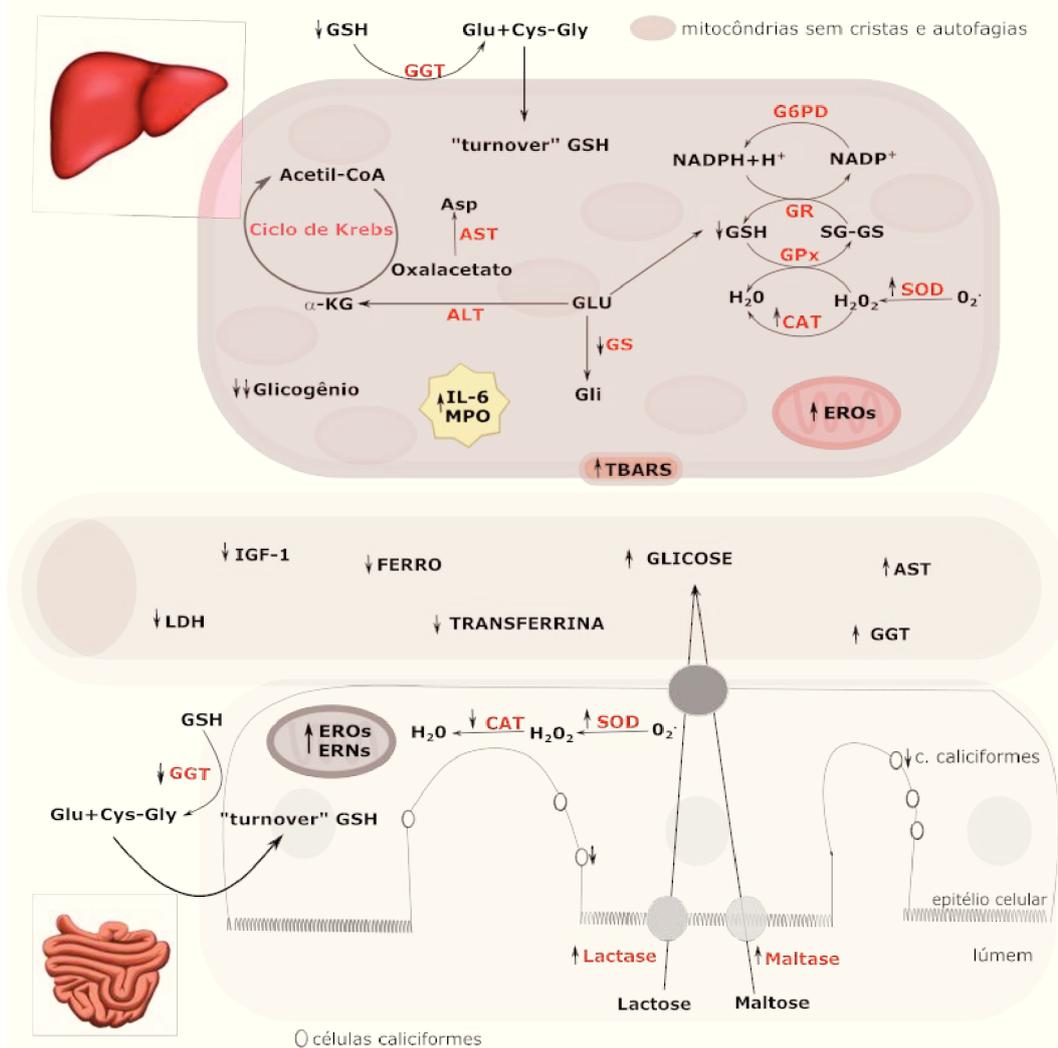
Analisando os resultados em conjunto, propõe-se que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e o aleitamento provoca danos ao TGI na prole, podendo ocasionar alterações metabólicas importantes na vida adulta. Mais estudos são necessários para compreender as consequências do uso nocivo de etanol pela mãe na saúde da prole, bem como o possível envolvimento do etanol no desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes em jovens, considerando-se as alterações na digestão de carboidratos, na glicemia e no conteúdo de glicogênio.

6.2.22. Conclusão Parcial

Com os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação está relacionada com a indução do estresse oxidativo, alteração no conteúdo de glicogênio hepático causando alterações metabólicas e histomorfológicas no fígado da prole, além do aumento de marcadores de dano hepático no sangue em filhotes de 21 dias de idade. Já no intestino mostrou alteração das dissacaridasas, indução do estresse oxidativo e alterações histomorfológicas. Propõe-se que os efeitos tóxicos do etanol não se

limitam ao cérebro, mas a todo o organismo, levando a alterações importantes em diferentes tecidos. Novos estudos serão necessários com o intuito de esclarecer a participação do trato gastrointestinal no desenvolvimento da SAF. Entretanto, os resultados do presente estudo abrem inúmeras perspectivas de trabalhos futuros.

Figura 38 - Mecanismo de toxicidade do etanol sobre o fígado, intestino e parâmetros sanguíneos de ratos de 21 dias de idade exposto ao etanol durante a prenhez e lactação.



Representação esquemática dos efeitos do etanol sobre o fígado, intestino e sangue de ratos imaturos expostos a essa toxina durante a prenhez e lactação. No fígado ocorreu uma diminuição na atividade da GS, indicando uma diminuição de glutamina, como também aumento na atividade da GGT (um marcador de dano hepático), sem alterar a atividade das aminotransferases (ALT e AST), além da indução de estresse oxidativo e uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio, como também aumento de mitocôndrias sem cristas e autofagia. No intestino

mostrou elevada atividade das dissacaridases (maltase e lactase) essas enzimas podem estar influenciando o aumento de glicose sanguínea, ocorreu uma diminuição na atividade da GGT e células caliciformes. Em parâmetros sanguíneos ocorreu uma diminuição de ferro, transferrina e LDH e também foi observado o aumento de GGT e aspartato aminotransferase (AST), quando extravasadas para o sangue essas enzimas são marcadores de dano hepático. A exposição materna ao etanol durante a prenhez e aleitamento leva a diversas alterações metabólicas e histomorfológicas importantes.

Fonte: do autor

6.3.PARTE III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A PRENHEZ E LACTAÇÃO SOBRE TESTÍCULOS DA PROLE

Características observadas em humanos que foram expostos ao etanol durante a gestação também foram encontradas em modelos de roedores, como retardo no crescimento, malformações físicas, anormalidades no SNC, problemas cognitivos e comportamentais (HAUSKNECHT et al., 2005; CALDWELL et al., 2008; HELLEMANS et al., 2008; KELLY et al., 2009).

Estudos utilizando modelos de roedores mostraram que a exposição pré-natal ao etanol tem efeitos adversos no desenvolvimento e atividade do sistema reprodutivo, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Como o etanol atravessa facilmente a placenta, este afeta diretamente o desenvolvimento dos órgãos e sistemas, incluindo o reprodutivo e o endócrino. As concentrações de testosterona, tanto nos períodos pré e pós-natal, são suprimidas nos fetos expostos ao etanol (MCGIVERN et al., 1993; WARD et al., 2003; LAN et al., 2013).

Embora haja diversos estudos demonstrando as características celulares e bioquímicas causadas pelo consumo do etanol em adultos, ainda não estão totalmente esclarecidos os efeitos induzidos pela exposição pré e pós-natal ao etanol no sistema reprodutivo masculino em desenvolvimento. Neste trabalho foram avaliadas as consequências da exposição materna ao etanol, durante a prenhez e aleitamento, sobre os testículos de ratos de 21 dias de idade. Com esse estudo pretende-se demonstrar que o consumo materno de etanol durante a prenhez e aleitamento pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de doenças do sistema reprodutor masculino. Cabe salientar que aos 21 dias de idade forma-se a barreira hemato-testicular, sendo este um período crítico para a maturação testicular e para o sucesso da espermatogênese, que acontecerá quando o animal for adulto.

Neste estudo empregou-se um modelo experimental de tratamento com exposição materna ao etanol. Foram utilizados testículos de ratos imaturos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez e aleitamento, onde foram determinados o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, as concentrações de EROs. Ainda, investigou-se a captação de ^{14}C -glutamato, a mensuração da atividade das enzimas AST e ALT com o intuito de se compreender o metabolismo do aminoácido glutamato.

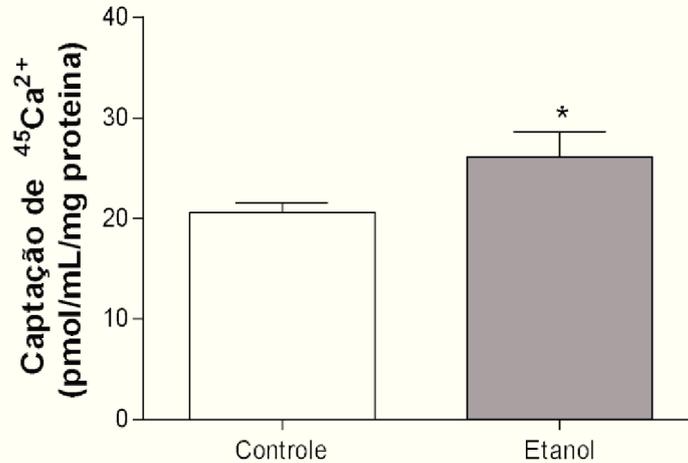
6.3.1. Objetivos específicos:

- Verificar o efeito do etanol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, a captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose e de ^{14}C -glutamato em fatias de testículo de ratos imaturos de 21 dias de idade;
- Investigar as consequências da exposição ao etanol na atividade da glutamina sintetase (GS), da ALT e AST;
- Verificar o efeito do etanol no conteúdo de TBARS e GSH e espécies reativas de oxigênio em testículo de ratos imaturos;
- Estudar o efeito do etanol na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em fatias de testículo de ratos imaturos;
- Sobre possíveis mudanças histológicas no tecido testicular dos ratos de 21 dias de idade.

6.3.2. Efeitos da exposição materna ao etanol sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos

Para investigar os efeitos da exposição materna ao etanol sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, porções de testículo foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 30 min. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol induz o aumento no influxo e acúmulo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após incubação com o radioisótopo no testículo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação (Figura 39).

Figura 39 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículo de ratos de 21 dias de idade.



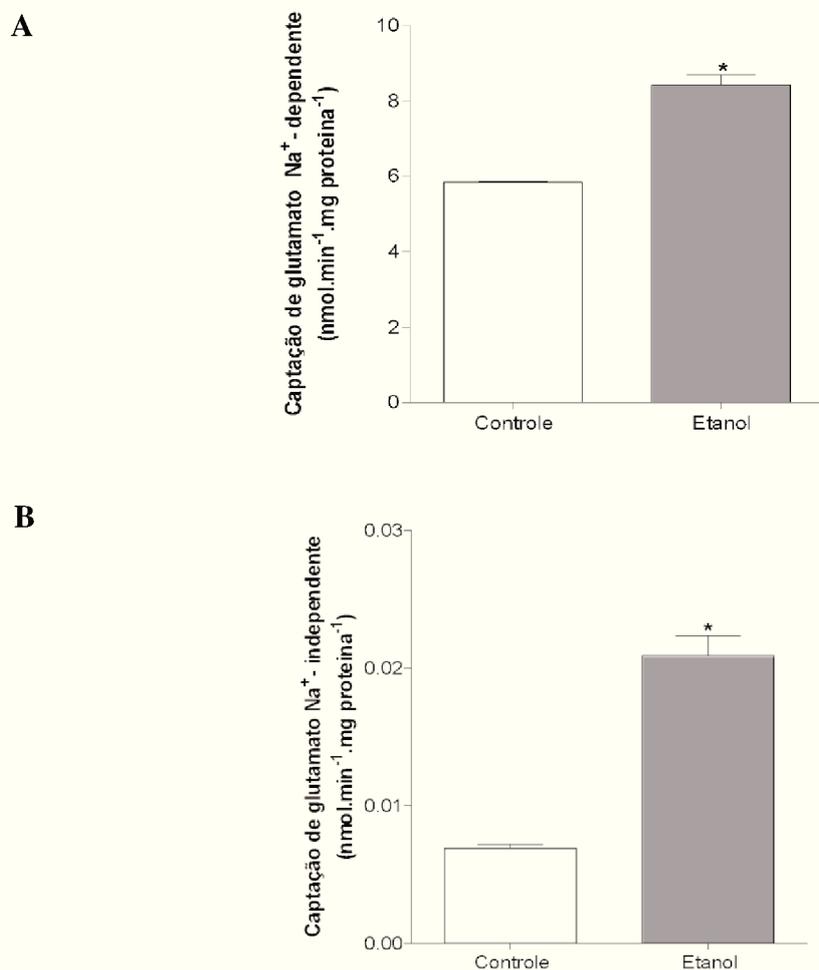
Testículos foram incubados por 30 min com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos em $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} \text{ mg de proteína}$. Análise estatística: Teste “t” de Student: $*p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.3.3. Alteração no sistema glutamatérgico em testículos de filhotes expostos ao etanol na prenhez e lactação

No intuito de investigar o envolvimento do glutamato nos efeitos induzidos pelo etanol sobre os testículos de ratos imaturos, foram realizados ensaios de captação de $[^{14}\text{C}]$ -glutamato. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol foi capaz de aumentar a captação de $[^{14}\text{C}]$ -glutamato dependente e independente de Na^+ em fatias de porções de testículos de filhotes de 21 dias de idade (Figura 40).

Figura 40 - Consequências da exposição materna ao etanol sobre a captação [^{14}C]-glutamato em testículos de ratos de 21 dias de idade.

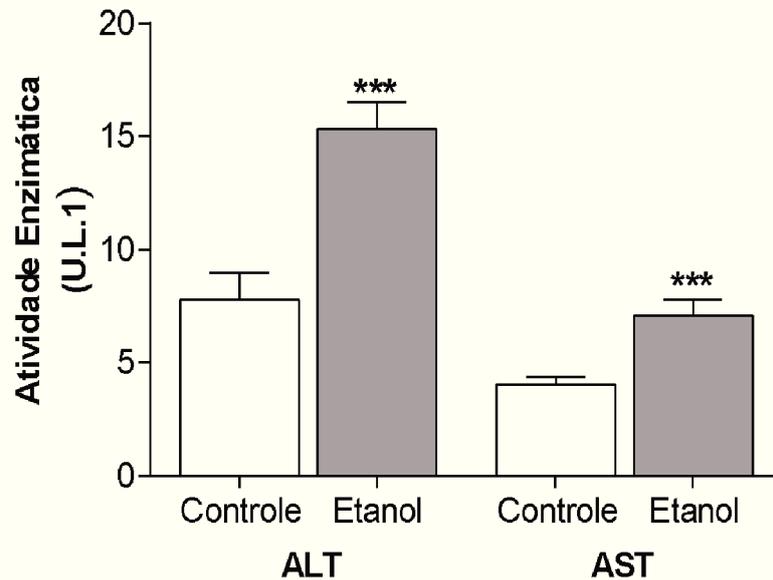


A captação foi iniciada com a adição de $0,33\ \mu\text{Ci}$ [^{14}C]-glutamato ao meio de incubação (10 min) e foi corrigida para a união não-específica em ensaios Captação de glutamato independente de Na^+ ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) Captação de Glutamato dependente de Na^+ ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ protein}^{-1}$) realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

A atividade das aminotransferases ALT e AST foi determinada com o intuito de verificar as consequências da exposição crônica ao etanol sobre as reações de transaminação nos testículos dos filhotes. Os resultados mostraram aumento na atividade da AST e ALT em testículo de filhotes expostos ao etanol na prenhez e lactação como demonstrado na figura 45.

Figura 41 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade das aminotransferases AST e ALT em testículos de ratos de 21 dias de idade.

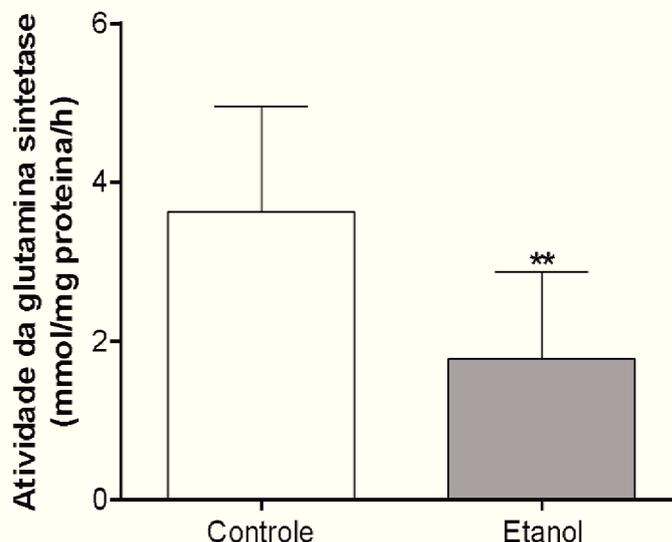


A atividade das aminotransferases foi mensurada no homogeneizado de testículo dos animais controles e tratados com 21 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: ***p < 0,001 comparado com o controle.

Fonte: do autor.

O glutamato extracelular captado através de transportadores específicos irá reagir com a amônia para formar glutamina em uma reação mediada pela enzima GS. Assim avaliamos a atividade da glutamina sintetase e os resultados demonstraram uma diminuição na atividade da GS no grupo exposto ao etanol durante a prenhez e lactação quando comparado como grupo controle (figura 42).

Figura 42 - Efeito da exposição materna ao etanol sobre a atividade da GS em testículos de ratos de 21 dias de idade.



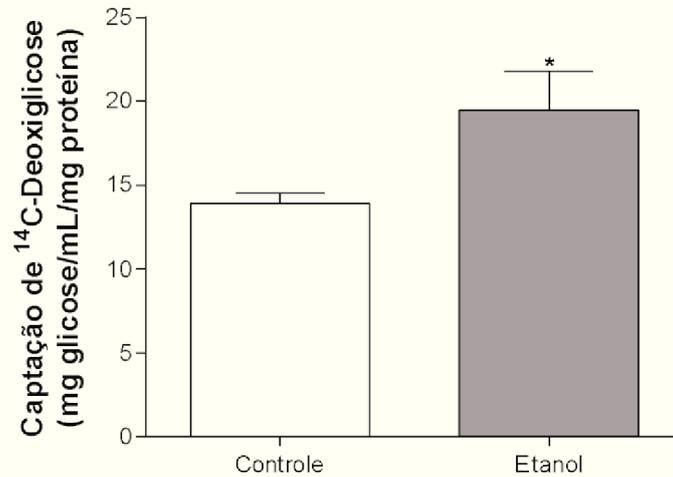
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: ** $p < 0,01$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.3.4. Consequências da exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação no metabolismo energético em testículos da prole

O metabolismo energético das células de sertoli envolve, principalmente, a entrada de glicose nestas células, essa etapa compreende a formação de piruvato por meio da glicólise, o qual pode ser transportado para a mitocôndria a fim de formar Acetil-CoA, ou ainda, ser convertido a lactato ou alanina. Assim, analisamos o envolvimento de possíveis alterações na captação de glicose e no conteúdo de glicogênio no efeito causado pelo etanol em testículos de filhotes de 21 dias expostos durante a prenhez e aleitamento. Os resultados mostraram que o etanol aumenta a captação de [14 C]-2-DG (figura 43) e o conteúdo de glicogênio (figura 44) em testículos de ratos de 21 dias de idade

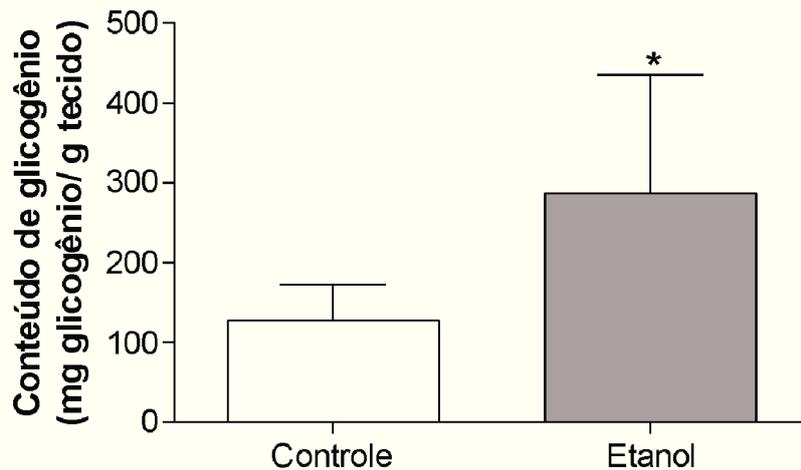
Figura 43 - Efeito do etanol sobre a atividade da captação de [^{14}C]-2-DG em testículos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na prenhez e amamentação.



Testículos foram incubados com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C]-2-DG durante 30 min. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

Figura 44 - Efeito do etanol sobre o conteúdo de glicogênio em testículos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol na prenhez e lactação.



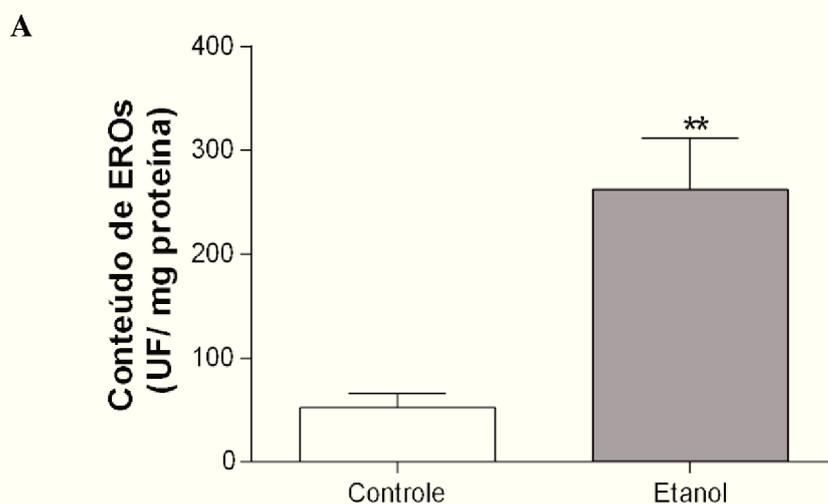
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

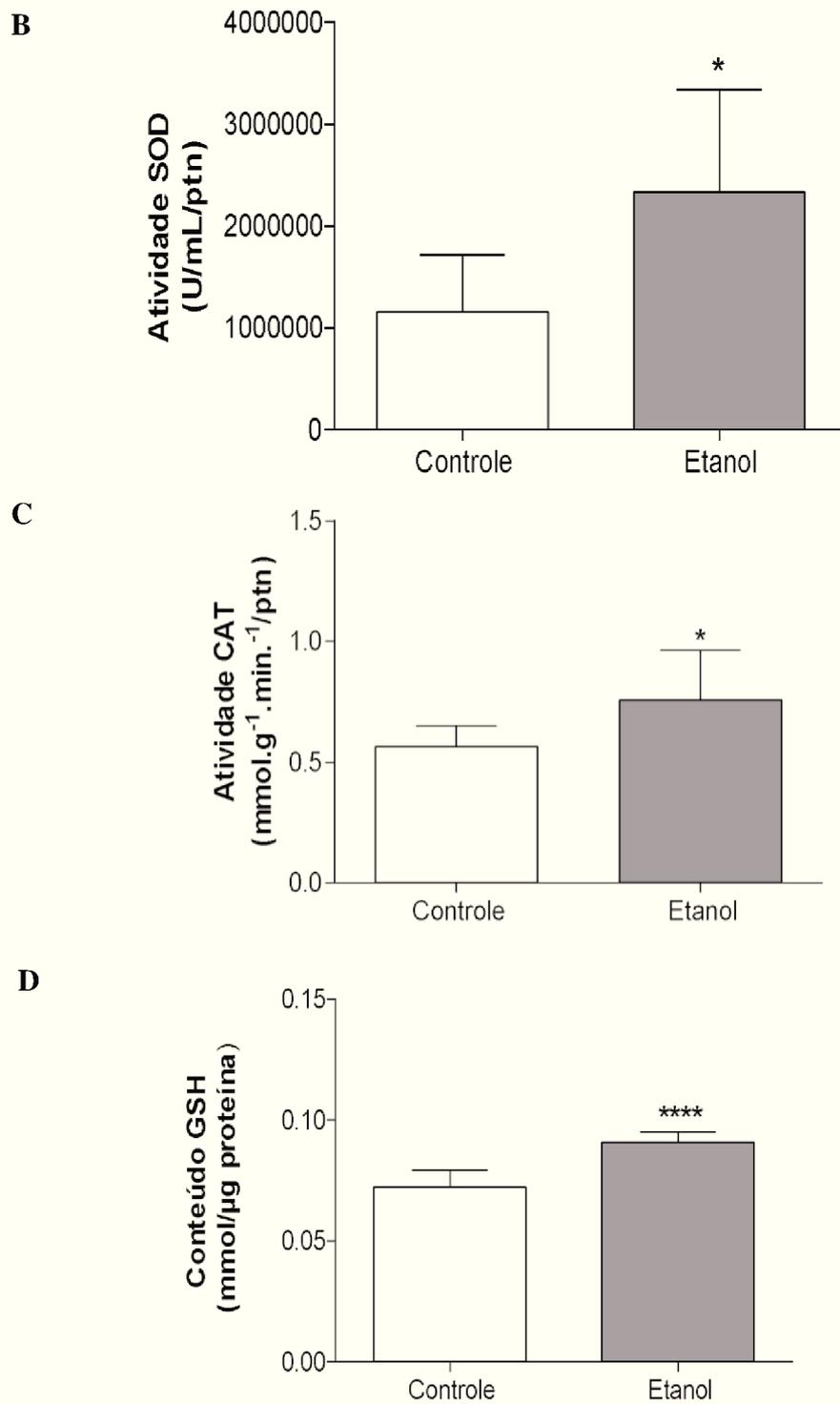
Fonte: do autor

6.3.5. Efeitos da exposição materna ao etanol na produção de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante em testículos de ratos imaturos

Investigou-se a exposição materna ao etanol na geração de EROs em testículos de ratos imaturos, utilizando-se uma sonda que na presença de espécies reativas de oxigênio torna-se fluorescente. Conforme demonstrado na figura 45A, houve um aumento significativo na formação de EROs nos testículos de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação ao etanol. Com o aumento na produção de EROs nos testículos da prole após exposição materna ao etanol, avaliou-se os efeitos dessa exposição sobre as defesas antioxidantes enzimáticas neste tecido. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol provoca o aumento na atividade da SOD e CAT, bem como no conteúdo de GSH nos testículos dos filhotes expostos ao etanol quando comparados ao controle (Figura 45B, C e D respectivamente).

Figura 45 - Efeitos da exposição materna ao etanol na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na atividade das enzimas: (B) superóxido dismutase (SOD) e (C) catalase (CAT) e (D) GSH em testículos de ratos imaturos.





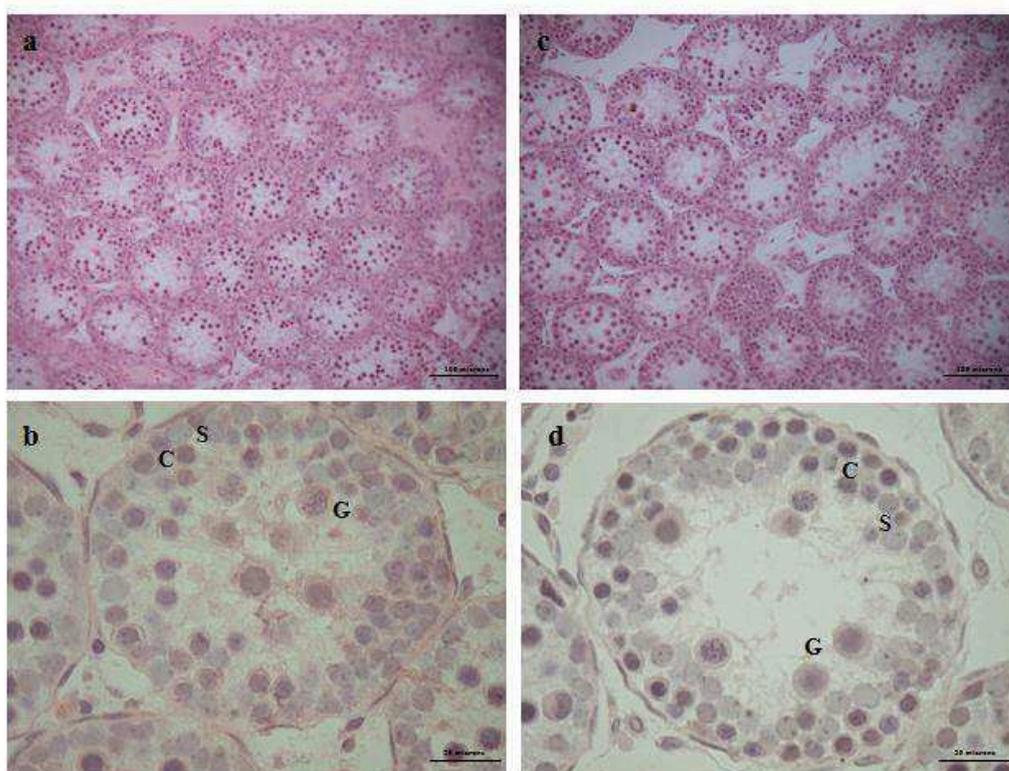
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste “t” de Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.3.6. Avaliação da histomorfologia testicular da prole exposta ao etanol durante a prenhez e lactação

Para avaliar a toxicidade do etanol na morfologia dos testículos de ratos imaturos após exposição durante a prenhez e lactação, cortes histológicos de ratos de 21 dias de idade foram corados com hematoxilina-eosina (Figura 46). Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol ocasiona alterações na organização e histoarquitetura das células testiculares. Observa-se na fotomicrografia um espaçamento maior entre os túbulos seminíferos no grupo tratado com etanol (figura 46c) quando comparado com o grupo controle (figura 46a) no aumento de 20X. Foi observado também alterações na maturação das células e no número de células presentes nos túbulos seminíferos (figura 46b e d) no aumento de 100X.

Figura 46 - Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao etanol na morfologia testicular de ratos imaturos.

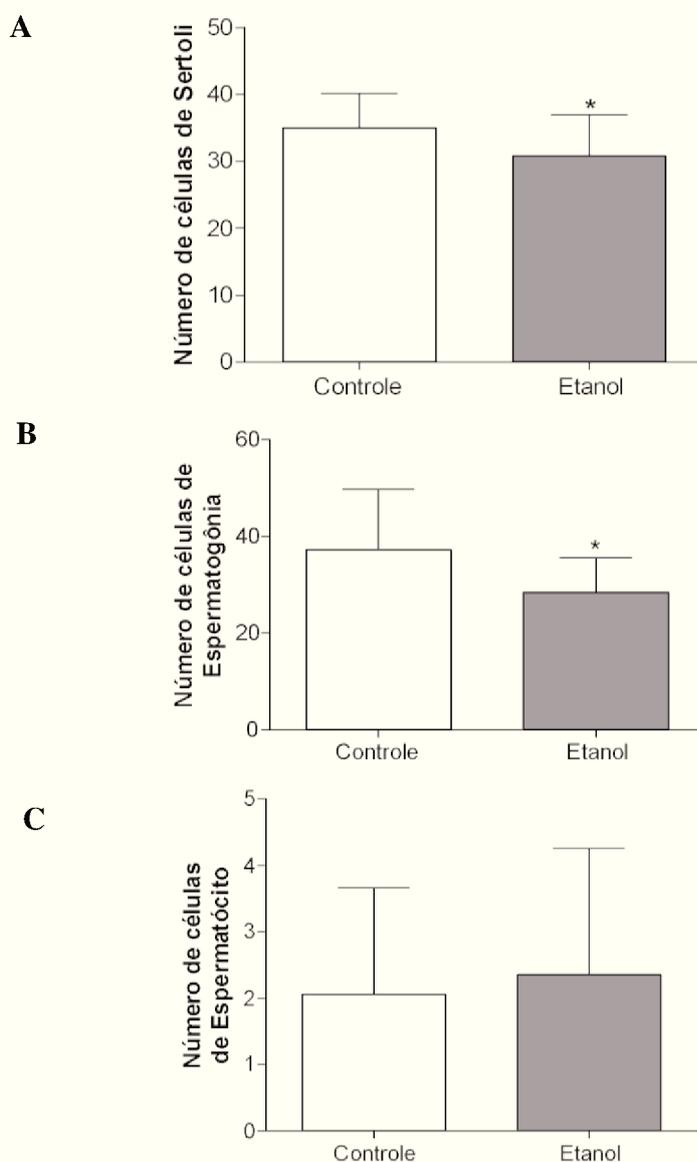


Microfotografias representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina de tecido testicular de ratos controles e expostos ao etanol durante a prenhez e o aleitamento. Figura a e c, representação do corte transversal dos testículos, destacando os túbulos seminíferos. Aumento = 20X (Barra = 100 μ m). Figura b e d, representação do corte do túbulo seminífero, destacando-se as células de sertoli (S), espermatogônias (G) e espermatócitos (C). Aumento = 100X (Barra = 20 μ m).

Fonte: do autor

Foi quantificado o número de células presentes no túbulo seminíferos, sendo separadas em células de Sertoli (S), espermatogônia (G) e espermatócitos (C) (figura 47). Os resultados demonstraram uma quantidade menor no número de células de Sertoli e espermatogônias (Figura 47A e B, respectivamente) mas não mostrou alteração no número de espermatócitos (Figura 47C).

Figura 47 - Efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação no número de células de Sertoli (A), espermatogônias (B) e espermatócitos (C) dos túbulos seminíferos de cortes histológicos de testículos de ratos imaturos.



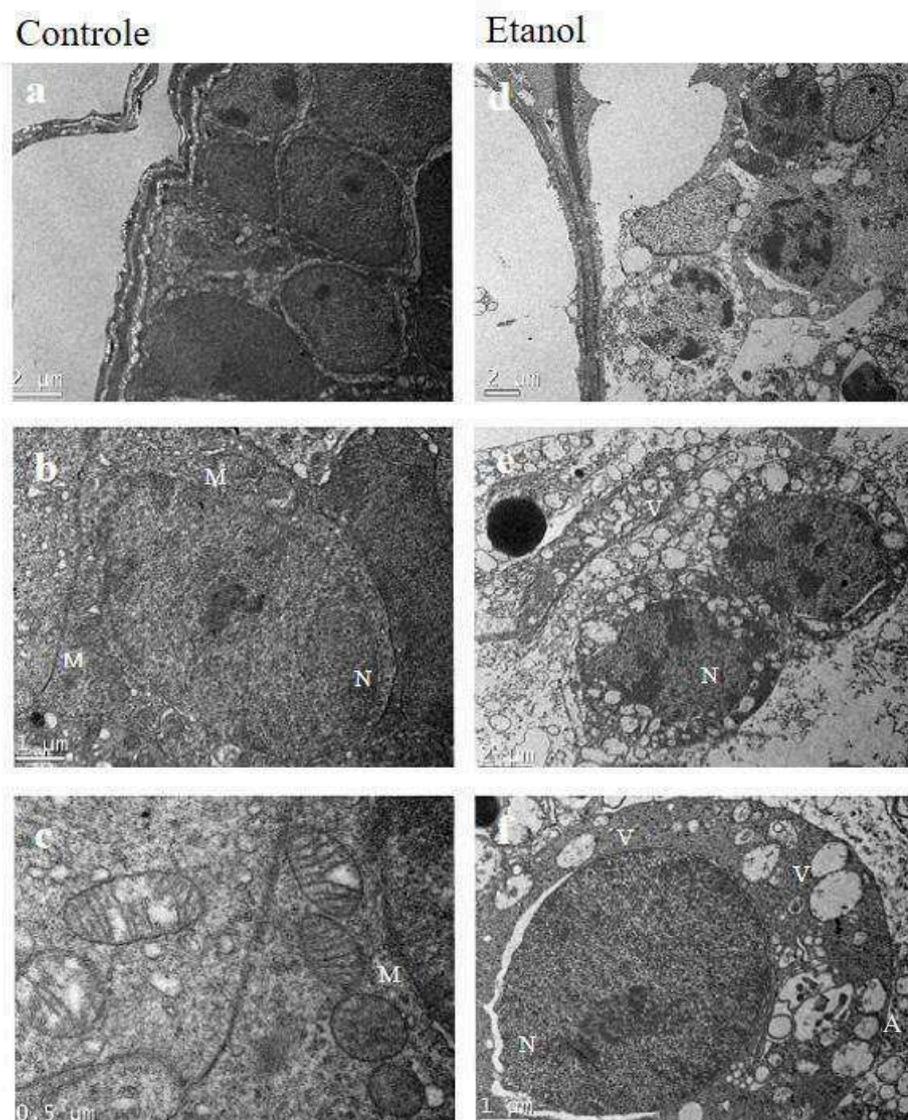
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste "t" de Student: * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.3.7. Análise das características microestruturais dos testículos de ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez e lactação por MET

A análise das imagens obtidas por MET dos testículos de animais controle, demonstrou células sem espaço intracelulares (figura 48a) citoplasma denso (figura 48b) e cristas mitocondriais definidas (Figura 48c). Por outro lado, as imagens de animais do grupo tratado apresentaram espaços intracelulares (Figura 48d), citoplasma com inúmeras vesículas e autofagia (Figura 48e e f), quando comparadas às imagens obtidas do grupo controle.

Figura 48 - Imagens representativas dos testículos de ratos imaturos expostos ou não ao etanol durante a prenhez e lactação obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.



Microscopias eletrônicas de transmissão dos testículos de ratos imaturos. Imagens obtidas dos testículos de animais controle (Figuras a, b e c) apresentaram células sem espaço intracelulares, citoplasma denso e cristas mitocondriais

definidas (Figura c). Imagens de animais do grupo tratado (Figuras d, e e f) apresentaram espaços intracelulares, inúmeras vesículas e dilatação da membrana nuclear (figura f). Núcleo (N), mitocôndrias (M), vesículas (V), autofagia (A).

Fonte: do autor

6.3.8. Discussão

A exposição fetal e perinatal ao etanol pode alterar as funções do sistema reprodutor. Estudos demonstram que a exposição materna ao etanol induz modificações em alguns parâmetros na vida adulta, como a diminuição da produção testicular de esteroides além da redução do peso dos testículos e diminuição no número de espermatozoides (FERMOSO et al., 1989; DAHLGREN et al., 1989). As características celulares e bioquímicas causadas pela exposição *in utero* ao etanol sobre o sistema reprodutivo ainda não estão bem definidas. O modelo experimental de exposição materna ao etanol proposto por nosso grupo mostrou alterações significativas no SNC da prole (CESCONETTO et al., 2016).

Nesse sentido, o presente estudo investigou os efeitos da indução desse mesmo modelo experimental sobre os testículos de ratos imaturos, com a finalidade de investigar os efeitos tóxicos, metabólicos e oxidativos do etanol sobre esse tecido através de abordagens experimentais como captação e metabolismo de glutamato e glicose, influxo de cálcio, atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo.

No presente estudo avaliou-se o influxo de cálcio nos testículos de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação. O cálcio é uma das principais moléculas sinalizadoras no ambiente intracelular. Vários processos celulares utilizam a via e sinalização de cálcio, como hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, para ativação de sistemas enzimáticos, modificações do citoesqueleto, reações do metabolismo intermediário celular, o transporte de açúcares e aminoácidos, proliferação celular, síntese de segundos mensageiros.

As concentrações de cálcio intracelular devem estar em equilíbrio, visto que elevadas concentrações intracelulares deste íon por um longo tempo ocasionam a morte celular (CLAPHAM, 1995; BERRIDGE et al., 2003; ZAMONER et al., 2005; 2007). Nossos resultados mostraram um aumento significativo no influxo de cálcio em fatias de testículo, com este aumento pode se sugerir morte celular, análises adicionais precisam ser realizadas para confirmar tal hipótese. Similar aos nossos resultados Farghali e colaboradores (1993), que demonstraram que em cultura de células de Sertoli tratadas com 500 mM de etanol, levou a um

aumento significativo de cálcio, sugerindo ainda que a molécula de etanol é a causadora deste aumento e não seus metabólitos.

Baseando-se na hipótese que o aumento de cálcio poderia estar causando morte celular, vários autores mostraram que o uso do etanol (agudo ou crônico) causa apoptose em testículo de adultos pela ativação de caspases efetoras e a via do receptor de morte Fas (ZHU et al., 2007; EID et al., 2001, 2002; HU et al., 2003). Estudos também demonstraram vacuolização das células de Sertoli, considerado como um marcador de lesão testicular induzida pelo etanol (ANDERSON et al., 1989; ZHU et al., 1997; EID et al., 2002), podendo resultar em atrofia testicular e infertilidade, sendo o etanol considerado uma toxina gonadal (ZHU et al., 2007).

Jana e colaboradores (2010) mostraram em seu estudo que o tratamento crônico com etanol resultou em apoptose de células germinativas na via de Fas, expressão p53, translocação do citocromo C e ativação da caspase-3, em associação com a geração de EROs. Shirpoor e colaboradores (2014), bem como Sem e colaboradores (2015) também mostraram em seus estudos com animais expostos ao etanol durante a prenhez e a lactação a indução de EROs através do aumento do nível de peroxidação lipídica e da atividade da enzima superóxido dismutase, com redução da atividade da catalase. Em nossos resultados foi observado o aumento na geração de EROs, na atividade da SOD e da CAT, bem como no conteúdo de GSH, indicando estresse oxidativo. Em conjunto, estes resultados sugerem que o consumo materno de etanol pode induzir prejuízos na função testicular em ratos imaturos.

Estudos mostram que nos testículos, o estresse oxidativo afeta a atividade reprodutiva, danifica a estrutura do DNA e induz a apoptose, levando a desequilíbrios da fertilidade ou distúrbios do desenvolvimento embrionário (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA et al., 2013; AGARWAL e ALLAMANENI, 2011; Makker et al., 2009).

Investigamos a captação de glutamato, a atividade das aminotransferase ALT e AST, a atividade da glutamina sintetase, bem como a captação de glicose nos testículos de ratos imaturos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação, visto que o glutamato é o principal aminoácido deste tecido, sendo importante para o metabolismo energético. No sêmen, o glutamato é encontrado principalmente no plasma seminal, necessitando de seus transportadores para atravessar a barreira hemato-testicular (LEE et al., 2011). O glutamato é um substrato para a formação de glutamina, catalisada pela enzima glutamato sintetase. A glutamina é o principal aminoácido do corpo e tem um papel importante na proliferação de vários tipos celulares (CSIBI et al., 2013). A atividade da glutamina sintetase foi avaliada para melhor entender o papel da glutamina no testículo de ratos expostos ao etanol, em nosso estudo

a sua atividade se mostrou diminuída, em células em processo de proliferação a glutamina é uma fonte de nitrogênio e uma fonte anaplerótica para fornecer metabólitos ao ciclo de Krebs.

Nossos resultados mostraram um aumento na captação de glutamato, assim como o aumento das aminotransferases ALT e AST e captação de glicose. A entrada de glicose nas células de Sertoli é importante para o metabolismo energético. Com a captação de glicose através de seus transportadores, ocorre a formação de piruvato por meio da glicólise, sendo este transportado para a mitocôndria formando Acetil-CoA, podendo também ser convertido a lactato ou alanina. O lactato é secretado pelas células de Sertoli e captado pelas células germinativas, onde será utilizado para síntese de ATP (ALVES et al., 2013).

A modulação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), é importante para a disponibilidade de lactato ou para a formação de alanina, sendo utilizada como um substrato energético pelas células de Sertoli ou podendo ser secretada nas células germinativas em desenvolvimento. Já a aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transaminação do aspartato em oxaloacetato, e alterações na sua atividade representam uma modulação na disponibilidade de substratos para o metabolismo energético (RATO et al., 2012). A formação do lactato é importante, pois este é o substrato energético principal para espermatócitos e espermátides e sua produção é uma das mais importantes funções das células de Sertoli. O aumento na produção de lactato corresponde a uma condição de diferenciação elevada das células de Sertoli e manutenção do desenvolvimento de células germinativas (RIERA et al., 2009).

O aumento do conteúdo de glicogênio observado em nosso estudo de exposição materna ao etanol, corroborando com resultados anteriores. A presença da atividade do glicogênio e do glicogênio fosforilase em células de Sertoli já foi relatado (SLAUGHTER e MEANS, 1983; LEIDERMAN e MANCINI, 1969). Esse aumento de glicogênio pode estar envolvido no metabolismo energético, seu acúmulo poder estar relacionado na conversão de glicogênio a glicose-6-fosfato em células testiculares de ratos imaturos expostos ao etanol.

Durante o desenvolvimento pós-natal, os túbulos seminíferos passam por alterações fisiológicas e morfológicas, incluindo a formação da barreira hemato-testicular, formação de lúmen tubular, produção de fluido seminífero e “maturação” de elementos citoesqueléticos em células de Sertoli e mióide (MALKOV et al., 1998).

Um marcador de desenvolvimento e maturação reprodutiva é a formação do lúmen no túbulo seminífero sólido. É relatado que a barreira hemato-testicular se forma nos túbulos praticamente nos dias 15 e 16 pós-natal em ratos, e que o lúmen dentro dos túbulos é tipicamente evidente no dia 18 pós-natal (RUSSELL et al., 1989).

Durante o período pré-puberal, os cordões seminíferos formam túbulos seminíferos, que são formados por espermatogônias. O desenvolvimento não prossegue além dessa fase até a puberdade, quando a produção de espermatozoides maduros é iniciada. Quando as espermatogônias imaturas sofrem mitose, algumas células-filhas perdem contato com a membrana basal do túbulo seminífero, sofrem alterações específicas do desenvolvimento e se diferenciam em espermatócitos primários, que entram na meiose. Estas células são caracterizadas por terem citoplasma abundante e grandes núcleos contendo grumos grosseiros ou fios finos de cromatina. Os espermatócitos secundários menores passam rapidamente pela segunda divisão meiótica e, portanto, são menos comumente vistos. Os gametas são produzidos após a segunda meiose e são chamados de espermátides (MALKOV et al., 1998).

Nossos resultados em testículos de ratos expostos ao etanol, com coloração de HE, mostraram maior espaçamento entre os túbulos seminíferos, maior espaço no lúmen, como também maior quantidade de células de Sertoli e espermatogônia, sem alteração significativa na quantidade de células de espermatócitos. Não foi quantificada nas células dos túbulos seminíferos os diferentes estágios de maturação, por difícil identificação.

Sem e colaboradores (2015) mostraram em seu estudo com ratos de 21 dias de idade expostos ao etanol durante a prenhez na concentração de 2 g/kg, que em fatias de testículos observou-se células gigantes multinucleadas, células degenerativas, túbulos atróficos e túbulos que prendem a maturação, enquanto que diminuiu o número de células de Leydig, Sertoli e espermatogênicas. Em outro estudo foi observado um volume e índice testicular diminuídos na puberdade para a idade adulta em ratos expostos ao etanol durante a prenhez. A coloração de HE mostrou que as regiões intersticiais entre os túbulos seminíferos foram aumentadas, similar ao nosso estudo (LIU et al., 2019).

Lan e colaboradores (2013), mostraram que filhotes de 18 e 20 dias pós-natal exposto ao etanol durante a prenhez, uma menor porcentagem de túbulos com lúmen aberto, menos espermatócitos primários por túbulo e uma redução marginal no número de espermátides arredondadas por túbulo em comparação ao grupo controle.

Estudos mostraram que a exposição materna ao etanol poderia induzir disfunção reprodutiva em homens adultos, tais como morfologia anormal de túbulos seminíferos, menor peso dos testículos e atraso da espermatogênese (LAN et al., 2013; FAKOYA e CAXTON-MARTINS, 2004). Yoshida e colaboradores (2009) e Lin e colaboradore (1995) relataram que o baixo nível de testosterona poderia levar à disfunção das células de Sertoli, o que pode ser um fator vital que contribui para o retardo da espermatogênese.

Ao avaliarmos as imagens obtidas pela metodologia de microscopia de transmissão, foi observado diferenças no citoplasma das células e nas mitocôndrias. O grupo exposto ao etanol durante a prenhez e aleitamento, mostrou espaços intracelulares, além de inúmeras vesículas, das quais não conseguimos identificar ao certo se essas vesículas eram mitocôndrias sem conteúdo interno, com perda das cristas e dilatação das membranas. Foi observado uma dilatação na membrana nuclear e vesículas autofágicas quando comparamos ao grupo controle, que demonstrou células sem espaço intracelular, citoplasma denso e mitocôndrias com cristas definidas.

Essas alterações observadas no grupo tratado, estão relacionadas com a exposição precoce ao etanol, já que a barreira hemato-testicular ainda não está formada, diminuindo assim o papel central das células de Sertoli (SCs) na sobrevivência de células germinativas, fertilidade e manutenção da homeostase testicular (OLIVEIRA et al., 2015).

Outros estudos encontraram em imagens de MET, dano mitocondrial aumentado e formação de vacúolos mitocôndrias em SCs de ratos tratados com etanol (EID et al., 2019; 2018; 2018; 2016; 2016). Eid e colaboradores (2019), mostraram que o aumento da mitofagia relacionada à via PINK1-Parkina em SCs de ratos tratados com etanol pode ser um mecanismo de proteção e ter implicações terapêuticas para a fertilidade masculina.

A exposição ao etanol em testículos de ratos imaturos causou o aumento de todos os parâmetros analisados neste estudo, podendo ser uma compensação para tentar manter os níveis adequados do metabolismo energético para a correta maturação das células de Sertoli, que são importantes para o desenvolvimento das células germinativas. Além de anormalidades testiculares, podendo estar envolvido no atraso de desenvolvimento correto de células testiculares.

Neste estudo, fornecemos evidências de que o consumo materno de etanol tem um efeito adverso direto sobre o desenvolvimento dos testículos em um modelo animal de exposição materna ao etanol. Nossos resultados fornecem informações sobre os mecanismos subjacentes às ações do etanol e apoiam um possível papel da exposição ao etanol em condições clínicas que envolvam alterações reprodutiva.

6.3.9. Conclusão Parcial

Conclui-se com os resultados obtidos no presente estudo, que a exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação está relacionada com a indução do estresse oxidativo,

aumento o influxo de glicose, glutamato e a atividade das aminotransferases, além de alterações histomorfológicas em testículos de ratos imaturos. Sugere-se que estas alterações influenciam o sistema reprodutor masculino na vida adulta acarretando em comprometimento da fertilidade masculina. Novos experimentos são necessários para esclarecer o envolvimento dessas alterações no comprometimento do sistema reprodutor masculino.

Figura 49 - Mecanismo de toxicidade do etanol testículo de ratos imaturos expostos ao etanol durante a gestação e lactação.

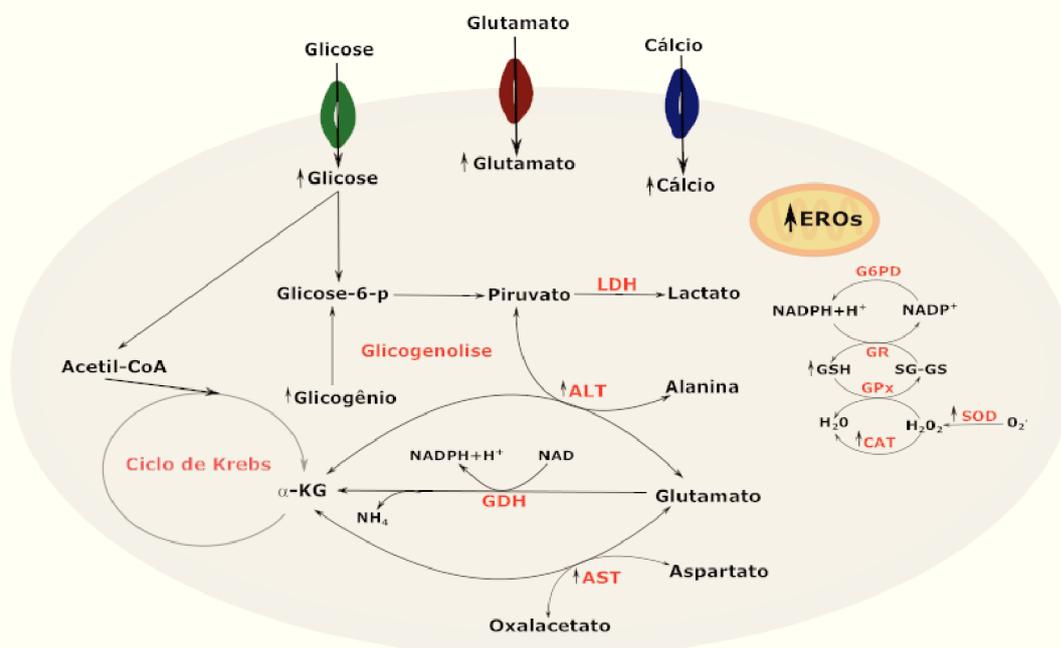


Figura representativa dos efeitos da exposição materna ao etanol em testículos de ratos imaturos. Foi observado o aumento do influxo de cálcio, glutamato e glicose em células testiculares, como também o aumento das aminotransferase, enzimas importantes para o metabolismo energético das células. A exposição materna ao etanol durante a prenhez e lactação leva a diversas alterações metabólicas importantes e a indução de EROs.

Fonte: do autor

6.4.PARTE IV: IMPACTOS DO ETANOL NAS CÉLULAS DE SERTOLI: CONSEQUÊNCIAS PARA A FERTILIDADE MASCULINA

O estudo dos impactos do uso de álcool sobre a saúde humana e a função reprodutiva permanece como um grande desafio. O uso abusivo de álcool tem sido associado a indução de toxicidade gonadal, que pode ser tanto direta, sobre células testiculares, ou indireta, afetando o hipotálamo e/ou pituitária (ZHU et al., 2007; PFLIEGER-BRUSS, et al., 2004 EID et al., 2002; VAN THIEL, 1983).

O álcool afeta diversas rotas metabólicas do sistema reprodutor masculino. Estudos já demonstram que o uso abusivo de álcool em adultos tem um efeito negativo em todos os fatores que influenciam a função reprodutiva masculina como: o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, glândulas endócrinas e secreção hormonal, podendo causar infertilidade masculina (EMANUELE et al., 2001). Nesse sentido, Zhu e colaboradores (2007) demonstraram que o etanol diminui a função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) como consequência de processo inflamatório desencadeado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. Os autores mostraram ainda, que a vitamina E foi capaz de proteger o eixo HHG por mecanismos anti-inflamatórios e/ou antioxidantes. Esses dados reforçam nossa hipótese de investigar o papel do estresse oxidativo nos mecanismos de toxicidade do etanol para o sistema reprodutor masculino.

No desenvolvimento testicular, ocorre uma combinação complexa de eventos envolvendo diferenciação, proliferação, migração e apoptose celular. No feto de ratos em desenvolvimento, há alterações morfológicas na gônada, ocorrendo a formação de cordões testiculares a partir do 13º dia de prenhez, onde as células germinativas são rodeadas por células de Sertoli (que continuam proliferando até a 3ª semana após o nascimento), sendo estas rodeadas por células mióides peritubulares. No período pós-nascimento, ocorre a mitose e os gonócitos migram a partir da posição central nos túbulos seminíferos em relação a membrana basal, sendo este processo necessário para o desenvolvimento dos gonócitos e espermatogônias. Esse desenvolvimento é um passo crítico para a espermatogênese em adultos (DE ROOI et al., 1998 Orth et al., 1988).

Estudos demonstraram que o uso crônico de álcool em animais levou a uma diminuição na produção de espermatozóides e de testosterona, além de atrofia testicular (VILLATA, et al, 1997; ADLER, 1992; VAN THIEL et al, 1983) O uso crônico de etanol é classicamente associado a hipogonadismo e feminilização em humanos e em modelos animais. Nesse

contexto, Van Thiel e colaboradores (1975) demonstraram, utilizando modelo animal, que o consumo crônico de álcool produz atrofia testicular, prostática e da vesícula seminal, associada a diminuição nas concentrações de testosterona. Os autores relatam ainda diminuição dos SET, resultante da perda de células germinativas. O mecanismo de toxicidade do etanol foi independente da restrição calórica associada ao uso do álcool, reforçando o papel desta substância como uma toxina para o sistema reprodutor. Apesar da toxicidade do etanol para o sistema reprodutor masculino ser conhecida há muito tempo, ainda se conhece muito pouco sobre os mecanismos envolvidos nos eventos tóxicos dessa molécula.

A exposição ao etanol em animais adultos também tem sido associada a indução de apoptose de células germinativas e comprometimento da função secretora de células de Sertoli (ZHU et al., 2000; 1997). Li e Kim (2003) demonstraram os efeitos tóxicos do etanol em testículos nos estágios fetal, pós-natal e em cultura organotípica. Eles demonstraram que no período pós-natal o etanol diminui o número de gonócitos via processos apoptóticos. Os autores concluíram que a toxicidade do etanol é variável dependendo do estágio do desenvolvimento testicular e da dose de etanol administrada. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos ainda não foram elucidados.

Este estudo foi realizado em Porto - Portugal no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto (ICBAS), durante o doutorado sanduíche com duração de 4 meses realizado no ano de 2017. Neste trabalho avaliou-se as consequências da exposição ao etanol em cultura de células de Sertoli (SCs) – linhagem SERW3. Com esse estudo pretendia-se demonstrar que o etanol pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de doenças do sistema reprodutor masculino.

Neste estudo foi usado um modelo experimental de cultura de SCs na linhagem SERW3, a diferentes concentrações de etanol (10 mM, 50 mM e 200 mM), durante 6 e 24 horas. Com o intuito de avaliar os danos causados pelo etanol em SCs, foram avaliados viabilidade celular, proliferação celular, toxicidade da membrana mitocondrial (por 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), sulforrodamina B (SRB), lactato desidrogenase (LDH) e potencial da membrana mitocondrial (JC-1), respectivamente. Ressonância magnética nuclear foi realizada no meio celular de cada grupo experimental para analisar a produção e consumo de alguns metabólitos e estabelecer um perfil metabólico.

6.4.1. Objetivos específicos

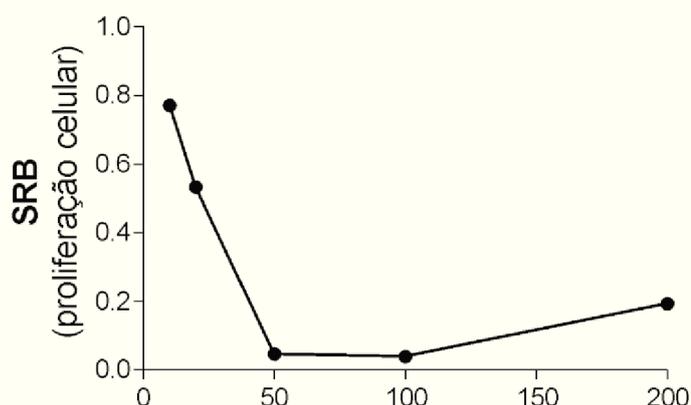
Estudar os impactos da exposição *in vitro* ao etanol sobre células de Sertoli em cultura (SCs) avaliando o impacto do etanol:

- Na viabilidade celular (SRB, LDH, MTT e JC1)
- No metabolismo celular por RMN e proteínas metabólicas envolvidas nesses processos (GLUTs, LDH e MCTs);
- Na bioenergética mitocondrial (LDH, complexo mitocondrial, MCT4).

6.4.2. Padronização da concentração de etanol nas células testiculares de sertoli

Para padronizar as concentrações para o tratamento das células, foi realizado uma curva de concentração com cinco condições, da qual foram selecionadas 3 concentrações com base nos ensaios de proliferação e citotoxicidade. Portanto, as células foram tratadas com concentrações crescentes de 10, 20, 50, 100, 200 mM, das quais foram escolhidas as concentrações de 10 mM, 50 mM e 200 mM (Figura 50).

Figura 50 – Proliferação celular em diferentes concentrações de etanol em cultura células de sertoli no tempo de 24 horas.



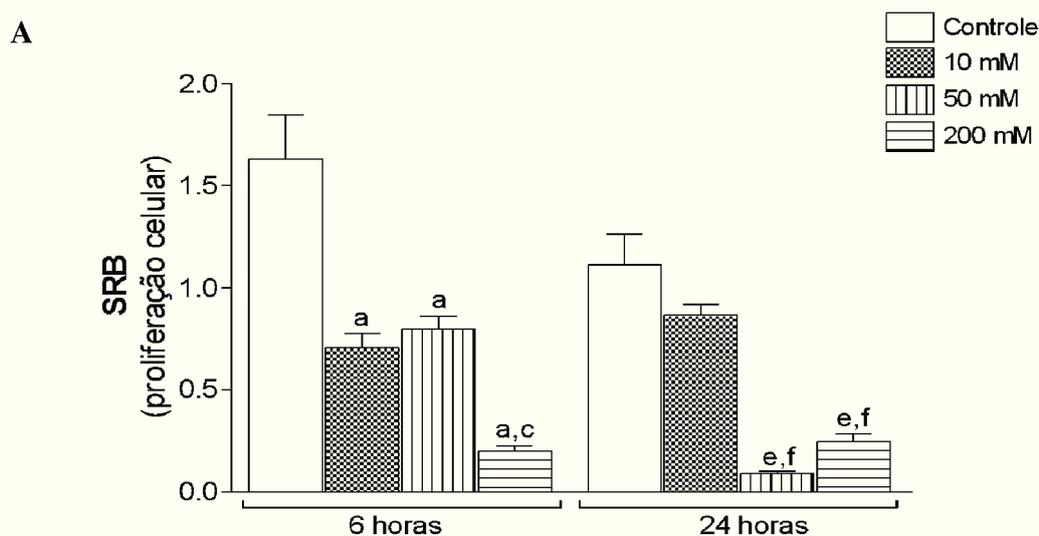
Perfil de crescimento foi avaliado através da densidade celular pelo ensaio SRB. As células foram semeadas em uma placa de 24 poços com diferentes concentrações (10, 20, 50, 100 e 200 mM) por 24 horas. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: one way ANOVA.

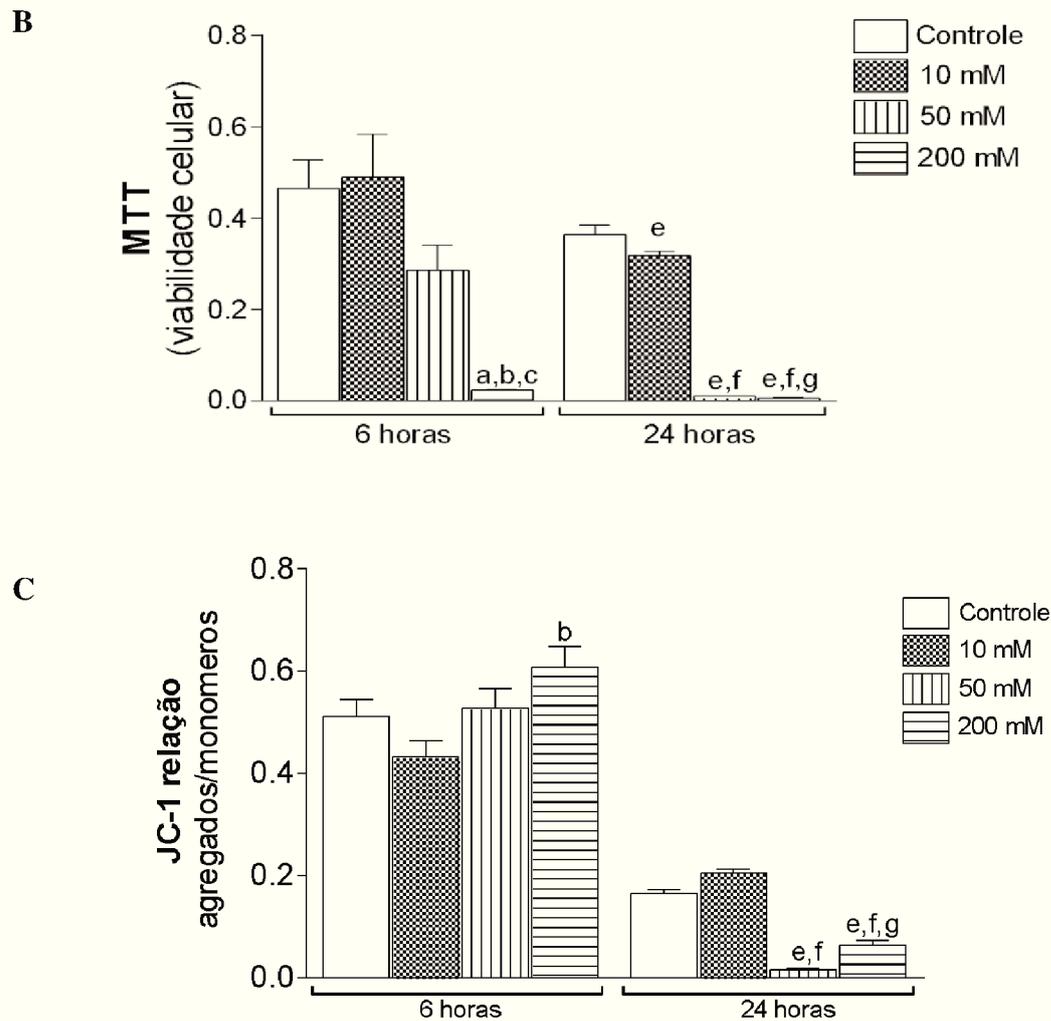
Fonte: do autor

6.4.3. Viabilidade celular nas células de sertoli expostas ao etanol em diferentes concentrações (10, 50 200 mM) no tempo de 6 e 24 horas

Para investigar os efeitos do etanol sobre a viabilidade celular, células de SCs (SERW3) foram expostas a concentrações 10 mM, 50 mM e 200 mM de etanol durante 6 e 24 horas. Os resultados demonstraram que a exposição ao etanol induz diminuição na proliferação celular pelo método de SRB nas doses de 10, 50 e 200 mM comparadas ao controle na exposição de 6 horas. Na exposição de 24 horas foi observado uma diminuição da proliferação celular nas concentrações de 50 e 20 mM comparadas ao controle e pela concentração de 10 mM (Figura 51A). Os resultados observados na viabilidade celular pelo método de MTT, mostrou uma diminuição somente na dose de 200 mM, na exposição de 6 horas, comparados ao controle e as outras concentrações, já no tempo de 24 horas a viabilidade diminuiu em todas as concentrações comparadas ao controle (Figura 51B). Quando analisado o potencial mitocondrial pelo teste de JC1, não foi observado nenhuma alteração quando comparado ao controle no tempo de 6 horas, na exposição com etanol durante 24 horas mostrou uma diminuição significativa nos tratamentos com 50 e 200 mM comparando com o grupo controle (Figura 51C).

Figura 51 – Efeitos da exposição de 6 e 24 horas em diferentes concentrações de etanol sobre a proliferação celular (A), viabilidade celular (B), e potencial mitocondrial (C).





A viabilidade celular dessa linhagem também foi determinada. A figura mostra dados agregados de experimentos independentes indicando variação de dobra de viabilidade celular. Os resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. ($n = 6$). As letras indicam os grupos e as comparações significativas onde a (controle/ 6 horas), b (10mM/6 horas), c (50mM/6 horas), d (200 mM/6 horas), e (controle/24 horas) f (10mM/24 horas), g (50mM/24 horas), h (200 mM/24 horas). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: one way ANOVA.

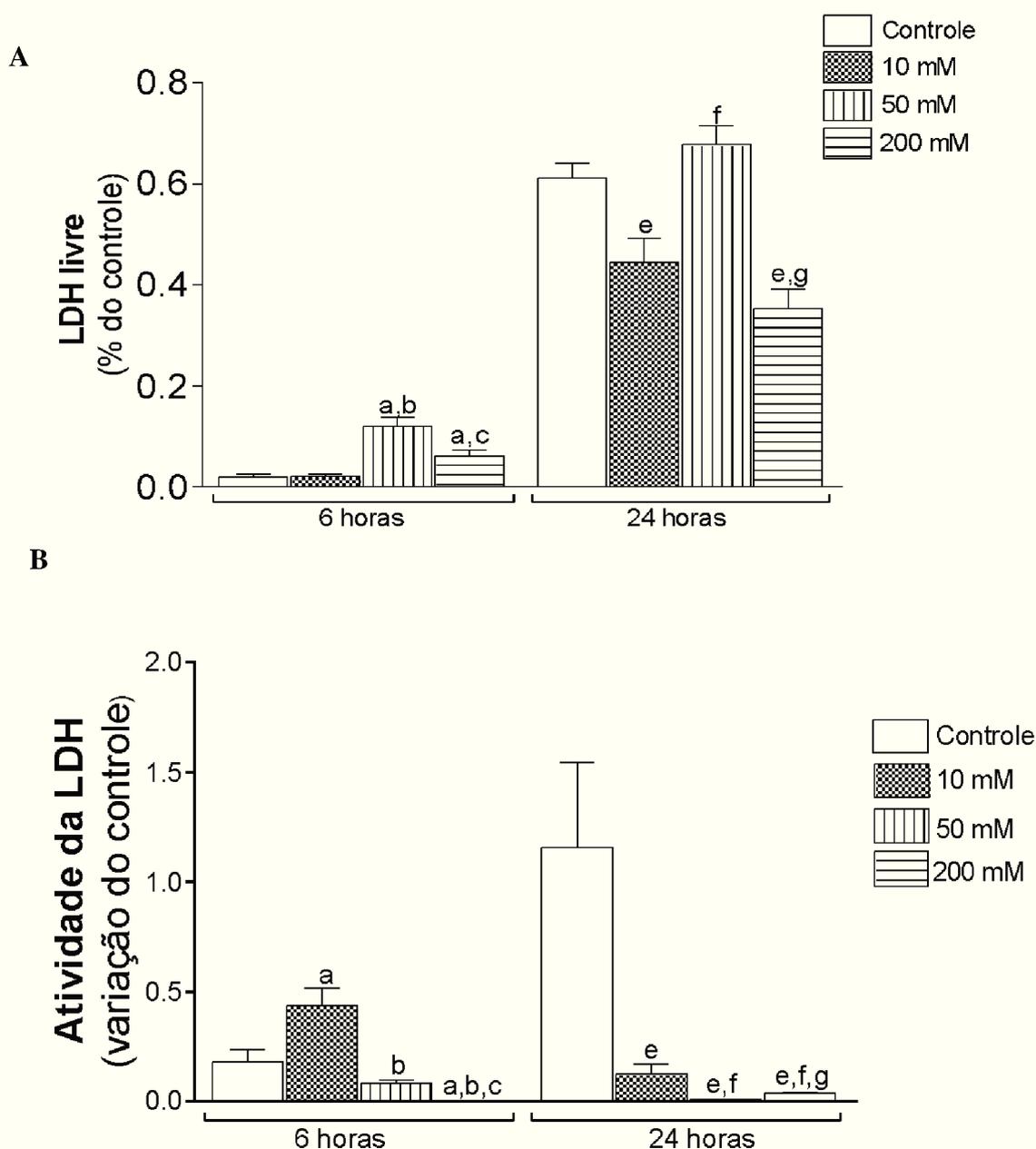
Fonte: do autor

6.4.4. Atividade da LDH no meio de cultura e em células de sertoli expostas ao etanol.

Ao avaliar a toxicidade da membrana pelo teste da LDH no meio de incubação das células, foi observado o aumento nas concentrações de 50 e 200 mM no tempo de 6 horas, no tempo de 24 horas foi observado uma diminuição nas doses de 10 e 200 mM quando comparado ao controle (Figura 57 A). Na atividade do lactato desidrogenase nas células expostas ao etanol,

os resultados demonstraram um aumento na dose de 10 mM e um diminuição significativa em 50 e 200 mM em relação ao controle no tempo de 6 horas. No tempo de exposição de 24 horas, foi observado uma diminuição significativa apenas nas concentrações de 10 e 200 mM em comparação ao controle (Figura 52B).

Figura 52 - Efeitos da exposição de 6 e 24 horas em diferentes concentrações de etanol sobre a toxicidade celular, analisado no meio de incubação (A) e nas células (B).



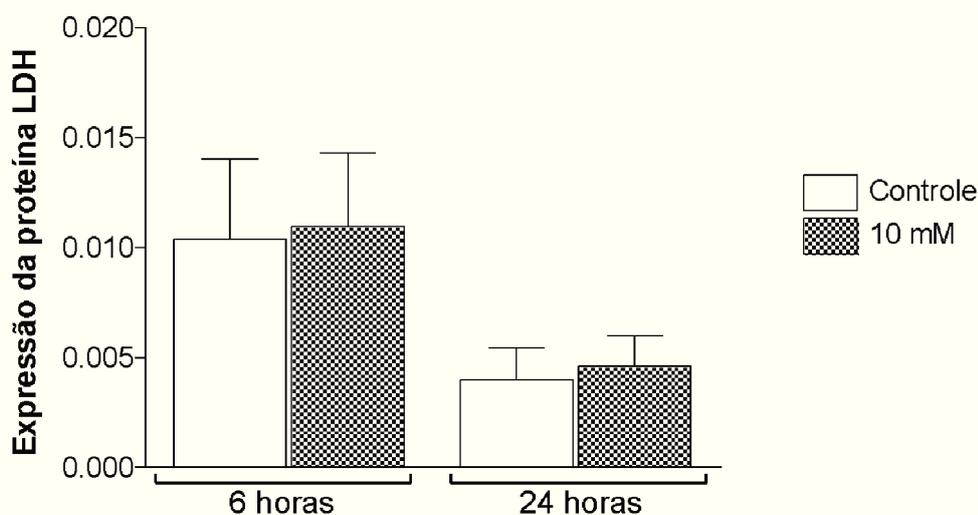
A toxicidade celular da linhagem celular também foram determinadas pelo método de LDH no meio de incubação e nas células. A figura mostra dados agregados de experimentos independentes indicando toxicidade celular. Os

resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. ($n = 6$). As letras indicam os grupos e as comparações significativas onde a (controle/ 6 horas), b (10mM/6 horas), c (50mM/6 horas), d (200 mM/6 horas), e (controle/24 horas) f (10mM/24 horas), g (50mM/24 horas), h (200 mM/24 horas). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: one way ANOVA.

Fonte: do autor

Para análises realizadas pelo método de western blot, foram utilizadas células expostas a concentração de 10 mM, foi realizado assim, pois as outras concentrações de etanol, não obtivemos quantidade de proteínas suficientes para seguir com os testes. A seguir, análises realizadas com a concentração de 10 mM no tempo de exposição de 6 e 24 horas. Foi avaliado a expressão da proteína LDH em células SERW3 de Sertoli (figura 53), onde não foi encontrado nenhuma diferença significativa entre controle e tratado 10 mM nos dois tempos (6 e 24 horas).

Figura 53 - Expressão da proteína LDH em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM de etanol em 6 e 24 horas.



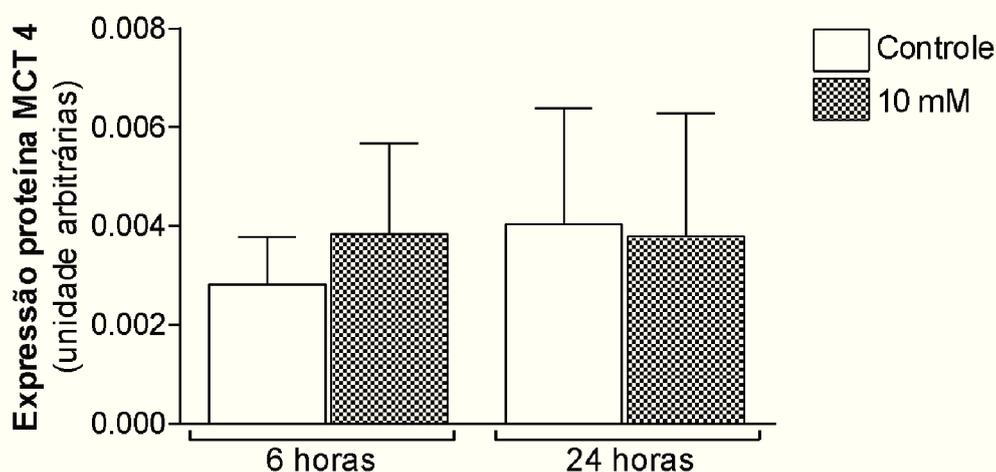
A figura mostra dados agregados de experimentos independentes indicando a expressão da proteína LDH na concentração de 10 mM em 6 e 24 horas por WB. Os resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise estatística: Teste “t” de Student.

Fonte: do autor

6.4.5. Efeito do etanol sobre os transportadores de monocarboxilatos em células de Sertoli

Avaliamos também a expressão da proteína MCT-4, (transportadores de monocarboxilatos, que facilitam o transporte de lactato dentro e fora das células), os resultados mostraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos e em diferentes tempos de exposição ao etanol (Figura 54).

Figura 54 - Expressão da proteína MCT-4 em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM de etanol em 6 e 24 horas.



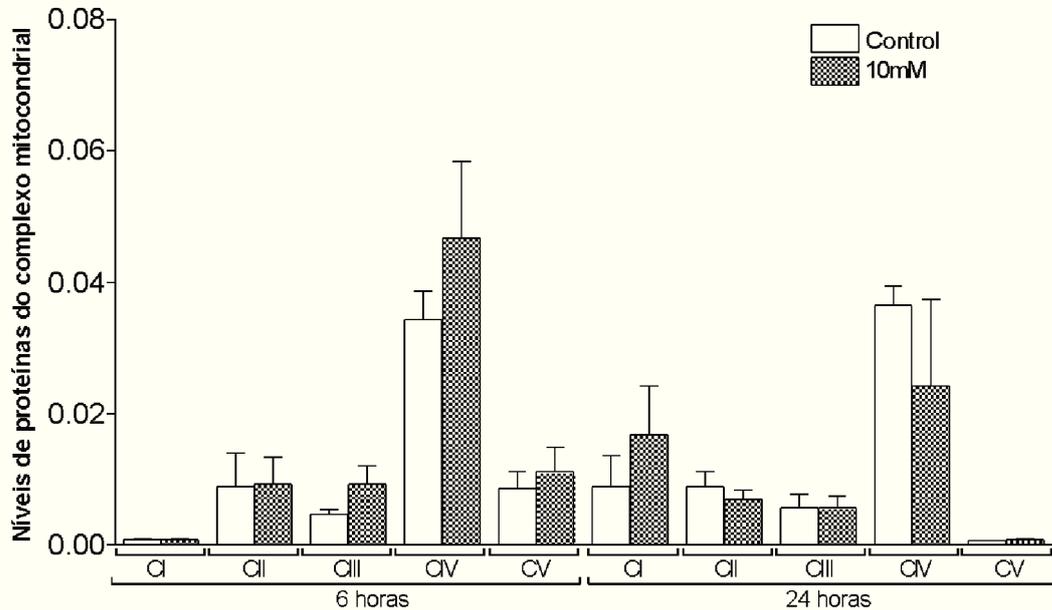
A figura mostra dados agregados de experimentos independentes indicando a expressão da proteína MCT4 na concentração de 10 mM em 6 e 24 horas por WB. Os resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: Teste "t" de Student.

Fonte: do autor

6.4.6. Função mitocondrial em células de sertoli expostas ao etanol.

A função mitocondrial é altamente dependente das atividades de várias enzimas mitocondriais, como a citrato sintase e as vias respiratórias complexos I a IV. Apesar de não haver diferenças significativas em ambos NADH redutase (complexo I), os succinato citocromo c redutase (complexo II-III), citocromo c oxidase (complexo IV) (figura 65).

Figura 55 – Representação da função mitocondrial pela expressão dos complexos (I, II, III, IV) em células de sertoli exposta as etanol na concentração de 10 mM em 6 e 24 horas.



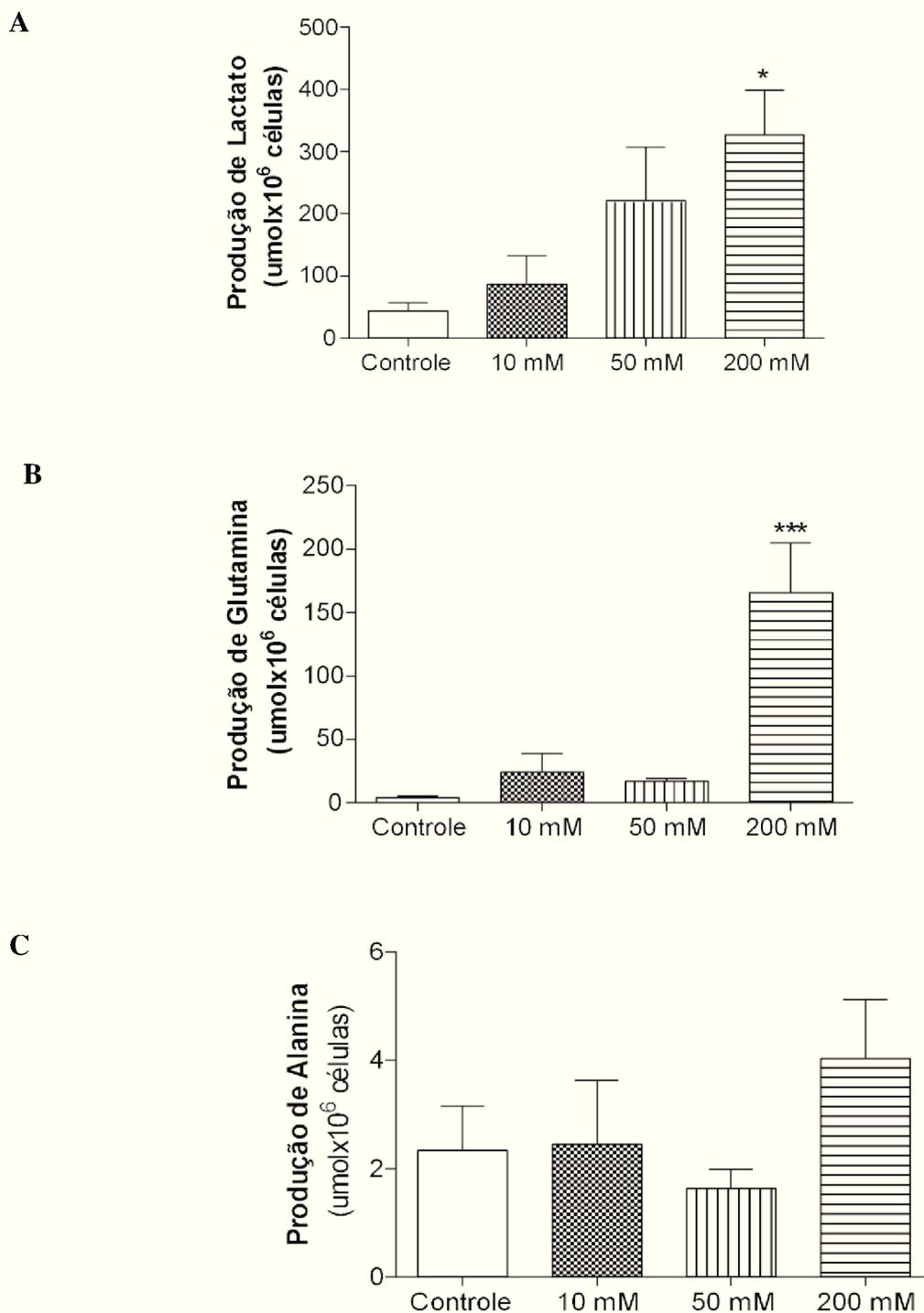
A figura mostra dados agregados de experimentos independentes indicando a expressão dos complexos mitocondriais (I, II, III, IV) na concentração de 10 mM em 6 e 24 horas por WB. Os resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: Teste “t” de Student.

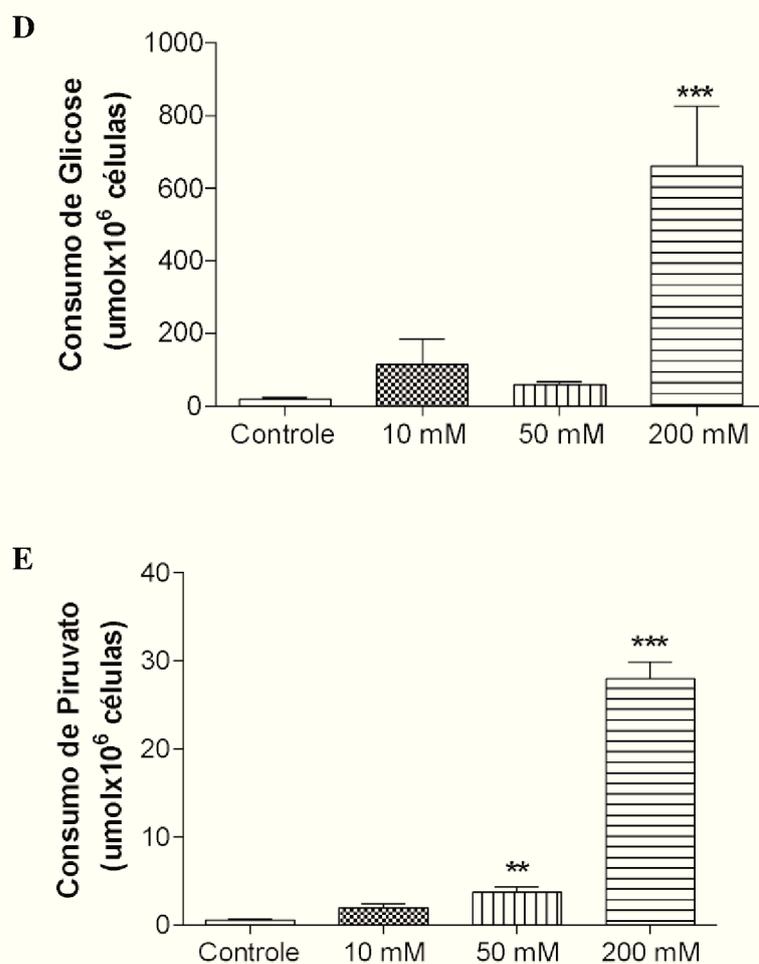
Fonte: do autor

6.4.7. Efeitos do etanol em células SERW3 em exposição de 24 horas sobre aminoácidos essenciais.

Avaliamos a produção de glutamina, alanina e lactato, assim como o consumo de piruvato e glicose, pelas células de sertoli da linhagem SERW3, com exposição ao etanol por 24 horas na concentração de 10, 50 e 200 mM. Os resultados mostraram um aumento da produção de lactato e glutamina na concentração de 200 mM, mas não alterou a produção de alanina (figura 56A, B e C, respectivamente). O consumo de glicose se mostrou elevado na concentração de 200 mM (figura 56D, mas o consumo de piruvato se mostrou aumentado nas concentrações de 50 e 200 mM (figura 56E), quando comparados ao grupo controle.

Figura 56 - Efeitos do etanol em células SERW3 expostas a concentração de 10 mM com tratamento de 24 horas em concentrações extracelulares de lactato, glutamina, alanina, glicose e piruvato.





Os efeitos do etanol em diferentes concentrações (10, 50 e 200 mM) em células de Sertoli SERW3 em diferentes parâmetros, expostas por 24 horas de tratamento. Experimentos mostram a produção de lactato, glutamina alanina (A, B e C, respectivamente) e consumo de glicose e piruvato (D e E). Os resultados foram obtidos por diferentes ensaios e são apresentados como média \pm E.P.M. (n = 6). Análise estatística: one way ANOVA. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.4.8. Discussão

A exposição ao etanol pode alterar as funções do sistema reprodutor. O modelo de tratamento com etanol *in vitro* é baseado na suplementação de meios de cultura com etanol puro. A suplementação no meio de cultura de células tem uma grande variedade de concentração de etanol, variando de 1 a 500 mM, umas das principais concentrações com o tratamento com álcool *in vitro*, são as concentrações acima de 100 mM, pois o etanol exerce

seu efeito citotóxica sobre as células (BAKER e KRAMER, 1999; LI et al., 1991). Em baixas concentrações (abaixo de 100 mM), o etanol aumenta a fluidez das células (DICKEY e FALLER, 2007; MOULIN et al., 2007), altera o estado redox e as junções intracelulares (DICKEY e FALLER, 2007; BANAN et al., 2000), aumenta a permeabilidade das células (CATALIOTO et al., 2009), e afeta a função celular (DONOHUE et al., 2006).

A exposição ao etanol também afeta negativamente a função secretora das células testiculares de Sertoli (ZHU e VAN THIEL, 1997) e perturba a barreira hemato-testicular formada pelas SCs (FARGHALI et al., 1991). As células de Sertoli desempenham um papel de apoio crucial na espermatogênese, fornecendo suporte físico, nutrientes e de sobrevivência, controlando a proliferação de células germinativas e a apoptose, necessária para uma espermatogênese bem-sucedida (HAI et al., 2014; EID et al., 2002). Nos testículos, a apoptose ocorre sob condições fisiológicas e proporciona evitar a superprodução de células normais e a maturação de células anormais. Sob condições patológicas, como uma exposição a toxinas ambientais específicas como o etanol, uma porção maior de células testiculares degenera através da apoptose, levando à insuficiência espermatogênica e infertilidade (BARTKER, 1995). No entanto, os mecanismos de infertilidade induzida por etanol permanecem pouco compreendidos.

Com isso, avaliamos a exposição ao etanol em diferentes concentrações (10, 50 e 200 mM), e dois tempos distintos (6 e 24 horas) em cultura de células testiculares de Sertoli da linhagem SERW3. Ao avaliar a proliferação celular, nossos resultados mostraram uma diminuição nas concentrações de 10, 50 e 200 mM nas 6 horas de exposição, e diminuiu as concentrações de 50 e 200 mM no tempo de 24 horas. Os resultados sobre o potencial metabólico mostraram uma diminuição significativa nas concentrações de 50 e 200 mM no tempo de 24 horas. Ao avaliar o lactato desidrogenase no meio de cultura, nossos resultados mostraram um aumento nas concentrações de 50 e 200 mM no meio de cultura na exposição de 6 horas, e uma diminuição encontrada na concentração de 10 e 200 mM de etanol no tempo de 24 horas de exposição. Sobre a viabilidade celular, na exposição de 6 horas ocorreu uma diminuição na concentração de 200 mM, já no tempo de 24 horas, todas as doses mostraram diminuição significativa comparando ao controle. Pourhassanali e colaboradores (2016), observaram que em cultura de células de Sertoli TM4 expostas por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de etanol, que a concentração de 160 mM diminuiu a viabilidade e a proliferação celular no tempo de 48 horas de exposição, mostrando que o etanol apresenta efeitos citotóxicos células de Sertoli. Nossos resultados mostraram que as maiores concentrações prejudicam as

células, diminuindo a viabilidade células e sua proliferação, assim com o potencial mitocondrial. A mitocôndria possui papel central na viabilidade e na morte celular, estando relacionada com a funcionalidade da célula espermática, principal fonte de energia para motilidade e homeostase celular (St. John, 2002).

Ao avaliar a atividade do lactato desidrogenase nas células, nossos resultados mostraram uma diminuição da atividade com 50 e 200 mM no tempo de 6 horas, e em todas as concentrações no tempo de 24 horas, sem alterar sua expressão na dose de 10 mM. Estudos mostram uma dependência incomum de glicose como fonte de energia para produzir lactato, em células de Sertoli, que é o substrato energético preferido para espermátócitos e espermátides (Grootegoed et al., 1986; MITA et al., 1982; Robinson e Fritz, 1981). Esses resultados corroboram com o aumento do consumo de glicose e o aumento na produção de lactato encontrado na concentração de 200 mM.

Depois do lactato ser produzido nas SCs, ele é exportado através do transportador específico de monocarboxilato (MCT4), para ser usado como combustível metabólico para o desenvolvimento de células germinativas. Os resultados não foram alterados na expressão do transportador de lactato, MCT4 na dose de 10 mM, assim como não alterou a expressão de nenhum dos complexos (I, II, III e IV) mitocondriais. Baseado no conjunto de resultados do nosso estudo, as maiores concentrações poderiam alterar positivamente a expressão do MCT4 e dos complexos, mais estudos precisam ser realizados para comprovar tal hipótese.

O metabolismo energético das células de Sertoli envolve principalmente a entrada de glicose nestas células, a qual gera piruvato através da glicólise, que pode ser transportado para a mitocôndria para formar Acetil-CoA, ou ser convertido a lactato ou a alanina. Nossos resultados mostraram um aumento da produção de glutamina, alanina e lactato. O lactato é secretado destas células e captado pelas células germinativas, onde será utilizado para síntese de ATP. No trato reprodutivo, o lactato também desempenha um importante papel modulando os níveis de NADPH. A atividade da alanina aminotransferase (ALT) desempenha papel importante para disponibilizar lactato (indiretamente) ou desviar o piruvato para formar alanina, e vice-versa. (ALVES *et al.*, 2012). Corroborando com os nossos resultados, foi observado um aumento no consumo de glicose e piruvato na concentração de 200 mM com exposição ao etanol por 24 horas. A exposição ao etanol em células de Sertoli na concentração de 200 mM ocasiona disfunção no metabolismo energético em exposição de 24 horas.

O conjunto dos resultados observados demonstra que o etanol altera o metabolismo energético das células em concentrações elevadas, assim como sua viabilidade, proliferação e

o potencial mitocondrial. Estudos adicionais precisam ser realizados para melhor compreender o envolvimento do etanol no metabolismo energético de células testiculares e na infertilidade masculina.

6.4.9. Conclusão Parcial

Conclui-se com os resultados obtidos no presente estudo, que a exposição ao etanol durante 24 horas, na maior concentração estudada (200 mM), está relacionada a alterações na viabilidade e proliferação celular, potencial mitocondrial assim como no metabolismo energético de células testiculares de Sertoli da linhagem SERW3. Estas alterações podem estar influenciando o sistema reprodutor masculino, comprometendo a fertilidade masculina. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade do etanol pode fornecer dados importantes, a partir dos quais possam ser elaboradas estratégias mais específicas com o intuito de prevenir casos de infertilidade masculina e auxiliar na recuperação de casos prevalentes dessa doença. Novos experimentos são necessários para esclarecer o envolvimento dessas alterações no comprometimento do sistema reprodutor masculino.

7. CONCLUSÃO

O uso nocivo de etanol durante a prenhez pode trazer sérias consequências ao desenvolvimento do feto, podendo levar a SAF, caracterizada por alterações cognitivas, comportamentais e morfofisiológicas. Embora essa síndrome tenha alta prevalência mundial, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia. Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a exposição materna ao etanol é capaz de induzir estresse oxidativo, alterar o metabolismo energético e induzir citotoxicidade a células hepáticas, intestinais e testiculares da prole aos 21 dias de idade.

As alterações observadas no TGI e no sangue dos ratos expostos ao etanol durante a prenhez e lactação sugerem alterações metabólicas e marcadores de toxicidade hepática importantes nesses tecidos. O aumento na glicemia e a indução na atividade das enzimas que digerem dissacarídeos sugerem um potencial papel da exposição materna ao etanol no desenvolvimento de síndrome metabólica e/ou diabetes quando os indivíduos forem adultos. Além disso, os resultados indicam claramente que a exposição indireta ao etanol (*in útero* e via leite materno) induz toxicidade importante sobre o fígado, o intestino e o sangue periférico de ratos.

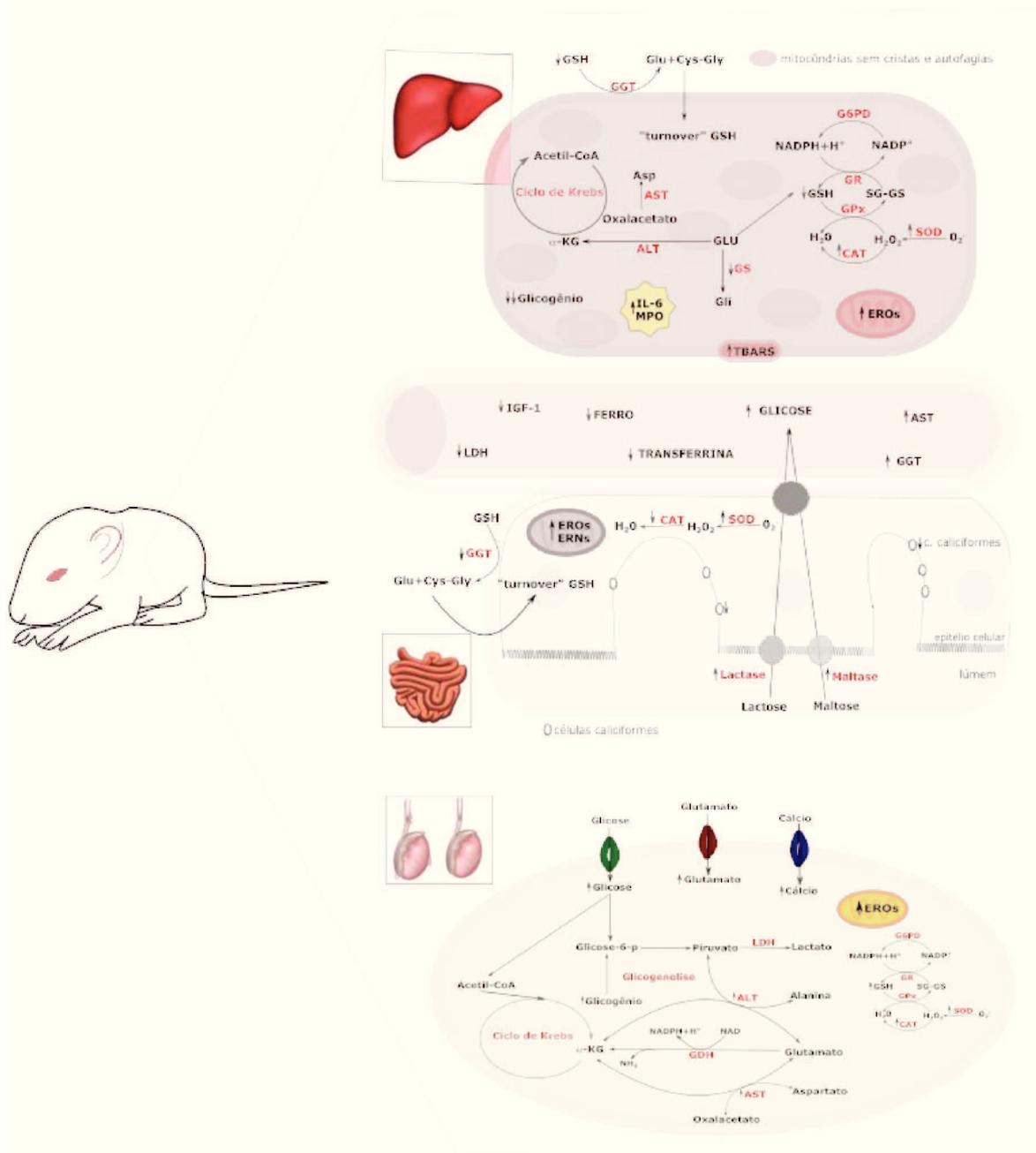
Assim como o SNC, que possui a barreira hematoencefálica, os testículos apresentam a barreira hematotesticular, que impede a passagem substâncias tóxicas para os túbulos seminíferos, com o intuito de proteger as células germinativas. Nesse sentido, assim como o encéfalo, os testículos são um tecido “protegido” da ação de substâncias exógenas. Entretanto, a exposição maternal ao etanol afetou diversos parâmetros metabólicos e oxidativos em células testiculares da prole indicando que os testículos são alvos importantes da toxicidade do etanol. Nesse tecido observou-se que o etanol induziu estresse oxidativo, estimulou o influxo e acúmulo de glicose intracelular, bem como afetou a captação e o metabolismo do glutamato, principal aminoácido encontrado nos testículos.

Além disso, foi observado em células testiculares de Sertoli em exposição *in vitro* em cultura de células, os efeitos do etanol prejudicando a viabilidade e proliferação celular e também o potencial mitocondrial. Altas concentrações de etanol alterou o metabolismo energéticos dessas células, essas alterações podem estar envolvidas na infertilidade masculina causada pelo consumo de bebidas alcoólicas em humanos.

Os efeitos da exposição materna ao etanol sobre as células intestinais, hepáticas e testiculares de ratos imaturos estão representados esquematicamente na Figura 62.

Novos experimentos são necessários para esclarecer o envolvimento das alterações bioquímicas e morfológicas observadas nos diferentes tecidos estudados e sua participação na fisiopatologia da SAF.

Figura 57. Os efeitos da exposição materna ao etanol sobre as células intestinais, hepáticas e testiculares de ratos imaturos.



Representação esquemática dos efeitos da exposição materna ao etanol sobre diferentes tecidos da prole.
 Fonte: do autor

PERSPECTIVAS

Metas para finalizar o estudo no fígado, intestino e sangue de filhotes expostos ao etanol durante a prenhez e lactação:

- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol sobre a morfologia do fígado e intestino através de técnicas histológicas de coloração e imunohistoquímica;
- Estudar o efeito do álcool sobre a digestão de carboidratos através da determinação da atividade da alfa-amilase em intestino de ratos imaturos;
- A digestão de proteínas através da determinação da atividade da tripsina, das aminopeptidases em intestino de ratos imaturos;
- Estudar os parâmetros analisados em filhotes na idade adulta.
- Redação e submissão de manuscrito para publicação.

Metas para finalizar o estudo no testículos de filhotes expostos ao etanol durante a prenhez e lactação:

- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol sobre a morfologia dos testículos através de técnicas de imunohistoquímica, com 21 e 60 dias de idade;
- Estudar os efeitos da exposição materna ao etanol nos testículos de ratos adultos;
- Verificar o efeito da exposição *in vitro* ao etanol durante a prenhez e o aleitamento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, ^{14}C -glicose e ^{14}C -glutamato em testículos de ratos imaturos de 21 dias de idade;
- Investigar as consequências da exposição *in vitro* ao etanol na atividade da glutamina sintetase (GS), da ALT, da AST, da G6PD e da GGT;
- Verificar o efeito do etanol *in vitro* na concentração de TBARS e GSH em testículos de ratos imaturos;
- Estudar o efeito da exposição ao etanol *in vitro* na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, em testículos de ratos imaturos;
- Realizar estudos da exposição ao etanol *in vitro* em testes de patch clamp.
- Redação e submissão de manuscrito para publicação.

REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, M.A.; BANERJEE, A.; JANG, S.; YOO, S.H.; YUN, J.W.; GONZALEZ, F.J.; et al. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 1238–1245, 2013.

ADARAMOYE, O. A.; ARISEKOLA, M. Kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, ameliorates ethanol-induced reproductive toxicity in male wistar rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 9-15, 2013.

ADEVA, M.M.; SOUTO, G.; BLANCO, N.; DONAPETRY, C. Ammonium metabolism in humans. **Metabolism**, v. 61, n. 11, p.1495-1511, 2012.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 234–254, 1984

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S. Free radicals and male reproduction, **J. IndianMed. Assoc**, v. 109, p. 184–187, 2011.

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

AHMED, H.; HANNAN, J.L.; APOLZAN, J.W.; OSIKOYA, O.; CUSHEN, S.C.; ROMERO, S.A.; GOULOPOULOU, S. A free-choice high-fat, high-sucrose diet induces hyperphagia, obesity, and cardiovascular dysfunction in female cycling and pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 316, n. 5, p. R472-R485, 2019.

ALIMOV, A.; WANG, H.; LIU, M.; FRAN, J.A.; XU, M.; OU, X.; LUO, J. Expression of autophagy and UPR genes in the developing brain during ethanol-sensitive and resistant periods. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, p. 667–676, 2013.

ALLAN, A.M.; CHYNOWETH, J.; TYLER, L.A.; CALDWELL, K.K. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 27, p. 2009–2016, 2003.

ALVES, M.; OLIVEIRA, P.J.; CARVALHO, R.A. Substrate selection in hearts subjected to ischemia/reperfusion: role of cardioplegic solutions and gender. **NMR Biomed**, v, 24, p. 1029–1037, 2011.

ALVES, M.G.; RATO, L.; CARVALHO, R.A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 5, p. 777-93, 2013.

AMBADE, A.; MANDREKAR, P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. **International Journal of Hepatology**, v. 2012, 2012.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Revised breastfeeding recommendations. 2005
acesso: <http://www.aap.org/advocacy/releases/feb05breastfeeding.htm> .

ANDERSON, R. A. JR.; BERRYMAN, S. H.; PHILLIPS, J. F.; FEATHERGILL, K. A.; ZANEVELD, L. J.; RUSSELL, L. D. Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: apparent lack of Leydig cell involvement. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 100, p. 62–85, 1989.

ANDREWS, N. C. Forging a field: The golden age of iron biology. **Blood**, v. 112, p.219–230, 2008.

ARCHIBALD, S. L.; FENNEMA-NOTESTINE, C.; GAMST, A.; RILEY, E. P.; MATTSON, S. N.; JERNIGAN, T. L. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. **Developmental Medical and Child Neurology**, v. 43, n. 3, p. 148-154, mar/2001.

ARCO, M.; SARTOR, T.; CABRERA, R.; SOSA, M. A. Prolonged ethanol ingestion decreases alpha-mannosidase activity and induces its redistribution to the fluid phase in rat cauda epididymis. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 49, n. 6, p. 953–957, 2003.

ARDAWI, M. S. M. Glutamine-synthesizing activity in lungs of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. **Biochemical Journal**, v. 270, p. 829-32, 1990.

AROOR, A. R.; JACKSON, D. J.; SHUKLA, S. D. Elevated activation of ERK-1 and ERK-2 accompany enhanced liver injury following alcohol binge in chronically ethanol fed rats. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 35, n. 12, p. 2128–2138, 2011.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of comensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 411–420, 2008.

ATKINSON, K.J.; RAO, R.K. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. G1280-G1288, 2001.

Autti-Ramo, I.; Granstrom, M.L. The effect of intrauterine alcohol exposition in various durations on early cognitive development. **Neuropediatrics**, v. 22, p. 203–210, 1991.

BAILEY, S. M.; PATEL, V. B.; YOUNG, T. A.; ASAYAMA, K.; CUNNINGHAM, C. C. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, p. 726-733, 2001.

BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. Appendix 1: selected normative data. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. *Biology and diseases. The laboratory rat. I*. New York: Academic Press; p. 411, 1979.

BAKER, R.C.; KRAMER, R.E. Cytotoxicity of short-chain alcohols. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 127-150, 1999.

BALÁZS, R. Control of glutamate oxidation in brain and liver mitochondrial systems, **Biochemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 497–508, 1965.

BANAN, A.; CHOUDHARY, S.; ZHANG, Y.; FIELDS, J.Z.; KESHAVARZIAN, A. Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: role of the microtubule cytoskeleton. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 727–738, 2000.

BANAN, A.; FIELDS, J.Z.; DECKER, H.; ZHANG, Y.; KESHAVARZIAN, A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 294(3), p. 997–1008. 2000.

BANAN, A.; FIELDS, J.Z.; ZHANG, Y.; KESHAVARZIAN, A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280(6), p.1234–46, 2001.

BANAN, A.; CHOUDHARY, S.; ZHANG, Y.; FIELDS, J.Z.; KESHAVARZIAN, A. Ethanol-Induced Barrier Dysfunction and Its Prevention by Growth Factors in Human Intestinal Monolayers: Evidence for Oxidative and Cytoskeletal Mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 3, p. 1075-1085, 1999.

BANNISTER, P.; LOSOWSKY, M. S. Ethanol and hypogonadism. **Alcohol and Alcoholism**, v. 22, p. 213-217, 1987.

BARRY, J.; GWRISH, K.; DIRECT, N.M.R. Evidence for ethanol binding to the lipidwater interface of phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v. 33, p. 882–888, 1994.

BARTKE, A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon? **Endocrinology**, v. 136, p. 3–4, 1995.

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

BEIER, J. I.; MCCLAIN, J. C. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 391, n. 11, p. 1249–1264, 2010.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Review Molecular Cellular Biology**, v. 4, p 517-529, 2003.

BERTRAND, C.; VALET, P.; CASTAN-LAURELL, I. Apelin and energy metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1-5, 2015.

BERTRAND, J.; FLOYD, L. L.; WEBER, M. K. Fetal Alcohol Syndrome Prevention Team, division of Birth defects and developmental disabilities, national center on Birth defects and developmental disabilities, centers for disease control and Prevention (CDC). Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Recommendations and Reports**, v. 54, n. 11, p. 1-14, 2005.

BERTRAND, J.; FLOYD, R.L.; WEBER, M.K. Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. **MMWR Recomm Rep**, v. 54, p. 1-12, 2005.

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

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, n. 1, p. 105–110, 1984.

BOGGAN, W. O.; RANDALL, C. M.; DEBEUKELAER, M.; SMITH, R. Renal anomalies in mice prenatally exposed to ethanol. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 23, p. 127–142, 1979.

BOVERIS, A.F.; FRAGA, C.G.; VARSARSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increases chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 277, p. 534–541, 1983.

BUFFUM J. Pharmacosexology: the effects of drugs on sexual function a review. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 14, p. 5–44, 1983.

BUKOWSKA, B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 135, n.4, p. 435–441, 2003.

BUNOUT, D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. **Nutrition**, v. 15, p. 583–589, 1999.

BUNOUT, D.; PETERMANN, M.; BRAVO, M.; KELLY, M.; HIRSCH, S.; UGARTE, G.; ITURRIAGA, H. Glucose turnover rate and peripheral insulin sensitivity in alcoholic patients without liver damage. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 33, p. 31–38, 1989.

BURD, J.F.; USATEGUI-GOMEZ, M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 46, n. 3, p. 223–7, 1973.

BURD, L.; CARLSON, C.; KERBESHIAN, J. Fetal alcohol spectrum disorders and mental illness. **International Journal on Disability and Human Development**, v. 6, p.383–396, 2007a.

BURD, L.; KLUG, M.; MARTSOLF, J.; KERBESHIAN, J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 697–705, 2003.

BURD, L.; ROBERTS, D.; OLSON, M.; ODENDAAL, H. Ethanol and the placenta: a review. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 20, n. 5, p. 361–7, 2007.

BURD, L.; DEAL, E.; RIOS, R.; ADICKES, E.; WYNNE, J.; KLUG, M. G. Congenital heart defects and fetal alcohol spectrum disorders. **Congenital Heart Disease**, v. 2, p. 250–255, 2007b.

BYRNES, M.L.; RICHARDSON, D.P.; BRIEN, J.F.; REYNOLDS, J.N.; DRINGENBERG, H.C. Spatial acquisition in the Morris water maze and hippocampal long-term potentiation in the adult guinea pig following brain growth spurt prenatal ethanol exposure. **Neurotoxicology Teratology**, v. 26, p. 543–551, 2004.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CALDWELL, K. K.; SHEEMA, S.; PAZ, R. D.; SAMUDIO-RUIZ, S. L.; LAUGHLIN, M. H.; SPENCE, N. E.; ROEHLK, M. J.; ALCON, S. N.; ALLAN, A. M. Fetal alcohol spectrum disorder-associated depression: evidence for reductions in the levels of brain-derived neurotrophic factor in a mouse model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, p. 614–624, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n.-, p. 15-25, 2013.

CARTER, R.C.; JACOBSON, S.W.; MOLTENO, C.D.; JACOBSON, J.L. Fetal alcohol exposure, iron-deficiency anemia, and infant growth. **Pediatrics**, v. 120, p. 559–567, 2007.

CASTELLS, S.; MARK, E.; ABACI, F.; SCHWARTZ, E. Growth retardation in fetal alcohol syndrome. Unresponsiveness to growth-promoting hormones. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, p. 232–241, 1981.

CATALIOTO, R.M.; FESTA, C.; TRIOLO, A.; ALTAMURA, M.; MAGGI, C.A.; GIULIANI, S. Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E2 release in differentiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. **J Pharm Sci**, v. 98,

CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinical Liver Disease**, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2012.

CEDERBAUM, A. I.; LU, Y.; WU, D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 519–548, 2009.

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

CESCONETTO, P. A.; ANDRADE, C. M.; CATTANI, D.; DOMINGUES, J. T.; PARISOTTO, E. B.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. Maternal exposure to ethanol during pregnancy and lactation affects glutamatergic system and induces oxidative stress in offspring hippocampus. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, n. 1, p. 52-61, 2016.

CHEN, A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. **Biochem J**, v. 368, p. 683–693, 2002.

CHEN, L.; NYOMBA, B. L. Whole body insulin resistance in rat offspring of mothers consuming alcohol during pregnancy or lactation: comparing prenatal and postnatal exposure. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 167–172, 2004.

CHEN, L.; ZHANG, T.; NYOMBA, B. L. Insulin resistance of gluconeogenic pathways in neonatal rats after prenatal ethanol exposure. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R554–R559, 2004.

CHIN, A.M.; HILL, D.R.; AURORA, M.; SPENCE, J.R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. **Semin Cell Dev Biol**, v. 66, p 81–93, 2017.

CHIO, K. S.; TAPPEL, A. L. *Biochemistry (Wash.)*, v. 8, p. 2821, 1969. In: SNEL, K.; MULLOCK, B. *Biochemical toxicology a practical approach*. IRL Press Limited., 1987.

CHO, Y.; SONG, B. Pomegranate prevents binge alcohol-induced gut leakiness and hepatic inflammation by suppressing oxidative and nitrative stress. **Redox Biol**, v. 18, p. 266–278, 2018.

CHO, Y.E.; YU, L.R.; ABDELMEGEED, M.A.; YOO S.H.; SONG B.J. Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. **J. Hepatol**, 2018.

CHOI, I.Y.; ALLAN, A.M.; CUNNINGHAM, L.A. Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 29, p. 2053–2062, 2005.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, p. 259-268, 1995.

COHEN, J.I.; ROYCHOWDHURY, S.; MCMULLEN, M.R.; STAVITSKY, A.B.; NAGY, L.E. Complement and Alcoholic Liver Disease: Role of C1q in the Pathogenesis of Ethanol-Induced Liver Injury in Mice. **Gastroenterology**, 2010.

COLES, C.D.; BROWN, R.T.; SMITH, I.E.; PLATZMAN, K.A.; ERICKSON, S.; FALEK, A. Effects of prenatal alcohol exposure at school age. I. Physical and cognitive development. **Neurotoxicol Teratol**, v.13, p. 357–367, 1991.

CONRAD, M.E.; BARTON, J.C. Anemia and iron kinetics in alcoholism. **Semin Hematol**, v. 17, p. 149-63, 1980.

COOPER, A.J. ¹³N as a tracer for studying glutamate metabolism. **Neurochem Int**, v. 59, n. 4, p. 456-464, 2011.

CORMACK, D.H. Fundamentos de Histologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara koogan, 2003, 371p.

COSTA, A. C.; RIBEIRO, B.; COSTA, E. Índices plaquetários em indivíduos com doença hepática alcoólica crônica. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 44, n. 3, p. 201- 204, 2007.

CSIBI, A.; FENDT, S. M.; LI, C.; POULOGIANNIS, G.; CHOO, A. Y.; CHAPSKI, D. J.; JEONG, S. M.; DEMPSEY, J. M.; PARKHITKO, A.; MORRISON, T.; HENSKE, E. P.; HAIGIS, M. C.; CANTLEY, L. C.; STEPHANOPOULOS, G.; YU, J.; BLENIS, J. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 840–54, 2013.

CUDD, T.A. Animal model systems for the study of alcohol teratology. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 230, p. 389–393, 2005.

CZACHOWSKI, C.L.; SAMSON, H.H.; DENNING, C.E. Blood ethanol concentrations in rats drinking sucrose/ethanol solutions. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, p. 1331–1335, 1999.

CZAJA, M.J.; DING, W.X.; DONOHUE, T.M.JR.; S.L.; KIM, J.S.; KOMATSU, M.; LEMASTERS, J.J.; LEMOINE, A.; LIN, J.D.; OU, J.H.; PERLMUTTER, D.H.; RANDALL, G.; RAY, R.B.; TSUNG, A.; YIN, X.M. Functions of autophagy in normal and diseased liver. **Autophagy**, v. 9, p. 1131–1158, 2013.

DAHLGREN, I. L.; ERIKSSON, C. J.; GUSTAFSSON, B.; HARTHON, C.; HARD, E.; LARSSON, K. Effects of chronic and acute ethanol treatment during prenatal and early postnatal ages on testosterone levels and sexual behaviors in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.33, n. 4, p. 867- 73,1989.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 44, p. 169-172, 1984.

DAI, Q.; ZHANG, J.; PRUETT, S.B. Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, p. 37-42, 2005.

DAMM, O.S.; COOPER, T. G.; Maturation of sperm volume regulation in the rat epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 578–590, 2010.

DAY, N.L.; LEECH, S.L.; RICHARDSON, G.A.; CORNELIUS, M.D.; ROBLES, N.; LARKBY, C. Prenatal alcohol exposure predicts continued deficits in offspring size at 14 years of age. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, p. 1584–1591, 2002.

DE MINICIS, S.; BRENNER, D. A. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, Suppl 1, p. 98–103, 2008.

DEES, W.L.; KOZLOWSKI, G.P. Differential effects of ethanol on luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion in the female rat. **Alcohol**, v. 1, n. 6, p. 429–433, 1984.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **Am J Clin Nut**, v. 73, n. 6, p. 1131–1141, 2001.

DICKEY, A.N.; FALLER, R. How alcohol chain-length and concentration modulate hydrogen bond formation in a lipid bilayer. **Biophys J**, v. 92, p. 2366-2376, 2007.

DING, W.X.; LI, M.; CHEN, X.; NI, H.M.; LIN, C.W.; GAO, W.; LU, B.; STOLZ, D.B.; CLEMENS, D.L.; YIN, X.M. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*, v. 139, p. 1740–1752, 2010a.

DING, W.X.; MANLEY, S.; NI, H.M. The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 236, p. 546–556, 2011.

DLUGOS, C.A. ATF6 and caspase 12 expression in purkinje neurons in acute slices from adult, ethanol-fed rats. *Brain Research*, v. 1577, p. 11–20, 2014.

DOLGANIUC, A.; BAKIS, G.; KODYS, K.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 30, p. 76-85, 2006.

DONOHUE, T.M.; OSNA, N.A.; CLEMENS, D.L. Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 38, p. 92-101, 2006.

DREVER, N.; YIN, H.; KECHICHIAN, T.; COSTANTINE, M.; LONGO, M.; SAADE, G.R.; BYTAUTIENE, E. The expression of antioxidant enzymes in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, v. 206, n. 4, p. 358, 2012.

DUERKOP, B.A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L.V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*, v. 31, p. 368–376, 2009.

DUFOUR, D.R.; LOTT, J.A.; NOLTE, F.S.; GRETCH, D.R.; KOFF, R.S.; SEEFF, L.B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*, v. 46, n. 12, p. 2027–49, 2000.

DUNIGAN, T. H.; WERLIN, S. L. Extrahepatic biliary atresia and renal anomalies in fetal alcohol syndrome. *American Journal of Diseases of Children*, v. 135, p. 1067–1068, 1981a.

EID, N. A. S.; ITO, Y.; SHIBATA, M. A.; KUSAKABE, K.; ABE, H.; LI, Z.; OTSUKI, Y. Sertoli cell injury in ethanol-treated rats: novel roles for apoptosis related genes. *Journal of andrology*, v. 176, 2001.

EID, N.; ITO, Y.; HORIBE, A.; HAMAOKA, H.; KONDO, Y. A method for in vivo induction and ultrastructural detection of mitophagy in Sertoli cells. **Methods Mol. Biol**, v. 1748, p. 103–112, 2018.

EID, N.; ITO, Y.; HORIBE, A.; OTSUKI, Y. Ethanol-induced mitophagy in liver is associated with activation of the PINK1-Parkin pathway triggered by oxidative DNA damage. **Histol. Histopathol**, v. 31, p. 1143–1159, 2016.

EID, N.; ITO, Y.; OTSUKI, Y. Triggering of Parkin mitochondrial translocation in mitophagy: Implications for liver diseases. **Front. Pharmacol**, v. 7, p. 100, 2016.

EID, N.; KONDO, Y. Ethanol-induced mitophagy in rat Sertoli cells: Implications for male fertility. **Andrologia**, v. 50, p. 12820, 2018.

EID, N.A.; SHIBATA, M.A.; ITO, Y.; KUSAKABE, K.; HAMMAD, H.; OTSUKI, Y. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int. J. Androl*, v. 25, p. 159–167, 2002.

EL-ASSAL, O.; HONG, F.; KIM, W.H.; RADAIEVA, S.; GAO, B. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. **Cell Mol Immunol**, v.1, n. 3, p. 205–211, 2004.

EMANUELE, M. A.; EMANUELE, N. Alcohol and the male reproductive system. **Alcohol Research & Health**, v. 25, n. 4, p. 282–287, 2001.

EROYCHOWDHURY, S.; MCMULLEN, M.R.; PRITCHARD, M.T.; HISE, A.G.; VAN ROOIJEN, N.; MEDOF, M.E.; STAVITSKY, A.B.; NAGY, L.E. An early complement-dependent and TLR-4-independent phase in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. **Hepatology**, v. 49, n. 4, 1326–1334, 2009.

FAKOYA, F.A.; CAXTON-MARTINS, E.A. Morphological alterations in the seminiferous tubules of adult Wistar rats: the effects of prenatal ethanol exposure. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 63, p. 195–202, 2004.

FARGHALI, H.; WILLIAMS, D. S.; CARACENI, P.; BORLE, A. B.; GASBARRINI, A.; GAVALER, J.; RILO, H. L.; HO, C.; VAN THIEL D. H. Effect of ethanol on energy status

and intracellular calcium of Sertoli cells: a study using immobilized perfused cells. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2749-55, 1993.

FARGHALI, H.; WILLIAMS, D.S.; GAVALER, J.; VAN THIEL, D.H. Effect of short-term ethanol feeding on rat testes as assessed by ³¹P NMR spectroscopy, ¹H NMR imaging, and biochemical methods. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 15, p. 1018–1023, 1991.

FAWCETT, D. W.; LEAK, L. V.; HEIDGER, JR. P. M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 10, p. 105–22, 1970.

FERMOSO, J.; ESQUIFINO, A. I.; MATEOS, A.; AGRASAL, C.; MARTIN, I. Possible role of prolactin in the induction of hypogonadism by chronic alcohol treatment in the male rat. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 29, n. 3, p. 489-93, 1988.

FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N.; COLELL, A.; GARCÍA-RUIZ, C. Oxidative stress and alcoholic liver disease. **Alcohol Health & Research World**, v. 21, p. 321–324, 1997.

FERRER, J. C.; FAVRE, C.; GOMIS, R. R.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; GARCÍA-ROCHA, M.; DE LA IGLESIA, N.; CID, E.; GUINOVART, J. J. Control of glycogen deposition. **FEBS Letters**, v. 546, p. 127–132, 2003.

FERRIER, L.; BÉRARD, F.; DEBRAUWER, L.; CHABO, C.; LANGELLA, P.; BUÉNO, L.; FIORAMONTI, J. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. **Am J Pathol**, v. 168, p. 1148-1154, 2006.

FH, N. Atlas de Anatomia Humana. ed, editor. Rio de Janeiro 2011.

FIGLIE, N.B.; PILLON, S.C.; DUNN, J.; LARANJEIRA, R. The frequency of smoking and problem drinking among general hospital inpatients in Brazil - using the AUDIT and Fagerstrom questionnaires. **São Paulo Med J**, v.118, n. 5, p.139-143, 2000.

FISHER SJ, LEE IJ, SWAAN PW, EDDINGTON ND. Evaluation of the effect of ethanol's toxic metabolite acetaldehyde on the gastrointestinal oligopeptide transporter, PEPT1: *In vitro* and *in vivo* studies. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, p. 162–170, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, n.1, p. 114–121, 1984.

FLOYD, R. L.; SIDHU, J. S. Monitoring prenatal alcohol exposure. **American Journal of Medical Genetics**, v. 127, p. 3–9, 2004.

FORSYTH, C.B.; TANG, Y.; SHAIKH, M.; ZHANG, L.; KESHAVARZIAN, A. Role of snail activation in alcohol-induced iNOS-mediated disruption of intestinal epithelial cell permeability. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, p. 1635–1643, 2011.

GAO, B. Citocinas, STATs e doenças do fígado. **Imunologia Celular e Molecular**, v. 2, n. 2, p. 92-100, 2005.

GARCIA-MARCHENA, N.; SILVA-PEÑA, D.; MARTINVELASCO, A.I.; VILLANUA, M.A.; ARAOS, P.; PEDRAZ, M.; et al. Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

GAUTHIER, T.W.; DREWS-BOTSCH, C.; FALEK, A.; BROWN, L. A. Maternal alcohol abuse and neonatal infection. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 6, p. 1035–1043, 2005a.

GIUSTINA, A.; MAZZIOTTI, G.; CANALIS, E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. **Endocrine Reviews**, p. 29, n. 5, p. 535–559, 2008.

GOETZMAN, B. W.; KAGAN, J.; BLANKENSHIP, W. J. Expansion of the Fetal Alcohol Syndrome. **Clinical Research**, v. 23, p. 100, 1975.

GOHLKE, J. M.; GRIFFITH, W. C.; FAUSTMAN, E. M. Computational models of ethanol-induced neurodevelopmental toxicity across species: Implications for risk assessment. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 83, p. 1–11, 2008.

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

GOODWIN, J.F.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. **Clinical Chemistry**, v.12, n. 2, p. 47-57, 1966.

GREENE, T.; ERNHART, C.B.; SOKOL, R.J.; MARTIER, S.; MARLER, M.R.; BOYD, T.A.; AGER, J. Prenatal Alcohol Exposure and Preschool Physical Growth - a Longitudinal Analysis. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 15, p. 905–913, 1991.

GRINFELD, H. Consumo nocivo de etanol durante a gravidez. Etanol e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. **Einstein**, v. 7, p. 180-19, 2009.

GRINFELD, H.; SEGRE, C. A. M.; CHADI, G.; GOLDENBERG, S. O alcoolismo na gravidez e os efeitos na prole. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 18, n. 1, p. 41-9, 2000.

GROOTEGOED, J.A.; OONK, R.B.; JANSEN, R.; VAN DER MOLEN, H.J. Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. **J. Reprod. Fertil**, v. 77, p. 109–118, 1986.

GUO, R.; REN, J. Alcohol and acetaldehyde in public health: From marvel to menace. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 1285–1301, 2010.

GUYTON, A C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione Stransferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n.1, p.7130–7139, 1976.

HAI, Y.; HOU, J.; LIU, Y.; YANG, H.; LI, Z.; HE, Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. **Semin. Cell Dev. Biol**, p. 66–75, 2014.

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

HAN, H.; HU, J.; LAU, M. Y.; FENG, M.; PETROVIC, L. M.; JI, G. Altered methylation and expression of ER-associated degradation factors in long-term alcohol and constitutive ER stress-induced murine hepatictumors. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p, 1- 13, 2013.

HANNIGAN, J.H. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 55, p. 489–499, 1996.

HANSON, J. W.; STREISSGUTH, A. P.; SMITH, D. W. The effects of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. **Journal of Pediatrics**, v. 92, p. 457–460, 1978.

HARPER, K. M.; TUNC-OZCAN, E.; GRAF, E. N.; REDEI, E. E. Intergenerational effects of prenatal ethanol on glucose tolerance and insulin response. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 5, p. 159–168, 2014.

HASSEL, B. AND DINGLEDINE, R. Glutamate. In “Basic Neurochemistry” (G. J. Siegel, R. W. Albers, S. Brady, and D. L. Price, eds.), 7th ed. Elsevier–Academic Press, San Diego, CA, p. 267–290, 2006.

HAUSKNECHT, K. A.; ACHESON, A.; FARRAR, A. M.; KIERES, A. K.; SHEN, R. Y.; RICHARDS, J. B.; SABOL, K. E. Prenatal alcohol exposure causes attention deficits in male rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, p. 302–310, 2005.

HELANDER, A.; TABAKOFF, B. Biochemical Markers of Alcohol Use and Abuse: Experiences From the IOT Study of the WHO/ISBRA Collaborative Project on State and Trait Markers of Alcohol. International Society for Biomedical Research on Alcoholism. **Alcohol Alcohol**, v. 32, n. 2, p. 133–144, 1997.

HELLEMANS KG, VERMA P, YOON E, YU W, WEINBERG J. Prenatal alcohol exposure increases vulnerability to stress and anxiety-like disorders in adulthood. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, p. 154–175, 2008.

HILL, D.B.; MARSANO, L.; COHEN, D.; ALLEN, J.; SHEDLOFSKY, S.; MCCLAIN, C.J. Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. **J Lab Clin Med**, v. 119, n. 5, p. 547–552, 1992.

HOCK, B.; SCHWARZ, M.; DOMKE, I.; GRUNERT, V.P.; WUERTEMBERGER, H.; SCHIEMANN, L.; HORSTER, S.; LIMMER, C.; STECKER, L.; SOYKA, M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of nonalcoholic and alcoholic origin. **Addiction**, v.100, n. 10, p.1477-86, 2005.

HOCK, B.; SCHWARZ, M.; DOMKE, I.; GRUNERT, V. P.; WUERTEMBERGER, M.; SCHIEMANN, U.; HORSTER, S.; LIMMER, C.; STECKER, G.; SOYKA, M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. **Addiction**, v. 100, n. 10, p.1477-86, 2005.

HOFER, R.; BURD, L. Studies of Kidney, Liver, and Gastrointestinal Birth Defects in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Birth Defects Research**, v. 85, p. 179-183, 2009.

HOLFORD, N. H. G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. **Clinical Pharmacokinetics**, v.13, p, 273–292, 1987.

HOMANN, N.; TILLONEN, J.; SALASPURO, M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. **Int. J. Cancer**, v. 86, n. 2, p. 169–173, 2000.

HONG, F.; KIM, W.H.; TIAN, Z.; JARUGA, B.; ISHAC, E.; SHEN, X.; GAO, B. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. **Oncogene**, v. 21, n. 1, p. 32–43, 2002.

HOYME, H. E.; MAY, P. A.; KALBERG, W. O.; KODITUWAKKU, P.; GOSSAGE, J. P.; TRUJILLO, P M.; BUCKLEY D. G.; MILLER, J. H.; ARAGON, A. S.; KHAOLE, N.; VILJOEN, D. L.; JONES, K. L.; ROBINSON, L K. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: Clarification of the 1996 Institute of Medicine criteria. **Pediatrics**, v. 115, p. 39–47, 2005.

HOYME, H.E.; MAY, P.A.; KALBERG, W.O.; KODITUWAKKU, P.; GOSSAGE, J.P.; TRUJILLO, P.M.; BUCKLEY, D.G.; MILLER, J.H.; ARAGON, A.S.; KHAOLE, N.; VILJOEN, D.L.; JONES, K.L.; ROBINSON, L.K. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 Institute of Medicine criteria. **Pediatrics**, v. 115, n.1, p. 39-47, 2005.

HRITZ, I.; MANDREKAR, P.; VELAYUDHAM, A.; CATALANO, D.; DOLGANIUC, A.; KODYS, K.; KURT-JONES, E.; SZABO, G. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in

alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. **Hepatology**, v. 48, n. 4, p.1224–1231. 2008.

HRITZ, I.; VELAYUDHAM, A.; DOLGANIUC, A.; KODYS, K.; MANDREKAR, P.; KURT-JONES, E.; SZABO, G. Bone marrow-derived immune cells mediate sensitization to liver injury in a myeloid differentiation factor 88-dependent fashion. **Hepatology**, v. 48, p. 1342–1347, 2008.

HU, J. H.; JIANG, J.; MA, Y. H.; YANG, N.; ZHANG, M. H.; WU, M.; FEI, J.; GUO, L. H. Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice over expressing Fas-Ligand. **Cell Research**, v. 13, p. 361–367, 2003.

IDE, K.; SCHMALRUCH, I.K.; QUISTORFF, B.; HORN, A.; SECHER, N.H. Lactate, glucose and O² uptake in human brain during recovery from maximal exercise. **Journal of Physiology**, v. 522, p. 159–164, 2000.

ISOLANI, A. P.; SCOLARI, P. A.; DE ANDRADE, V. T.; TASCA, M. V. G.; BIAZON, A. C B. Avaliação enzimática e sorológica para hepatite B de funcionários de uma instituição de ensino superior em Campo Mourão-PR. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, 2013.

JACOBSON, S.W.; JACOBSON, J.L.; SOKOL, R.J.; CHIDO, L.M.; COROBANA, R. Maternal age, alcohol abuse history, and quality of parenting as moderators of the effects of prenatal alcohol exposure on 7.5-year intellectual function. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, p. 1732–1745, 2004.

JANA, K.; JANA, N.; DE D. K.; GUHA, S. K. Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. **Molecular journal of reproduction and development**, v. 77, p. 820–833, 2010.

JONES, M.W.; BASS, W.T. Fetal alcohol syndrome. **Neonatal Nets**, v. 22, n. 3, p. 63-70, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Ed. Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Décima Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 317-338. 2004.

KARINCH, A. M.; MARTIN, J. H.; VARY, T. C. Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis. **American journal of physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 295, p. E3–E9, 2008.

KELLETT, G. L.; BROU-LAROCHE, E. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. **Diabetes**, v. 54, p. 3056 -3062, 2005.

KELLY, S. J.; GOODLETT, C. R.; HANNIGAN, J. H. Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. **Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 15, p. 200–208, 2009.

KENDIG, M.D.; EKAYANTI, W.; STEWART, H.; BOAKES, R.A.; ROONEY, K. Metabolic Effects of Access to Sucrose Drink in Female Rats and Transmission of Some Effects to Their Offspring. *PLoS One*, v. 10, n. 7, 2015.

KESHAVARZIAN, A.; FIELDS, J. Alcoholic liver disease: is it an “extraintestinal” complication of alcohol-induced intestinal injury? **J Lab Clin Med**. v. 142(5), p. 285–7, 2003.

KESMODEL, U.; WISBORG, K.; OLSEN, S. F.; HENRIKSEN, T. B.; SECHER, N. J. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, n. 1, p. 87-92, 2002.

KIM, I.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; LEMASTERS, J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Arch Biochem Biophys**, v. 462, p. 245–253, 2007.

KLINGENBERG, C. P.; WETHERILL, L.; ROGERS, J.; MOORE, E.; WARD, R.; AUTTI-RÄMÖ, I.; FAGERLUND, A.; JACOBSON, S. W.; ROBINSON, L. K.; HOYME, H. E.; MATTSON, S. N.; LI, T. K.; RILEY, E. P.; FOROUD, T. **Prenatal alcohol exposure alters the patterns of facial asymmetry**. **Alcohol**, v. 44, p. 649–457, 2010.

KOK, P.; KIM, M. Ethanol exposure decrease cell proliferation and increase apoptosis in rat testes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v, 68, n. 10, p. 1013–1017, 2006.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, p. 267-281, 2001.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 17-23, 1962.

KUNTZ, E.; KUNTZ, H.D. Hepatology: textbook and atlas. 3 ed. Berlin: Springer, 2008.

KVAMME, E.; TORGNER, I.A.; ROBERG, B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, p. 951–958, 2001.

LAN, N. A.; VOGL, W.; WEINBERG, J. Prenatal Ethanol Exposure Delays the Onset of Spermatogenesis in the Rat. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 7, p. 1074–1081, 2013.

LAN, N.; VOGL, A. W.; WEINBERG, J. Prenatal Ethanol Exposure Delays the Onset of Spermatogenesis in the Rat. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 37, n. 7, p. 1074–1081, 2013.

LANE, A.A.; BERLINER, N. Nonmalignant Disorders of Leukocytes. SAM. DECKER INTELLECTUAL PROPERTIES INC. Hamilton, Ontario, Canada. Copyright © 2015 Decker Intellectual Properties Inc. All Rights Reserved.

LEE, A; ANDERSON A.R.; BARNETT A.C.; CHAN A.; POW D.V. Expression of multiple glutamate transporter splice variants in the rodent testis. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.-, p.254-265, 2011.

LEE, D.H.; HA, M.H.; CHRISTIANI, D.C. Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity a 4 year follow up study. **Int J Epidemiol**, v. 30, 2001.

LEGGIO, L.; FERRULLI, A.; MALANDRINO, N.; MICELI, A.; CAPRISTO, E.; GASBARRINI, G.; et al. Insulin but not insulin growth factor-1 correlates with craving in currently drinking alcohol-dependent patients. **Alcohol Clin Exp Res**, 32, n. 3, p. 450–8, 2008.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LEIDERMAN, B.; MANCINI, R.E. Glycogen content in the rat testis from postnatal to adult ages. **Endocrinology**, v. 85, p. 607-9, 1969.

LESTER, B.M.; ELSOHLY, M.; WRIGHT, L.L.; Smeriglio, V. L.; VETER, J.; BAUER, C. R.; SHANKARAN, S.; BADA, H. S. WALLS, C.; HUETIS, M. A.; FINNEGAN, L. P.; MAZA, P. L. The Maternal Lifestyle Study: Drug use by meconium toxicology and maternal self-report. **Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 309–317, 2001.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, p. 27–42, 2008.

LI, L.N.; MARGOLIS, L.B.; HOFFMAN, R.M. Skin toxicity determined in vitro by three-dimensional, native-state histoculture. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 1908-1912, 1991.

LIN, D.; SUGAWARA, T.; STRAUSS, J.F.; CLARK, B.J.; STOCCO, D.M.; SAENGER, P.; ROGOL, A.; MILLER, W.L. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, v. 267, p. 1828–1831, 1995.

LINDEN, S. K.; FLORIN, T. H.; MCGUCKIN, M. A. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. 3952, 2008.

LIU, M.; ZHANG, Q.; PEI, L.; ZOU, Y.; CHEN, G.; WANG, H. Corticosterone rather than ethanol epigenetic programmed testicular dysplasia caused by prenatal ethanol exposure in male offspring rats. **Epigenetics**, v. 14, n. 3, p. 245-259, 2019.

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

LOOMBA, R. Serum γ -glutamyltranspeptidase predicts all-cause, cardiovascular and liver mortality in older adults. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 4–11, 2013.

LOSS, E.S.; LOSS, E.S.; JACOBUS, A.P.; WASSERMANN, G.F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Hormone and Metabolic Research**. v. 39, p. 1-7. 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-267, 1951.

LU, Y.; ZHUGE, J.; WANG, X.; BAI, J.; CEDERBAUM, A.I. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. **Hepatology**, v. 47, n. 5, 1483–1494, 2008.

MAIO, R.; DICHI, J.B.; BURINI, R.C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica Sobre o metabolismo de Micronutrientes. **Arq Gastroenterol**, v. 37, p. 120-124, 2000.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian J.Med. Res**, v. 129, p. 357–367, 2009.

MALBERG, J.E.; PLATT, B.; RIZZO, S.J.; RING, R.H.; LUCKI, I.; SCHECHTER, L.E.; et al. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 11, p. 2360–8, 2007.

MALKOV, M.; FISHER, Y.; DON, J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. **Biol Reprod.** v. 59, p. 84–92, 1998.

MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; WHITE, B.; SZABO, G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. **Alcoholism**, v. 30, n. 1, p. 135–139, 2006.

MANDREKAR, P.; SZABO, G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. **J Hepatol**, v. 50, p. 1258-1266, 2009.

MANEESH, M.; DUTTA, S.; CHAKRABARTI, A.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 291-296, 2006.

MANZO-AVALOS, S. SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4281–4304, 2010.

MARES, V.; MALÍK, R.; LISÁ, V.; SEDO, A. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research**, v.136, p.75–80, 2005.

MARONPOT, R.R.; YOSHIZAWA, K.; NYSKA, A.; HARADA, T.; FLAKE, G.; MUELLER, G.; SINGH, B.; WARD, J.M. Hepatic enzyme induction: histopathology **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 5, p. 776-795, 2010.

MARTINI, A. C.; MOLINA, R. I.; ESTOFÁN, D.; SENESTRARI, D.; FIOL DE CUNEO, M.; RUIZ, R. D. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 374-377, 2004.

MAY, P. A.; GOSSAGE, J. P.; MARAIS, A. S.; ADNAMS, C. M.; HOYME, H. E.; JONES, K. L.; ROBINSON, L. K.; KHAOLE, N. C.; SNELL, C.; KALBERG, W. O.; HENDRICKS,

L.; BROOKE, L.; STELLAVATO, C.; VILJOEN, D. L. The epidemiology of fetal alcohol syndrome and partial FAS in a South African community. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 88, n. 2–3, p. 259–271, 2007.

MCAVOY, J.W.; DIXON, K.E. Cell specialization in the small intestinal epithelium of adult *Xenopus laevis*: structural aspects. **J Anat**, v. 125, p. 155–169, 1978.

MCCLAIN, C.J.; BARVE, S.; DEACIUC, I.; KUGELMAS, M.; HILL, D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1999; 19(2):205-19.

MCCUSKEY, R. S. The Hepatic Microvascular system in health and its response to toxicants. **Anat. Rec.**,v. 291, p. 661–671, 2008.

MCGIVERN, R. F.; HANDA, R. J.; REDEI, E. Decreased postnatal testosterone surge in male rats exposed to ethanol during the last week of gestation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, p. 1215–1222, 1993.

MELLO, T.; CENI, E.; SURRENTI, C.; GALLI, A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. **Mol Aspects Med**, v. 29, p. 17–21, 2008.

MELLO, T.; POLVANI, S.; GALLI, A. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic x receptor in alcoholic liver disease. **PPAR Res**, v. 748, p. 174, 2009.

MENNELLA, J. Alcohol's effect on lactation. **Alcohol Res Health**, v. 25, p. 230–234, 2001.

MESCHER, A. Junqueira's Basic Pathology: Text and Atlas. In:_____. McGrawHill. 14. ed. Nova Iorque: p. 335, 2010.

MESQUITA, S. F. P.; BARBIERI, M. F.; FERNANDES, E.V.; ANDRADE, F. G.; ARREBOLA, N. R. Effects of swimming on the testicular histomorphology of alcoholized rats. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 35, p. 37–42, 2013.

MESSINGHAM, K.A.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Alcohol, injury, and cellular immunity. **Alcohol**, v. 28, n. 3, p. 137-49, 2002.

MILLER, J. L. Iron deficiency anemia: A common and curable disease. **Cold Spring Harbor Perspect. Med**, v. 3, n. 7, p. 1-13, 2013.

MISDRAJI, J. Cap. 71: Embriologia, anatomia, histologia e anomalias do desenvolvimento hepático. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.S.; BRANDT, L.J. **Tratado gastrointestinal e doenças do fígado de Sleisenger e Fordtran**, 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 247, p. 188–92, 1972.

MITA, M.; PRICE, J.M.; HALL, P.F. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. **Endocrinology**, v. 110, p. 1535–1541, 1982.

MIZUGUCHI, Y.; SPECHT, S.; ISSE, K.; LUNZ III, J.G; DEMETRIS, A. J. Chapter 4: Biliary epithelial cells. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**, New York: Springer, 2011.

MOLLER, N.; JORGENSEN, J.O. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 2, p. 152–177, 2009.

MONOSKI, M.; NUDELL, D. M.; LIPSHULTZ, L. I. Effects of medical therapy, alcohol, and smoking on male fertility. **Contemporary Urology**, p. 57-63, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. (1-2), p. 55-63, 1983.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. São Paulo: Robe, p. 419, 2003.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. Editora: Medbook, 2009.

MOULIN, M.; CARPENTIER, S.; LEVADE, T.; ARRIGO, A.P. Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, p. 1703-1720, 2007.

MUNEER, P. M. A.; ALIKUNJU, S.; SZLACHETKA, A, M.; HAORAH, J. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood–brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-L-carnitine. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 3, p. 707–718, 2011.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL. V.W. Harper: bioquímica. 7.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. 763p

NAGY, L.E. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 8, p. 882–890, 2003.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p.153-63, 2003.

NI, Q.; TAN, Q.; ZHANG, X.; LUO, H.; DENG, Y.; MAGDALOU, J.; CHEN, N.; WANG, H. Prenatal ethanol exposure increases osteoarthritis susceptibility in female rat offspring by programming a low-functioning IGF-1 signaling pathway. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 14711, 2015.

NIEMELA, O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1533– 1538, 2001.

NIEMELA, O.; PARKKILA, S.; YLA-HERTTUALA, S.; VILLANUEVA, J.; RUEBNER, B.; HALSTED, C. H. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcoholinduced liver disease. **Hepatology**, v. 22, p. 1208–1214, 1995.

NORBERG, A.; JONES, A. W.; HAHN, R. G.; GABRIELSSON, J. L. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: Research and forensic applications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, p. 1–31, 2003.

NOURISSAT, P.; TRAVERT, M.; CHEVANNE, M.; TEKPLI, X.; REBILLARD, A.; LE MOIGNE-MÜLLER, G.; RISSEL, M.; CILLARD, J.; DIMANCHE-BOITREL, M.T.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; SERGENT, O. Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. **Hepatology**, v. 47, p. 59-70, 2008.

OHKUBO, T.; METOKI, H.; IMAI, Y. Alcohol intake, circadian blood pressure variation, and stroke. **Hypertension**, v. 53, p. 4–5, 2009.

OLIVEIRA, P.F.; MARTINS, A.D.; MOREIRA, A.C.; CHENG, C.Y.; ALVES, M.G. The Warburg effect revisited-lesson from the Sertoli cell. **Med. Res. Ver**, v. 35, p. 126–151, 2015.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, v.203, n.-, p.485-492, 1982.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 581-618, 1998.

PANCHENKOA, L. F.; DAVYDOVB, B. F.; TEREKILINAB, N. N.; BARONETSB, V. Y.; ZHURAVLEVAC, A. S. Oxidative Stress in the Alcoholic Liver Disease. **Biomedical Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 73–76, 2014.

PARK, H. J.; LEE, S.; SONG, Y.; JANG, S.; KO, Y.; KANG, S. N.; Chung, B. Y.; Kim, H.; Kim, G.; Cho, J. Schisandra chinensis prevents alcohol-induced fatty liver disease in rats. **Journal Of Medicinal Food**, v. 17, n. 1, p. 103–110, 2014.

PARLESK, A.; SCHÄFER, C.; SCHÜTZ, T.; BODE, J.C.; BODE, C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. **J Hepatol**, v. 32, p. 742–747, 2000.

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

PENNINGTON, J.S.; PENNINGTON, S.N. Rat Adult Offspring Serum Lipoproteins Are Altered by Maternal Consumption of a Liquid Diet. **Lipids**, v. 41, p. 357–363, 2006.

PERRA, S.; PILLOLLA, G.; LUCHICCHI, A.; PISTIS, M. Alcohol inhibits spontaneous activity of basolateral amigdala projection neurons in the rat: Involvement of the endocannabinoid system. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, p. 443–449, 2008.

PERSSON, J. Alcohol and the small intestine. **Scand J Gastroenterol**, v. 26, n. 1, p. 3-15, 1991.

POURHASSANALIA, N.; ROSHAN-MILANIB, S.; KHERADMANDC, F.; MOTAZAKKERC, M.; BAGHERIC, M.; SABOORY, E. Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways. **Reproductive Toxicology**, v. 61, p. 97–103, 2016.

Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology. 8 ed. Ed. Academic Press: USA, 2012.

PROBYN, M. E.; PARSONSON, K. R.; GARDEBJER, E. M.; WARD, L. C.; WLODEK, M. E.; ANDERSON, S. T.; MORITZ, K. M. Impact of low dose prenatal ethanol exposure on glucose homeostasis in sprague-dawley rats aged up to eight months. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-11, 2013.

PROSSER, R. A.; MANGRUM, C. A.; GLASS, J. D. Acute ethanol modulates glutamatergic and serotonergic phase shifts of the mouse circadian clock in vitro. **Neuroscience**, v. 152, p. 837–848, 2008.

PUROHIT, V.; BRENNER, D.A. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. **Hepatology**, v. 43, n. 4, p. 872-8, 2006,

RAHMA, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p 219–236, 2007

RAO, R.K. Acetaldehyde-induced barrier disruption and paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. **Methods Mol Biol**, v. 447, p. 171–183, 2008.

RAO, R.K.; SETH, A.; SHETH, P. Recent advances in alcoholic liver disease. I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, p. G881–G884, 2004.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) - and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) - induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-741, 1993

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189–207, 2006.

RATO, L.; ALVES, M. G.; SOCORRO, S.; DUARTE, A. I.; CAVACO, J. E.; OLIVEIRA, P. F. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews. Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–8, 2012.

REED, D. J. Glutathione: toxicological implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 30, p. 2395-2407, 1990.

REJ, R. - Aminotransferases in disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 9, n. 4, p. 667-87, 1989.

RIERA, M. F.; GALARDO, M. N.; PELLIZZARI, E. H.; MERONI, S. B.; CIGORRAGA, S. B. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 297, n. 4, p. 907-14, 2009.

RILEY, E. P.; MCGEE, C. L.; SOWELL, E. R. Teratogenic effects of alcohol: a decade of brain imaging. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 127C, p. 35–41, 2004.

ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Current Molecular Medicine**, v. 2, p.101–120, 2002.

ROBERTS, A.J.; HEUSER, C.J.; KOOB, G.F. Operant self-administration of sweetened versus unsweetened ethanol: effects on blood alcohol levels. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, p. 1151–1157, 1999.

ROBINSON, R.; FRITZ, I. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. **Biol. Reprod**, v. 24, p. 1032–1041, 1981.

ROCCO, A.; COMPARE, D.; ANGRISANI, D.; ZAMPARELLI, M. S.; NARDONE, G. Alcoholic disease: Liver and beyond. **World Journal of Gastroenterol**, v. 20, n. 40, p. 14652-14659, 2014.

RODRIGUES, F.A.P.; MEDEIROS, P.H.Q.S.; PRATA, S.M.G.; LIMA, A.A.M. Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal. p. 441 -478. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

ROSALKI, S.B.; RAU, D.; LEHMANN, D.; RENTINE, M. Gamma-glutamyltranspeptidase in chronic alcoholism, **Lancet** 2, v. 1139, 1970.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 313–323, 2009.

ROY-CHOWDHURY, N; ROY-CHOWDHURY, J. Cap.72. Fisiologia e metabolismo energético do fígado. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.S.; BRANDT, L.J..**Tratado gastrointestinal e doenças do fígado de Sleisenger e Fordtran. Tratado gastrointestinal e doenças do fígado.** 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

RUFER, E. S.; TRAN, T. D.; ATTRIDGE, M. M.; ANDRZEJEWSKI, M. E.; FLENTKE, G. R.; SMITH, S. M. Adequacy of Maternal Iron Status Protects against Behavioral, Neuroanatomical, and Growth Deficits in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1-12, 2012.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIN, A. P. CLEGG, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 286p, 1990.

RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, their relationship to tubular fluid secretion and flow. **Am J Anat**, v. 184, p. 179–189, 1989.

RUSSELL, M.; SKINNER, J.B. Early measures of maternal alcohol misuse as predictors of adverse pregnancy outcomes. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 12, p. 824–30, 1998.

SACANELLA, E.; ESTRUCH, R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. **Addict Biol**, v. 8, p. 371-378, 2003.

SAMPSON, P.D.; BOOKSTEIN, F.L.; BARR, H.M.; STREISSGUTH, A.P. Prenatal alcohol exposure, birthweight, and measures of child size from birth to age 14 years. **Am J Public Health**, v. 84, p. 1421–1428, 1994.

SANTEN, R. J.; BARDIN, C. W. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 10, p. 2617–28, 1973.

SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sciences**. v. 80, p. 573-8, 2007.

SEGRE, C. A. Efeitos do etanol na gestante, no feto e no recém-nascido. São Paulo: **Sociedade de Pediatria de São Paulo**, 2010.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nature Review Cancer*, v. 7, p. 599-612, 2007.

SEITZ, H.K.; MATSUZAKI, S.; YOKOYAMA, A.; HOMANN, N.; VOKEVAINEN, S.; WANG, X.D. Alcohol and cancer. ***Alcohol Clin. Exp. Res.***, v. 25, n. 5, p. 137–143, 2001.

SEN, E.; TUNALI Y.; ERKAN, M. Testicular development of male mice offsprings exposed to acrylamide and alcohol during the gestation and lactation period. ***Human & Experimental toxicology***, v. 34, n. 4, p. 401-14, 2015.

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

SETH, A.; BASUROY, S.; SHETH, P.; RAO, R. K. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. ***Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***, v. 287, p. G510-G517, 2004.

SETH, D.; HABER, P.S.; SYN, W.K.; DIEHL, A.M.; DAY, C.P. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: classical concepts and recent advances. ***J Gastroenterol Hepatol***, v. 26, p. 1089–1105, 2011.

SETSHEDI, M.; WANDS, J.R.; MONTE, S.M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. ***Oxidative medicine and cellular longevity***. v. 3(3), p. 178–185, 2010.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, v. 24, p. 501-24, 1970.

SHARPE, R.M. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). ***The Physiology of Reproduction***, 2Ed. New York: Raven Press, p.1363-1434, 1994.

SHEN, L.; LIU, Z.; JUN, J.;LIZHANG, L.; WANG, L.; MAGDALOU, J.; CHEN, L.; WANG, H. Prenatal ethanol exposure programs an increased susceptibility of non-alcoholic fatty liver disease in female adult offspring rats. ***Toxicology and Applied Pharmacology***, v. 274, n. 2, p. 263-273, 2014.

SHETH, P.; SETH, A.; ATKINSON, K.J.; GHEYI, T.; KALE, G.; GIORGIANNI, F.; DESIDERIO, D.M.; LI, C.; NAREN, A.; RAO, R. Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. **Biochem J**, v. 402, p. 291-300, 2007.

SHIRPOOR, A.; NOROUZI, L.; KHADEM-ANSARI, M.; ILKHANIZADEH, B.; KARIMIPOUR, M. The protective effect of vitamin e on morphological and biochemical alteration induced by pre and postnatal ethanol administration in the testis of male rat offspring: a three months follow-up study. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 15, n. 3, p.134-141, 2014.

SHYER, A.; TALLINEN, T.; NERURKAR, N.; WEI, Z.; GIL, E.; KAPLAN, D.; et al. Villification: how the gut gets its villi. **Science**, v. 342, p. 212–218, 2013.

SID, B.; VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. **Free Radical Research**, v. 47, p. 894–904, 2013.

SILLANAUKKEE, P.; MASSOT, N.; OUSILAHTI, P.; VARTIAINEN, E.; SUNDVALL, J.; OLSSON, U.; POIKOLAINEN, K.; PONNIO, M.; ALLEN, J. P.; ALHO, H. Dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, p. 747–751, 2000.

SILVA, A.C.C.; SILVA, R.B.C.; MELO, J.M.R.; PONTES-FILHO, N.T. Efeitos da exposição ao etanol e da desnutrição sobre o córtex visual durante o desenvolvimento perinatal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 6, n. 2, p. 166-174, 2007.

SIMM, B.; MURDOCH, R. N. The role of acetate in alcohol-induced alterations of uterine glucose metabolism in the mouse during pregnancy. **Life Sciences**, v. 47, p. 1051-1058, 1988.

SINGH, S. P.; SNYDER, A. K.; PULLEN, G. L. Fetal Alcohol Syndrome: Glucose and liver metabolism in term rat fetus and neonate. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 10, n. 1, p 54-58, 1986.

SLAUGHTER, G.R.; MEANS, A.R. Follicle-stimulating hormone activation of glycogen phosphorylase in the Sertoli cell-enriched rat testis. **Endocrinology**, v. 113, p.1476-85, 1983.

SLAWECKI, C.J.; SAMSON, H.H.; HODGE, C.W. Differential changes in sucrose/ethanol and sucrose maintained responding by independently altering ethanol or sucrose concentration. **Alcohol Clin Exp Res**, v, 21, p. 250–260, 1997.

SLONE, J.L.; REDEI, E.E. Maternal alcohol and adrenalectomy: asynchrony of stress response and forced swim behavior. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, p. 173–178, 2002.

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

SONG, B.J.; AKBAR, M.; ABDELMEGEED, M.A.; BYUN, K.; LEE, B.; YOON, S.K.; HARDWICK, J.P. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. **Redox Biol**, v. 3, p. 109–123, 2014.

SOTO-GUTIERREZ, A.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; KOBAYASHI, N. Chapter 3: Hepatocytes. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

SPANAGEL, R. “Recent Animal Models of Alcoholism” **Alcohol Research & Health**, 2000.

SRIVASTAVA, V.K.; HINEY, J.K.; DEES, W.L. Prepubertal ethanol exposure alters hypothalamic transforming growth factor- α and erbB1 receptor signaling in the female rat. **Alcohol**, v. 45, n. 2, p.173–181, 2011b.

St. JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v.57, p.109-123, 2002.

STOLER, J.M.; HOLMES, L.B. Under-recognition of pre-natal alcohol effects in infants of know alcohol abusing women. **Journal of Pediatrics**, v.135, p. 430-436, 1999.

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

SU, G.L.; KLEIN, R.D.; AMINLARI, A.; ZHANG, H.Y.; STEINSTRASSER, L.; ALARCON, W.H.; REMICK, D.G.; WANG, S.C. Kupffer cell activation by

lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. **Hepatology**, v. 31, p. 932–936, 2000.

SUTER, P. M. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 42, n. 3, p. 197-227, 2005.

SZABO, G. Moderate drinking, inflammation, and liver disease. **Ann Epidemiol**, v. 17, v. S49-S54, 2007.

SZABO, G., BALA, S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. **World J Gastroenterol**, v. 16(11), p. 1321-1329, 2010.

SZABO, G.; BALA, S.; PETRASEK, J.; ARIJEET, G. Gut-liver axis and sensing microbes pathomechanisms of alcohol-induced damage. **Dig Dis**, v. 28, p. 737–744, 2010.

TADIC, S. D.; ELM, M. S.; SUBBOTIN, V. M.; EAGON, P. K. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1135-1140, 2000

TAKAHIRO, M.; TSUTSUMI, M.; TSUCHISHIMA, M.; HAYASHI, N.; SAITO, T.; MATSUE, Y.; TOSHIKUNI, N.; ARISAWA, T.; GEORGE, J. Binge alcohol consumption aggravates oxidative stress and promotes pathogenesis of nash from obesity-induced simple steatosis. **Molecular Medicine**, v. 20, p. 490– 502, 2014.

TANG, Y.; BANAN, A.; FORSYTH, C.B.; FIELDS, J.Z.; LAU, C.K.; ZHANG, L.J.; KESHAVARZIAN, A. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32(2), p. 355–64, 2008.

TANG, Y.; FORSYTH, C.B.; FARHADI, A.; RANGAN, J.; JAKATE, S.; SHAIKH, M., BANAN, A.; FIELDS, J.Z.; KESHAVARZIAN, A. Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, p. 1220–1230, 2009.

TANG, Y.; FORSYTH, C.B.; BANAN, A.; CAMPOS DE JEREMY Z. E KESHAVARZIAN, A. Oats Supplementation Prevents Alcohol-Induced Gut Leakiness in Rats by Preventing Alcohol-Induced Oxidative Tissue Damage. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 329, n. 3, p. 952–958, 2009.

TERRY, L.R.R.; ANDREW, L.N.; SARAH, D.; HÉLÈNE, A.B.; TRACY, J.W.; LISA, M. Cell Viability Assay. In: Sciences BMELCatNCfAT, editor. Assay Guidance Manual, 2016.

TESTAR, X.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. Comparative metabolic effects of chronic ethanol intake and undernutrition in pregnant rats and their fetuses. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 12, n. 2, p. 197-200, 1988.

TESTINO, G.; BORRO, P.; ANCARANI, O.; ANDSUMBERAZ, A. Humancarcinogenesis and alcoholinhepato-gastroenterology. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 512– 518, 2012.

THOMA, R.; MULLINS, P.; RUHL, D.; MONNIG, M.; YO, R.A.; CAPRIHAN, A.; BOGENSCHUTZ, M.; LYSNE, P.; TONIGAN, S.; KALYANAM, R.; GASPAROVIC, C. Perturbation of the Glutamate– Glutamine System in Alcohol Dependence and Remission. **Neuropsychopharmacology**, v.36, P. 1359–1365, 2011.

TOMIE, A.; DIPOCE, J.; DERENZO, C.C.; POHORECKY, L.A. Autoshaping of ethanol drinking: an animal model of binge drinking. **Alcohol Alcohol**, v. 37, p. 138–146, 2002.

TORRES-ALEMAN, I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 384–96, 2010.

TRAN, M.N.; WU, A.; HILL, D.W. Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: potential influence on neonatal alcohol metabolism. **Toxicol Lett**, v. 169, p. 245–252, 2007.

TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 799–809, 2009.

UC, A.; VASILIAUSKAS, E.; PICCOLI, D. A.; FLORES, A. F.; DI LORENZO, C.; HYMAN, P. E. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with fetal alcohol syndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 42, p.1163– 1167, 1997.

VALKOA, M.; RHODESB, C.J.; MONCOLA, J.; IZAKOVICA, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. v. 160, p. 1–40, 2006.

VAN DYKE, D. C.; MACLCAY, L.; ZIAYLEK, E. N. Management of severe feeding dysfunction in children with fetal alcohol syndrome. **Clinical Pediatrics (Phila)**, v. 21, p. 336–33, 1982.

VAROL, C.; VALLON-EBERHARD, A.; ELINAV, E.; AYCHEK, T.; SHAPIRA, Y.; LUCHE, H.; FEHLING, H.J.; HARDT, W.D.; SHAKHAR, G.; JUNG, S. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. **Immunity**, v. 31, p. 502–512, 2009.

VAROL, C.; ZIGMOND, E.; JUNG, S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 415–426, 2010.

VILLARROYA, F.; MAMPEL, T. Glucose tolerance and insulin response in offspring of ethanol-treated pregnant rats. **General Pharmacology**, v.16, p.415–417, 1985.

WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSKI, J.K.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Cent. Eur. J. Urol**, v. 66, p. 160–67, 2013.

WALLNER, M.; HANCHAR, H. J.; OLSEN, R. W. Low-dose alcohol actions on $\alpha_4\beta_3\delta$ GABAA receptors are reversed by the behavioral alcohol antagonist Ro15-4513. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 8540–8545, 2006.

WARD, G.R.; WAINWRIGHT, P.E. Prenatal ethanol and stress in mice: Pup behavioral development and maternal physiology. **Physiol Behav**, v. 45, p. 533–540, 1989.

WARD, I. L.; WARD, O. B.; AFFUSO, J. D.; LONG, W. D.; FRENCH, J. A.; HENDRICKS, S. E. Fetal testosterone surge: specific modulations induced in male rats by maternal stress and/or alcohol consumption. **Hormones and Behavior**, v.43, p. 531–539, 2003.

WEINBERG, J.; BEZIO, S. Alcohol-induced changes in pituitary–adrenal activity during pregnancy. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 11, p. 274–280, 1987.

WILLIAMS, J.A.; NI, H.M.; DING, Y.; DING, W.X. Parkin regulates mitophagy and mitochondrial function to protect against alcohol-induced liver injury and steatosis in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 309, p. G324–G340, 2015.

WILLIS, M. S.; KLASSEN, L. W.; TUMA, D. J.; SORRELL, M. F.; THIELE, G. M. Adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) induces antibody production and enhances T-cell proliferation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 26, p. 94–106, 2002.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2011. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health, Swiss. 2014.

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 29, p. 141–154, 2009.

YANG, A. L.; VADHAVKAR, S.; SINGH, G.; OMARY, M. B. Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States. **Archives of Internal Medicine Journal**, v. 168, p. 649–656, 2008.

YOSHIDA, S.; HIYOSHI, K.; ICHINOSE, T.; TAKANO, H.; OSHIO, S.; SUGAWARA, I.; TAKEDA, K.; SHIBAMOTO, T. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. **Int Jandrology**, v. 32, p. 337–342, 2009.

YOUNG, B. W.; SENGELAUB, D. R.; STEINMETZ, J. E. MK-801 administration during neonatal ethanol withdrawal attenuates interpositus cell loss and juvenile eyeblink conditioning deficits. **Alcohol**, v. 44, n. 4, p. 359–369, 2010.

YOUNG, J. K.; GIESBRECHT, H. E.; ESKIN, M. N.; ALIANI, M.; SUH, M. Nutrition implications for fetal alcohol spectrum disorder. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, p. 675–692, 2014.

ZAKHARI, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. **Alcohol Research**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2013.

ZAKHARI, S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research & Health**, v. 29, p. 245–254, 2006.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETTO, K. P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F. R. M. B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid

hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 1, p. 98-103, 2007a.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B.S.; PESSOA- PUREUR, R. Involvement of calcium dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 77, p. 3321–3335, 2005.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, p. 98–103, 2007.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, n. 5, p. 509-515, 2009.

ZHAO, X.J.; DONG, Q.; BINDAS, J.; PIGANELLI, J.D.; MAGILL, A.; REISER, J.; KOLLS, J.K. TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. **J Immunol**. v.181, n. 5, p. 3049–3056, 2008.

ZHU, Q.; MEISINGER, J.; EMANUELE, N. V.; EMANUELE, M. A.; LAPAGLIA, N.; VAN THIEL, D. H. Ethanol exposure enhances the apoptosis within testes. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 10, p. 1550–1556, 2000.

ZHU, Q.; VAN THIEL, D.H.; GAVALER, J.S. Effects of ethanol on rat Sertoli cellfunction: studies *in vitro* and *in vivo*. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 21, p. 1409–1417, 1997.

ZHU, R.; WANG, Y.; ZHANG, L.; GUO, Q. Oxidative stress and liver disease. **Hepatology Research**, v. 42, n. 8, p. 741-9, 2012.

ZOIS, E.C.; FAVARO, E.; HARRIS, A. L. Glycogen metabolism in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, p. 3-11, 2014.