



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica

**Estudo Translacional sobre o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF):
Dados sobre o Consumo Materno, Ensaio Estruturais, Funcionais e Proteômicos
para Identificação de Moléculas que Alteram a Barreira Hematoencefálica**

Paula Silva Lacerda Almeida

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro

Outubro de 2023

**Estudo Translacional sobre o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF):
Dados sobre o Consumo Materno, Ensaio Estruturais, Funcionais e Proteômicos
para Identificação de Moléculas que Alteram a Barreira Hematoencefálica**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia
Patológica da Faculdade de Medicina da UFRJ, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Anatomia Patológica.**

**Orientadora: Joice Stipursky
Professora Associada, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ**

**Rio de Janeiro
Outubro de 2023**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica (PPGAP), sob a orientação da Professora Joice Stipursky (ICB/UFRJ). A dissertação foi desenvolvida no Laboratório Compartilhado I, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com recursos concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e *International Society for Neurochemistry* (ISN).

Almeida. Paula S. Lacerda

Estudo Translacional sobre o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF): Dados sobre o Consumo Materno, Ensaio Estruturais, Funcionais e Proteômicos para Identificação de Moléculas que Alteram a Barreira Hematoencefálica

Rio de Janeiro, 2023

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro Área de concentração: Anatomia Patológica

Orientadora: Joice Stipursky

1- Transtorno do espectro Alcoólico Fetal 2- Álcool 3- Teratogênese

5

PAULA SILVA LACERDA ALMEIDA

**Estudo Translacional sobre o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF):
Dados sobre o Consumo Materno, Ensaio Estruturais, Funcionais e Proteômicos
para Identificação de Moléculas que Alteram a Barreira Hematoencefálica**

**Dissertação de mestrado apresentada no
programa de Pós Graduação em
Anatomia Patológica na Universidade
Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)**

Aprovado por:

Professora Dra. Joice Stipursky
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dra. Valéria Ferrer
Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense

Professora Dr. Claudio Filgueiras
Instituto de Biologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Professora Dr. Pablo Trindade
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr. Ronaldo do Amaral
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professor Dra Fernanda Gubert
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

A tarefa é não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre o que todo mundo vê.” **Arthur Schopenhauer**

7

AGRADECIMENTOS

Expresso meus mais profundos agradecimentos à minha orientadora, Joice Stipursky, por acreditar em meu potencial desde o início. Sua confiança me proporcionou um mundo de oportunidades e crescimento, tanto como cientista quanto como indivíduo. Agradeço por seu entusiasmo pela pesquisa e por sua dedicação incansável na expansão de nosso trabalho no LabCom 1.

Às pesquisadoras do Labcom 1, meu sincero reconhecimento por criar um ambiente de trabalho divertido, acolhedor e inspirador. Agradeço por transformarem a sala de choro em um espaço repleto de sorrisos e cafezinhos. Mirella, Isabelle e Fernanda, nossa jornada tem sido enriquecedora, eu sou muito feliz por crescer ao lado de vocês, dia após dia, resultado após resultado.

Minha gratidão se estende à equipe externa: Professor Alex Manhães, Dr, Nilson Ramires, Dra Dayana Araújo e Juliana Minardi, pela colaboração neste projeto tão significativo, pavimentando caminhos para os próximos passos.

Não posso deixar de mencionar Daniela Azevedo, Nathalia S, Rayane S., Mayara D., Carol Borsatto e Naysla, por sempre incentivarem minha expansão, fortalecendo minhas bases e auxiliando-me a alcançar meu maior potencial. Seu apoio inabalável e lembranças constantes de que a vida vale a pena são inestimáveis. Obrigada Tata, por me enxergar de um tamanho que demorei a entender que sou. Agradeço demais a vida por ter te colocado no meu caminho.

A meus pais e irmãs, vocês por toda paciência e encorajamento constante. Elis, seu amor é poesia e enriquece minha vida de maneira mágica.

Ao PPGAP, pela organização exemplar e agilidade que facilitam nossa vida como pós-graduandos; e às agências de fomento, CAPES, FAPERJ e *ISN*, pelo suporte financeiro fundamental. Agradeço aos membros da banca que aceitaram fornecer suas valiosas contribuições tanto para este trabalho quanto para minha formação profissional.

Por fim, expresso minha gratidão a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para este trabalho. Seu apoio e dedicação foram essenciais para o alcance desses resultados. Não se faz ciência sozinha, e ainda bem <3.

8

RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação representa um grande problema de saúde pública. No mundo, cerca de 10% das mulheres relatam o consumo de álcool durante a gestação, evento que pode promover o estabelecimento dos transtornos do espectro alcoólico fetal (TEAF), sendo a síndrome alcoólica fetal (SAF), a forma mais grave, sendo caracterizada por alterações craniofaciais, restrição do crescimento corporal e alterações no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo este último um dos principais alvos dos efeitos teratogênicos do álcool. O correto funcionamento do

SNC depende da correta formação de células neurais, como os astrócitos, os quais interagem com células endoteliais vasculares, estabelecendo assim a unidade básica da barreira hematoencefálica (BHE), entretanto, pouco se sabe sobre como o etanol afeta esses eventos durante o desenvolvimento. Neste trabalho, tivemos como objetivos, coletar dados sobre a perfil de consumo de álcool durante a gestação em gestantes admitidas no Núcleo Perinatal do Hospital Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), coletar amostras de sangue de cordão umbilical de recém nascidos, cujas mães reportaram o consumo de álcool durante a gestação, realizar ensaios proteômicos a partir do soro do sangue de cordão, e avaliar os efeitos das proteínas séricas na função de células endoteliais da BHE *in vitro*. Através da entrevista com as pacientes, 27% reportaram o uso de álcool em qualquer período da gestação, sendo a maioria, no primeiro trimestre. Destas, a maioria (55%) na faixa etária dos 33-43 anos de idade. Os recém-nascidos tanto das gestantes controles quanto aquelas que reportaram o uso de álcool, não apresentaram diferenças quanto ao peso e comprimento ao nascimento. Após a coleta do sangue do cordão umbilical, isolamos o soro para tratar culturas de células endoteliais de microcapilares cerebrais humanos (HBMEC). Culturas de HBMECs tratadas com soro de pacientes expostos ao etanol (S-etanol) apresentaram uma redução de 68% nos níveis de proteínas de junção ocludentes ZO-1 e de 38% nos do transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1), em comparação às expostas ao soro de pacientes controle (S-controle). Estes eventos foram acompanhados pela perda de função de barreira com aumento da permeabilidade da monocamada endotelial, e redução da capacidade migratória destas células, quando comparado às expostas ao S-controle. A análise do perfil de proteínas relacionadas a angiogênese no meio condicionado de HBMECs , revelou alteração nos níveis destas em células tratadas com S-etanol. A análise proteômica dos soros revelou um total de 392 proteínas, com um perfil específico de proteínas exclusivamente presentes em amostras S-controle (30) ou S-etanol (10), sendo que 12, presentes em ambas as amostras, tiveram seus níveis alterados em amostras S-etanol em comparação à S-Controle. O acompanhamento das crianças após o 1 ano de vida, revelou algumas diferenças de desenvolvimento. Nossos resultados apontam a exposição ao etanol durante a gestação alcançou um número relativamente alto de gestantes especialmente durante o 1º trimestre da gestação, e que isto pode ter contribuído para alterar o perfil de proteínas presentes no soro de sangue de cordão umbilical, podendo desencadear disfunções na função e estrutura de células da BHE no cérebro em desenvolvimento e no desenvolvimento pós-natal em crianças expostas.

9

ABSTRACT

The consumption of alcoholic beverages during pregnancy represents a major public health problem. In the world, around 10% of women report drinking alcohol during pregnancy, an event that can promote the establishment of fetal alcohol spectrum disorders (FASD), with fetal alcohol syndrome (FAS) being the most severe form, characterized by craniofacial changes, restriction of body growth and changes in the development of the central nervous system (CNS), the latter being one of the main targets of the teratogenic effects of alcohol (ethanol). The correct functioning of the CNS depends on the correct formation of neural cells, such as astrocytes, which interact with vascular endothelial cells, thus establishing the

blood-brain barrier (BBB). However, little is known about how ethanol affects these events during the development. In this work, we aimed to collect data regarding the prevalence of alcohol consumption during pregnancy in pregnant women admitted to the Perinatal Center of the Pedro Ernesto Hospital (HUPE) of the State University of Rio de Janeiro (UERJ), collect umbilical cord blood samples, whose mothers reported alcohol consumption during pregnancy, perform proteomic assays using cord blood serum, and evaluate the effects of serum proteins on the function of BBB endothelial cells in vitro. Through interviews with patients, 27% reported using alcohol at any time during pregnancy, mostly in the first trimester. Of these, the majority (55%) are in the 33-43 year old age group. The newborns of both control pregnant women and those who reported alcohol use showed no differences in weight, length at birth. After collecting umbilical cord blood, we isolated serum to treat human brain microcapillary endothelial cell (HBMEC) cultures. Cultures of HBMECs treated with serum from patients exposed to ethanol (S-ethanol) showed a 68% reduction in the levels of tight junction proteins ZO-1 and a 38% reduction in glucose transporter type 1 (GLUT-1), in comparison to those exposed to serum from control patients (S-control). These events were accompanied by the loss of barrier function with increased permeability of the endothelial monolayer, and reduced migratory capacity of these cells, when compared to those exposed to the S-control. Analysis of angiogenesis related proteins profile of conditioned medium from HBMECs revealed changes in the levels of these proteins in cells treated with S-ethanol. The proteomic analysis of the sera revealed a total of 392 proteins, with a specific profile of proteins exclusively present in S-control (30) or S-ethanol (10) samples, with 12, present in both samples, presenting their levels altered in S-ethanol samples compared to S-Control. Follow up of children's development 1 year after birth, revealed differences in development. Our results indicate that exposure to ethanol during pregnancy reached a relatively high number of pregnant women, especially during the 1st trimester of pregnancy, and that this may have contributed to altering the profile of proteins present in umbilical cord blood serum, which could trigger dysfunctions in the function and structure of BBB cells in the developing brain and postnatal development in exposed children.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADH	Álcool desidrogenase (do inglês, <i>alcohol dehydrogenase</i>)
ALDH	Aldeído desidrogenase
APOA4	Aquaporina
APOF	Apolipoproteína F
AREG	Anfiregulina
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de soro bovino
C8G	Cadeia gama da proteína do complemento C8
CAT	Catalase

CEs	Células endoteliais
CL	Claudina
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
D.O	Densidade Óptica
DAPI DLL4 ETOH FGF-2 GLUT-1 GSN HBD HBMEC	<u>4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato</u> <u>Delta Like 4</u> <u>Etanol - álcool etílico</u> <u>Fator de crescimento de fibroblastos 2,</u> Transportador de glicose tipo 1 (do inglês: <i>glucose transporter type 1</i>) <u>Gelsolina</u> <u>Subunidade delta de hemoglobina</u> Células endoteliais de micro capilares cerebrais humanos (do inglês: <i>human brain microvascular endothelial cells</i>)
HPX IGFBP1 IGG IGKV1D	<u>Hemopexima</u> <u>Ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina</u> <u>1 Cadeias de imunoglobulinas</u> cadeia kappa de imunoglobulina (IgG) variável 1D-13
IGKV3	cadeia Kappa de imunoglobulina variável 3-20
IGLV3	Cadeia lambda de IgG variável 3-10
JAM	Molécula de adesão juncional (do inglês: <i>junctional adhesion molecule</i>).
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LRG1	Glicoproteína alfa 2 rica em leucina
MBMVECs	Células endoteliais microvasculares cerebrais de camundongo
MC	Meio condicionado
MC-S-Control e	Meio condicionado de soro de pacientes controle
MC-S-Etanol	Meio condicionado de soro de pacientes expostos
MEC	Matriz extracelular
MSS	Meio sem soro

NGS	soro normal de cabra
OMD	Osteomodulina
PAI-1	Serpina E1
PDGFB	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEDF	Serpina F1

11
12

Lista de Figuras

Figura 1	Traços faciais característicos da síndrome alcoólica fetal.
Figura 2	Prevalência da SAF e TEAF no mundo
Figura 3	Etapas do Desenvolvimento do Sistema Nervoso e Vascular Cerebral
Figura 4	Etapas do processo de angiogênese por brotamento
Figura 5	Sistemas de barreira do SNC.
Figura 6	Organização das junções endoteliais na BHE.
Figura 7	Representação Esquemática do Transportador GLUT-1 nas Células Endoteliais da Barreira Hematoencefálica e Seus Efeitos Regulatórios.
Figura 8	Análise da distribuição da faixa etária das gestantes participantes do estudo, com base nos formulários preenchidos durante a pesquisa.
Figura 9	Percentual de gestantes que reportaram o consumo de bebidas alcoólicas em diferentes estágios da gestação.
Figura 10	Avaliação da frequência de consumo de álcool durante a gestação e <u>período que o consumo ocorreu.</u>
Figura 11	<u>Perfil racial das mães incluídas no estudo</u>
Figura 12	Apresentação clínica dos recém-nascidos (RN)
Figura 13	Tratamento de culturas de HBMECs com soro de pacientes não altera a <u>morfologia e densidade destas células.</u>
Figura 14	HBMECs tratadas com S-etanol apresentam níveis reduzidos de proteína de junção ocludente ZO-1.
Figura 15	HBMECs tratadas com S-etanol apresentam níveis reduzidos de proteína <u>de transportadora de glicose GLUT-1.</u>
Figura 16	O tratamento de culturas de HBMECs tratadas com S-etanol induz o

	aumento da permeabilidade da monocamada endotelial.
Figura 17	O tratamento de culturas de HBMECs tratadas com S-etanol reduz o <u>índice de migração celular</u> .
Figura 18	O meio condicionado de células endoteliais tratadas com S-etanol apresenta alterações no perfil de proteínas relacionadas à angiogênese.
Figura 19	Análise diferencial de proteínas no soro do cordão umbilical de pacientes expostas ao etanol e ou não (controle).
Figura 20	Comparação das respostas do questionário entre os grupos

13

Lista de tabelas

Tabela 1: Nomenclaturas das alterações do desenvolvimento induzidas pela exposição gestacional ao álcool

Tabela 2: Análise das Entrevistas Telefônicas

14

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	
16 1.1. Exposição gestacional ao álcool e impactos para o desenvolvimento.....16	
1.1.1. Panorama global da prevalência da síndrome alcoólica fetal..... 19	
1.1.2. Em busca de biomarcadores para o diagnóstico da TEAF/SAF..... 20	
1.2. Desenvolvimento e vascularização do sistema nervoso central embrionário..... 22	
1.3. As barreiras do sistema nervoso central..... 25	
1.3.1: Barreira Hematoencefálica: estrutura e funções..... 26	
1.4. Efeitos da exposição ao álcool na BHE.....29	
2. JUSTIFICATIVA..... 31	
3. OBJETIVOS..... 32	
3.1 Objetivo geral..... 32	
3.2. Objetivos Específicos.....	
32 4. METODOLOGIA:.....	
33 4.1 - Obtenção de dados sobre a prevalência de consumo de álcool na gestação e amostras biológicas humanas.....33	
4.2 - Critério de inclusão e exclusão da seleção dos pacientes.....33	
4.3 - Coleta e processamento do sangue de cordão umbilical.....33	
4.4- APGAR.....34	
4.5 - Cultura de células endoteliais microcapilares de cerebrais humanas (HBMEC).....	
34	4.6 -
Imunocitoquímica..... 35	4.7-
Ensaio de permeabilidade endotelial em transwell..... 35	

4.8- Ensaio de migração (scratch wound assay) de células endoteliais expostas ao soro do sangue de cordão umbilical.....	36
4.9 - Preparo dos meios condicionados endoteliais de células expostas ao soro do sangue de cordão umbilical.....	36
4.10 - Ensaio de caracterização do perfil de proteínas relacionadas à angiogênese secretadas pelas células endoteliais expostas ao soro do sangue de cordão umbilical.....	
37 4.11 - Proteômica dos soros de cordão umbilical.....	37
4.12 – Follow up das crianças após o 1º ano de vida.....	39
4.13 –Análises estatísticas.....	40
5.	5.
RESULTADOS.....	41
5.1 - Estudo do perfil de consumo de álcool durante a gestação e apresentação clínica dos recém-nascidos.....	
41 5.1.1 - Avaliação da faixa etária das gestantes.....	41
5.1.2 - Avaliação da frequência de consumo de álcool na durante a gestação.....	41
5.1.3 - Avaliação da frequência de consumo de álcool durante a gestação e período do consumo.....	42
5.1.4 -Análise da diversidade racial entre as mães participantes do estudo.....	43
5.1.5 - Apresentação clínica dos recém-nascidos.....	44
5.2.1 - Avaliação morfológica de células endoteliais cerebrais humanas cultivadas em presença do soro de sangue de cordão umbilical.....	45
5.2.2 - Avaliação dos níveis e distribuição da proteína de junção ocludente ZO-1 em células endoteliais expostas ao soro de sangue de cordão umbilical.....	47
5.2.3 - Avaliação dos níveis da proteína transportadora de glicose GLUT-1 em células endoteliais expostas ao soro de sangue de cordão umbilical.....	49
5.2.4 – Avaliação funcional de células HBMECs expostas ao soro de sangue de cordão umbilical.....	51
	15
5.2.4.1 – Ensaio de permeabilidade da monocamada endotelial.....	
51 5.2.4.2 – Ensaio de migração em Scratch.....	52
5.2.4.3 – Array de proteínas relacionadas a angiogênicas secretadas por células endoteliais.....	53
5.3 -Análise Proteômica do soro de sangue de cordão umbilical.....	55
6.11 - Follow up: acompanhamento do desenvolvimento das crianças após aproximadamente 1 ano de coleta do sangue de cordão umbilical.....	
58	7-
DISCUSSÃO.....	61
7.1- Perfil de consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação: números acima da média global.....	61
7.2 - Impactos do consumo de álcool para o estabelecimento de TEAF.....	64
7.3 - Análise do desenvolvimento dos participantes do estudo.....	65
7.4 - Estudo experimental sobre os impactos das moléculas do soro de cordão umbilical na função da BHE.....	67
7.5- Estudo experimental sobre o efeito das proteínas do soro de sangue de cordão umbilical no perfil secretório endotelial.....	70
7.6 - Estudo piloto para caracterização de potenciais biomarcadores da TEAF/SAF.....	72
8- CONCLUSÕES:.....	77
9. Referências:.....	79
10- ANEXOS.....	82
	16

1- INTRODUÇÃO

1.1.Exposição gestacional ao álcool e impactos para o desenvolvimento O

consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação tem potencial de gerar disfunções relacionadas ao transtorno do espectro alcoólico fetal (TEAF), caracterizadas por déficits de altura e peso, no desenvolvimento do sistema imunológico, atrasos do funcionamento executivo, capacidade de resolução de problemas, memória de curto e longo prazo, habilidades de comunicação e atenção (Wynn et al., 2023) **É a principal síndrome de desenvolvimento fetal que envolve déficits do Sistema Nervoso Central, evitável,** afetando crianças em todo o mundo e representando um desafio significativo para a saúde pública (Popova et al, 2023). O período de exposição ao álcool durante a gestação não é o único fator determinante do TEAF\SAF, diferentes concentrações, padrões de ingestão de álcool podem desencadear efeitos variados em indivíduos, além de fatores genéticos, estilo de vida e fatores pré-concepção, como variação genética parental, alelos influenciadores ou protetores e fatores epigenéticos envolvidos com o esperma, podem influenciar as características dos indivíduos (McQuire et al., 2019). O TEAF engloba diferentes graus de características (**Tabela 1**) e seu diagnóstico se inicia a partir da confirmação de consumo de álcool por auto relato materno. De grau menos grave, termo defeitos congênitos relacionados ao álcool (DCRA), é usado para descrever crianças com fenótipos menos graves, com comprometimento neurocomportamental, mas sem retardo de crescimento e sem estrutura ou disfunção cerebral(Riley et al 2011). O termo Exposição Alcoólica Fetal (EAF), destina-se a crianças com crescimento e desenvolvimento estrutural normais que exibem um padrão característico de distúrbios faciais, anormalidades comportamentais ou cognitivas típicas da exposição pré-natal ao álcool (Riley et al 2011) A Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) denota o padrão mais grave, caracterizada por malformações, deficiência de crescimento (comprimento e/ou peso) pré e pós natal, um padrão específico de anomalias faciais e alterações neurocognitivas. (Riley et al 2011)

Critério de diagnóstico	
SAF EAF DCRA	
A- Exposição pré-natal ao álcool confirmada	Obrigatória

B-Dismorfia facial ✓ ✓ X
C- Restrição do crescimento ✓ X X
D- Alterações do desenvolvimento do SNC ✓ X X

E- Déficits cognitivos e comportamentais ✓ ✓ ✓

Tabela 1. Nomenclaturas das alterações do desenvolvimento induzidas pela exposição gestacional ao álcool. SAF: Síndrome alcoólica fetal; EAF: Exposição alcoólica fetal; DCRA: defeitos congênitos relacionados ao álcool (adaptado de Riley et al, 2011).

Atualmente, existem quatro esquemas de diagnóstico amplamente utilizados: Astley e Clarren, 2000 - código de 4 dígitos; Bertrand et al., 2004, 2005 - National Task Force/CDC; Chudley et al., 2005 - Diretrizes Canadenses; Hoyme et al., 2005 - IOM (Riley et al, 2011).

Apesar das diferenças entre esses esquemas, todos analisam três áreas distintas: deficiência de crescimento pré-natal e/ou pós-natal, disfunção do sistema nervoso central (SNC) e um padrão característico de anomalias faciais, que desempenha um papel crucial no diagnóstico da SAF (Moore et al., 2015) e engloba a análise das seguintes características:

- Fenda palpebral curta: Bebês afetados pela SAF podem apresentar fendas palpebrais, os espaços entre as pálpebras superiores e inferiores, mais curtas do que o normal.
- Filtro liso: A região entre o nariz e o lábio superior, conhecida como filtro, pode ser lisa e pouco definida em crianças com SAF, resultando em um perfil facial achatado.
- Sulco nasolabial reduzido O sulco nasolabial, a linha que se estende do nariz aos cantos da boca, pode ser menos pronunciado ou ausente em bebês com SAF.

- Hipoplasia maxilar: subdesenvolvimento da maxila, conferindo ao ao rosto uma aparência achatada.

- Hipoplasia do lábio superior: O lábio superior pode ser mais fino e menos desenvolvido em bebês afetados pela SAF.

Figura 1. Traços faciais característicos da síndrome alcoólica fetal. (Popova et al 2023).

No contexto de condições clínicas complexas, o diagnóstico nem sempre ocorre de forma precoce e muitas vezes, a identificação acontece após os primeiros anos de vida, durante a fase pré-escolar. É nessa etapa que déficits de aprendizado e alterações comportamentais e cognitivas podem se tornar mais evidentes (May et al., 2018).

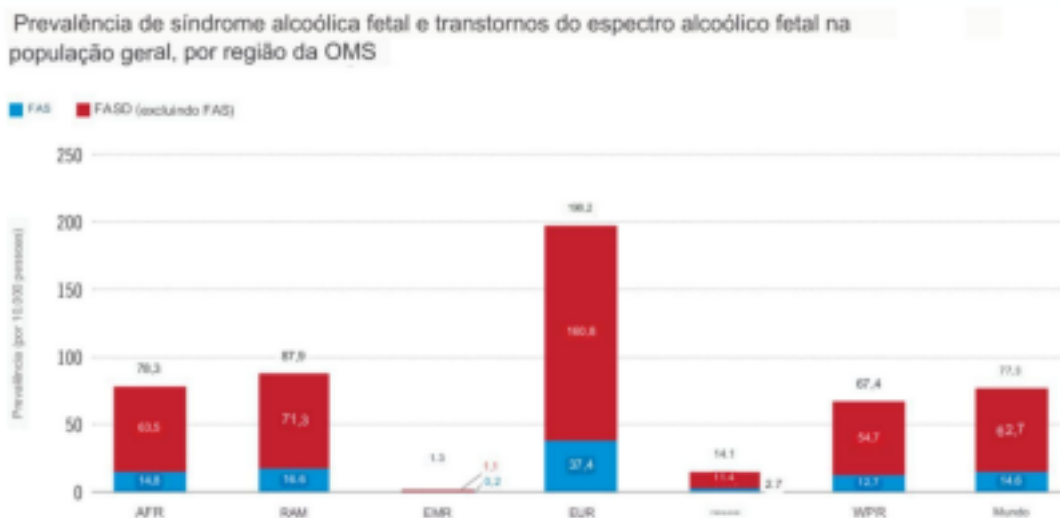
Os impactos significativos do consumo de álcool durante a gravidez no desenvolvimento do embrião e do feto estão intrinsecamente ligados ao fato da rápida passagem do etanol pela barreira placentária. Nesse estágio crucial, é importante destacar que as enzimas ADH (álcool desidrogenase) e ALDH (aldeído desidrogenase), responsáveis pelo metabolismo do etanol, ainda não estão ativamente expressas nos tecidos do feto. Isso resulta em uma prolongada exposição ao agente teratogênico, levando ao acúmulo de álcool nos tecidos fetais por longos períodos (Bager et al., 2017).

As disfunções, persistem durante toda a vida do indivíduo, não existindo tratamento específico, além de apresentarem efeitos secundários, como: problemas de saúde mental, experiência escolar interrompida, problemas com a lei, comportamento sexual inadequado e problemas com álcool e outras drogas (Guerri et al, 2009).

ingerida durante a gravidez pode ser considerada segura, não havendo trimestre seguro

ntam um

do com
 ie cerca
 z,
 além
 ndo a
 figura



Dados obtidos de Popova et al., 2017
 AFR = Região Africana; Região AMR das Américas;
 EMR = Região do Mediterrâneo Oriental; EUR = Região Europeia;
 SEAR= Região Sudeste Asiático; Região do Pacífico Ocidental WPR.
 SAF = síndrome alcoólica fetal;
 TEAF = transtornos do espectro alcoólico fetal.

Figura 2. Prevalência da SAF e TEAF no mundo. O gráfico descreve a prevalência relacionada ao número de casos de SAF (azul) e TEAF (vermelho) a cada 10.000 indivíduos fetal na população em diferentes regiões do mundo). AFR = Região Africana; Região AMR das Américas; EMR = Região do Mediterrâneo Oriental; EUR = Região Europeia; SEAR= Região Sudeste Asiático; Região do Pacífico Ocidental WPR(adaptado de Popova et al., 2017).

Embora esta estimativa possa servir para compreender a prevalência e os impactos da TEAF/SAF de forma global, em países com menor desenvolvimento econômico e recursos de saúde limitados, estas condições pode ser subdiagnosticadas, devido ao escasso acesso a serviços médicos e a falta de ações de saúde pública, resultando em um negligenciamento da TEAF/SAF.

No Brasil não existem dados estatísticos oficiais de prevalência da SAF, mas estudos

pontuais e regionais destacam o consumo de álcool entre gestantes em diferentes regiões brasileiras. Um estudo realizado no Rio de Janeiro revelou que 40,6% das gestantes estudadas consumiram álcool em algum momento durante a gravidez, enquanto 10,1% continuaram a fazê-lo até o final da gestação. Em São Paulo, outro estudo com pessoas em vulnerabilidade relatou que 33,3% das gestantes consumiam álcool em algum momento da gestação, com 21,4% continuando o consumo durante toda a fase gestacional. Já em Minas Gerais, o estudo de 2017 apontou que 23,1% das gestantes ingeriram álcool em algum momento da gestação, e 6,1% continuaram o consumo até o final da gravidez (Aparecida et al., 2017).

Em 24 de outubro de 2014, aprovou-se a lei nº 291/16 na cidade de Presidente Prudente. Essa legislação estabeleceu que todos os estabelecimentos que comercializam bebidas alcoólicas, abrangendo restaurantes, lanchonetes, bares e hotéis, determinando que deve ser exibir cartazes informativos, com a seguinte advertência: "Prevenção da Síndrome Alcoólica Fetal: a ingestão de álcool durante a gestação pode prejudicar a saúde do feto".

Considerando que a SAF é uma condição evitável, o estabelecimento de políticas públicas e programas de educação e conscientização são fundamentais para reduzir a incidência dessa síndrome no Brasil e no mundo. A necessidade de um diagnóstico precoce e preciso, tem levado a avanços na pesquisa de biomarcadores. Além disso, o acesso a serviços de saúde adequados e a sensibilização dos profissionais de saúde para identificar também são essenciais para mitigar os efeitos negativos dessa condição.

1.1.2. Em busca de biomarcadores para o diagnóstico da TEAF/SAF Como mencionado anteriormente, o diagnóstico da TEAF/SAF baseia-se em características corporais específicas que podem ou não estar presentes ao nascimento, ou ainda surgirem mais tarde ao longo do desenvolvimento do indivíduo. Em contraste com muitas condições patológicas, não existe um "padrão ouro" para o diagnóstico de TEAF/SAF, incluindo exames bioquímicos ou de imagem que possam determinar a evidência da SAF (Cook et al., 2015).

Biomarcadores representam ferramentas cruciais para entender a exposição ao álcool durante a gravidez e seus impactos no desenvolvimento fetal. A identificação de biomarcadores específicos associados ao Transtorno do Espectro do Álcool Fetal (TEAF)

abre caminho para a detecção precoce da síndrome e para a implementação de intervenções mais eficazes, visando aprimorar o prognóstico de crianças afetadas (Popova et al., 2018).

A caracterização de um biomarcador sensível e específico possibilitaria o acompanhamento precoce por profissionais de saúde, contribuindo para o desenvolvimento adequado do indivíduo e permitindo intervenções destinadas a reduzir e melhorar as consequências adversas a longo prazo. Embora atualmente haja poucos avanços no estabelecimento de um biomarcador oficial, algumas pesquisas exploram sangue, cabelo, urina e meconio para análise biológica (Cook et al., 2015).

O biomarcador fosfatidil etanol (Peth) é um marcador específico da exposição ao álcool e tem sido estudado como uma ferramenta potencial para o diagnóstico de SAF e outras condições relacionadas à exposição ao álcool. O Peth se forma quando o álcool é metabolizado no organismo. Ele pode ser detectado em amostras biológicas, como sangue seco, urina, cabelo e meconio, fornecendo informações sobre a exposição pré-natal ao álcool. Vários estudos têm investigado a eficácia do Peth como biomarcador por ser uma molécula resultado do metabolismo do álcool, além de ter uma meia-vida longa em comparação com o etanol no sangue, permitindo uma janela de detecção mais ampla após a exposição (Hakim et al 2016).

A disponibilidade da amostra é um fator de extrema importância ao considerarmos a análise de biomarcadores. Vale ressaltar que o **sangue do cordão umbilical (SCU)** apresenta grande potencial para fornecer informações valiosas sobre a saúde fetal. Além disso, sua obtenção é fácil e conveniente em recém-nascidos, tornando-o uma base ideal para estudos preliminares. No futuro, essa amostra pode ser comparada com o sangue de adultos, uma vez que ainda estamos explorando seu potencial diagnóstico em relação a diversas doenças. **Um estudo realizado em 2012 por Hansmeier e sua equipe fez um avanço importante nesse campo. Eles analisaram as proteínas do SCU e descobriram que 25% delas já tinham sido encontradas no sangue de adultos (Hansmeier, et al., 2012). Esse estudo nos ajudou a entender melhor o que está no sangue do cordão umbilical e como ele pode ser usado para detectar problemas de saúde, como o impacto do consumo de álcool.**

Analisar o sangue de cordão umbilical é buscar compreender a via de comunicação

entre a circulação materna e fetal, o transporte de metabólitos e nutrientes essenciais

22

para o crescimento e desenvolvimento, incluindo a formação do SNC. Nesse contexto, é fundamental aprofundarmos nosso entendimento sobre a complexidade da formação do sistema nervoso embrionário, compreendendo seus processos e etapas. Esse conhecimento nos ajuda a desvendar os mecanismos do desenvolvimento e como o álcool pode afetar essas etapas.

1.2. Desenvolvimento e vascularização do sistema nervoso central embrionário.

O SNC desempenha funções essenciais para o funcionamento do organismo como: processamento de informações sensoriais, motoras, controle das funções autônomas, processamento de informações cognitivas e comportamentais dentre outras funções. Para tanto, a correta formação das células e o estabelecimento das interações entre os diferentes tipos celulares que compõem este sistema é fundamental (Hernández et al 2006).

O SNC inicia seu desenvolvimento a partir da placa neural, derivada do ectoderma, e por toda a 3ª semana do desenvolvimento se modifica através da neurulação, um evento essencial em que o tubo neural é formado. Em humanos, a neurulação ocorre aproximadamente 28 dias após a concepção (Blom et al., 2019).

Em momentos precoces do período embrionário, precursores de células endoteliais, chamados angioblastos, são recrutados do mesoderma, formando uma rede vascular primitiva. Durante a neurulação o tubo neural ainda não é vascularizado, mas envolvido na superfície externa por um plexo vascular perineural (PVNP) formado por vasos sanguíneos imaturos. Em paralelo com o desenvolvimento subsequente do tubo neural e conforme este se especializa, células endoteliais derivadas do PVNP iniciam um processo de invasão do tecido neural, permitindo o crescimento e expansão da vasculatura para o interior deste tecido por um processo conhecido como angiogênese. A complexa interação entre o desenvolvimento do SNC e a vascularização é fundamental para a formação adequada do SNC e para o correto funcionamento do cérebro ao longo da vida. (Peguera et al 2021)

Simultaneamente à vascularização do tubo neural, as células neuroepiteliais transformam-se em células de glia radial (GR), progenitoras neurais responsáveis por dar origem aos neurônios e células gliais do SNC (Stipursky et al., 2007, 2012, Siqueira et al.,



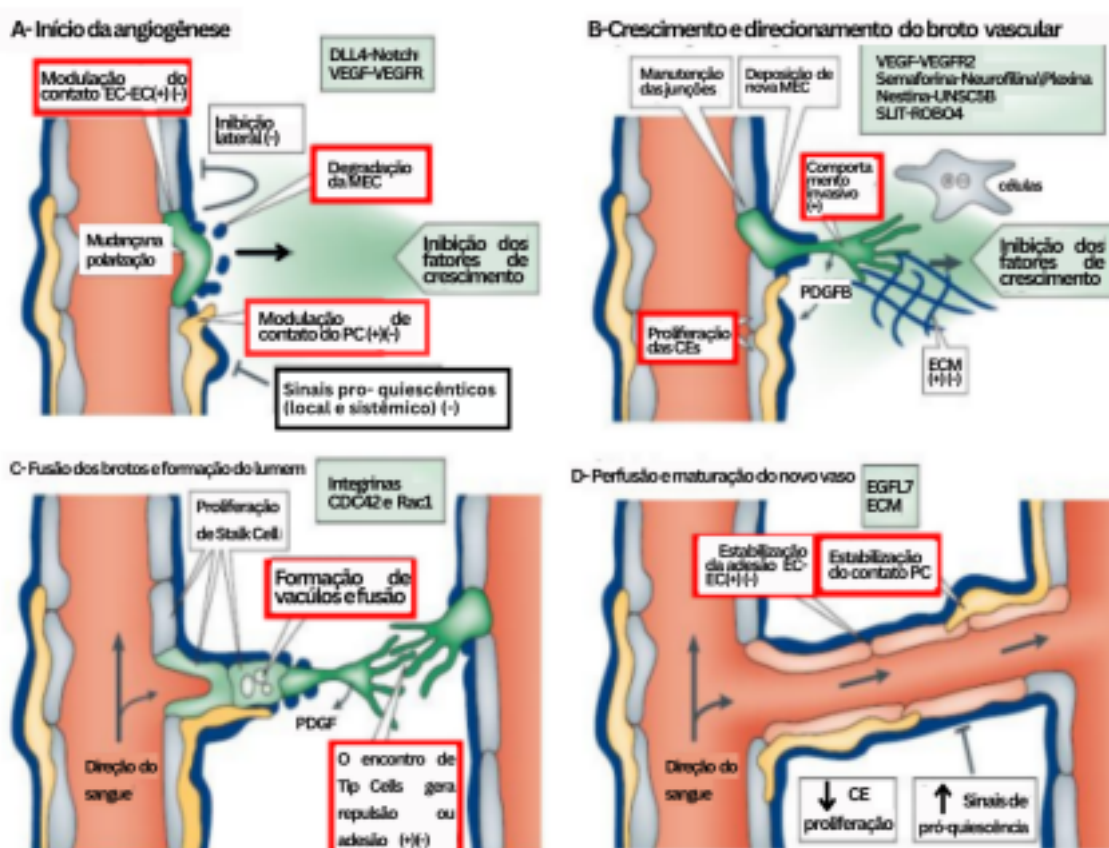
Figura 3. Etapas do desenvolvimento do sistema nervoso e vascular cerebral (A-C) Caracterização das estruturas do tubo neural. (D) Invasão de vasos sanguíneos a partir do plexo perineural para o interior do SNC embrionário e interação das células endoteliais “tip cells” com células progenitoras de glia radial. (E) Ramificação vascular por angiogênese e sua interação com neurônios presentes nas camadas corticais em desenvolvimento (F) Detalhe das interações entre os ramos vasculares e neurônios no córtex pós natal (editado e traduzido, Walchli et al., 2015).

O processo de vascularização do tecido neural embrionário é altamente dependente de um mecanismo ativo conhecido como angiogênese. Este processo complexo envolve a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A regulação desse processo é intrinsecamente complexa e altamente coordenada. Inicialmente, os sinais de moléculas como Delta-Like 4 (DLL4) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) desencadeiam uma série de eventos, incluindo a reorientação de células endoteliais específicas e a degradação da matriz extracelular

(MEC) dos vasos sanguíneos, resultando em uma resposta de permeabilidade vascular (Figura 4A).(Adams & Alitalo, 2007).

Na segunda etapa, impulsionada por fatores como VEGF, Semaforinas e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Tipo B (PDGFB), ocorre a proliferação das células endoteliais (CEs) e das células que liberam fatores de crescimento, o que desencadeia o processo de brotamento e crescimento vascular (Figura 4B). Durante essa fase, células "stalk" e células "tip" direcionam e estabilizam o broto vascular, levando à formação de vacúolos e à fusão dos brotos com estruturas vasculares vizinhas (Figura 4C).(Adams &

Alitalo,
2007).



(Adams RH. & Alitalo K., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; Muñoz-Chapuli et al., Cell. Mol. Life Sci., 2004)

Finalmente, o processo culmina com a estabilização do novo vaso sanguíneo, resultando na redução da proliferação das células endoteliais e no retorno aos sinais de

repouso (quiescência) (Figura 4D). Esse estágio finaliza o processo de angiogênese (Adams & Alitalo, 2007).

Figura 4. Etapas do processo de angiogênese por brotamento: (A) Início da angiogênese; (B) Crescimento e direção do broto vascular; (C) Fusão dos brotos e formação do lúmen; (D) Perfusão e maturação do novo vaso. (Adams & Alitalo, 2007).

25

1.3. As barreiras do sistema nervoso central.

As trocas de moléculas, como nutrientes, hormônios, metabólitos, gases, dentre outras, entre o tecido neural e os fluidos como o sangue e o líquido céfalo-raquidiano (LCR) ocorre através do estabelecimento de diferentes sistemas de barreiras localizados em regiões específicas do SNC: a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (LCR), formada pelas células epiteliais do plexo coróide voltadas para o LCR, relacionadas aos ventrículos encefálicos; a barreira aracnóide avascular que envolve completamente o SNC sob a dura-máter, relacionada às meninges cerebrais; e a barreira hematoencefálica (BHE), formada pela vasculatura inserida no parênquima do tecido neural (Zarekiani et al., 2022).

A BHE é uma interface altamente seletiva entre o sangue e o cérebro, desempenhando um papel essencial na manutenção de um ambiente ideal para a função e homeostase do SNC (Dannemann et al., 2016). Essa função é resultado de uma complexa associação dos pés terminais dos astrócitos que envolvem os vasos sanguíneos, formado por células endoteliais, controlando o fluxo paracelular com o auxílio de pericitos e membrana basal (Ladecola et al., 2017).

Para que a barreira hematoencefálica seja funcional, todos os componentes devem interagir adequadamente: as células endoteliais neurais formam adesões entre si, que selam o espaço paracelular, criando uma barreira contínua, enquanto os astrócitos, pericitos e a membrana basal envolvem as células endoteliais, oferecendo suporte e regulando a permeabilidade vascular (**Figura 5**) (Dong et al., 2018).

26

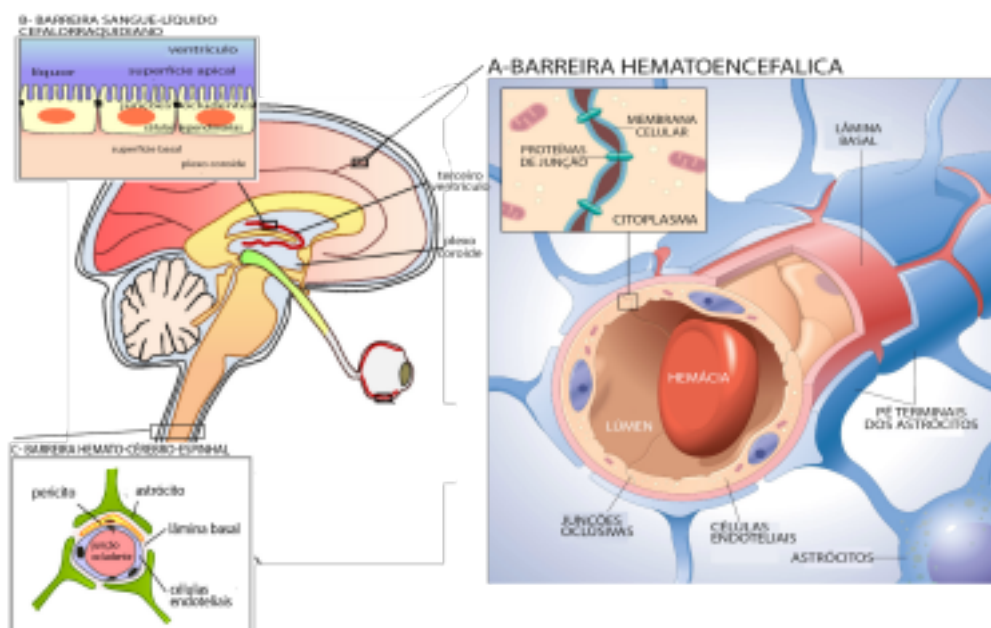


Figura 5. Sistemas de barreira do SNC. (A) As células ependimárias do plexo coróide estão unidas por junções ocludentes, formando a barreira sangue-LCR. (B) O endotélio da BHE é altamente especializado e cercado pelos prolongamentos (pés) terminais dos astrócitos, lâmina basal e pericitos (não mostrado). As células endoteliais da BHE expressam proteínas de junção ocludente que restringem o fluxo de moléculas e células entre o sangue e o tecido neural. (C) A barreira hemato-medular é formada por microvasos altamente diferenciados rodeados por pericitos e pés terminais de astrócitos presentes na substância branca da medula espinal (Adaptado e traduzido (Choi & Kim, 2008).

1.3.1: Barreira Hematoencefálica: estrutura e funções

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura complexa formada pela

comunicação entre as CE, membrana basal, pericitos e astrócitos, cujos pés terminais envolvem o endotélio vascular, formando esta estrutura (Hawkins et al., 2006). As CEs formam a parede dos vasos sanguíneos e apresentam como característica principal uma alta seletividade, sendo responsáveis pela integridade e permeabilidade da BHE (Balda et al., 1996). A integridade da BHE é configurada pela presença de proteínas de junções ocludentes associadas à membrana plasmática de células adjacentes como claudinas, ocludinas (ZO) e moléculas de adesão juncional (JAMs) (Luissint et al., 2012).

A ocludina é uma proteína transmembranar que contém quatro domínios transmembranares e possui um domínio C-terminal que se liga diretamente às proteínas ZO, citoplasmática, que, por sua vez, interagem com o citoesqueleto de actina (Furuse et al. 2021). As JAMs também desempenham um papel importante na função de barreira das junções ocludentes e no desenvolvimento da polaridade das células epiteliais

27

(**Figura 6**) (Martin-Padura et al., 1998). Essas moléculas estão frequentemente associadas ao recrutamento de outras proteínas de ligação intracelular, como ZO-1, AF-6, CASK, PAR-3 e MUPP-1 (Ebnet et al., 2004). Além de sua função de barreira, as JAMs parecem também estar envolvidas no controle da angiogênese. Estudos mostraram que a inibição de JAM-A reduz a proliferação induzida pelo fator de crescimento transformante beta 2 (TGF β) 2 e a migração de células endoteliais, evidenciando seu papel na regulação desses processos relacionados ao desenvolvimento vascular (Shi J; et al., 2018).

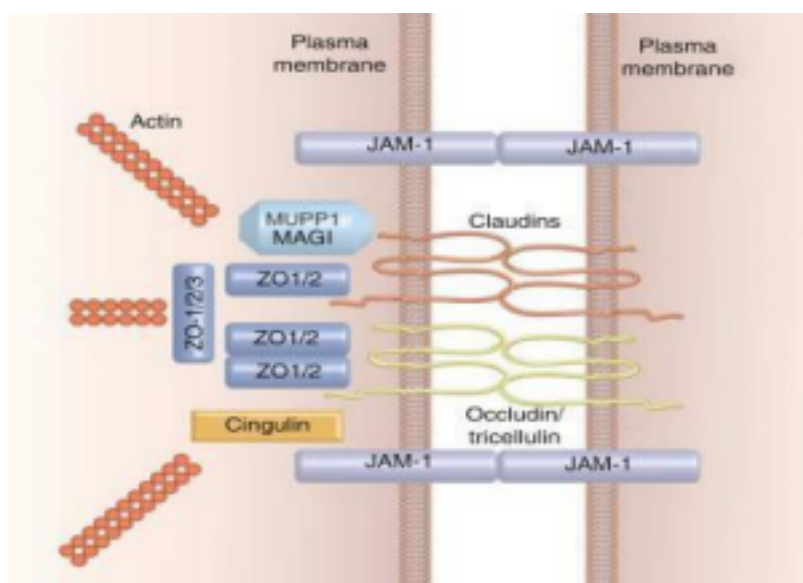


Figura 6. Organização das junções endoteliais na BHE. As principais proteínas de junções ocludentes enriquecidas no endotélio vascular do SNC incluem três famílias de proteínas transmembrana: ocludina, claudinas e moléculas de adesão juncional e algumas famílias de proteínas de membrana intracelular periférica, como zonula ocludente, que conectam as moléculas transmembrana ao citoesqueleto de filamentos de actina (Niessen et al , 2007).

A proteína ZO-1 desempenha um papel crucial na formação das junções ocludentes presentes em células epiteliais e endoteliais. Ela se conecta ao citoesqueleto através de proteínas citoplasmáticas da família MAGUK, como ZO-1, ZO-2 e ZO-3 (Hawkins e Davis, 2005). Um estudo demonstrou que camundongos knockout para ZO-1 não produziram embriões viáveis além do estágio E 11.5. Durante o desenvolvimento embrionário, observou-se apoptose significativa em regiões como a notocorda, tubo neural e o alantóide no dia embrionário E 9,5. Além disso, a falta de ZO-1 no saco

28

vitelínico resultou em defeitos no desenvolvimento vascular, afetando a formação de árvores vasculares e causando uma fusão corioalantóica defeituosa (Katsuno T, et al. 2008).

Além das características das junções oclusivas encontradas nas células endoteliais da BHE, o suprimento de energia necessário para o SNC ocorre principalmente por meio do transporte controlado de nutrientes do sangue para o tecido neural. Isso se deve ao fato de que as funções do SNC dependem em grande parte do metabolismo glicolítico (Figura 7). A glicose desempenha um papel crucial como uma fonte significativa de energia

nesse contexto. No entanto, devido à sua natureza hidrofílica, requer transportadores para atravessar as barreiras formadas pelas junções nas membranas plasmáticas. O Transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) é a isoforma predominantemente expressa nas células endoteliais da BHE. No entanto, também pode ser encontrado em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, e essas células também podem expressar outras isoformas do transportador (Koepsell, H, et al. 2020).

Em 1991, pesquisadores caracterizaram a síndrome de deficiência de GLUT1, que se manifesta com características como atraso no desenvolvimento neurológico, desaceleração no crescimento da cabeça, aquisição de microcefalia, incoordenação motora e espasticidade (Koepsell, H, et al. 2020). Essa síndrome destaca a importância do GLUT-1 no transporte de glicose para o cérebro e seu impacto no desenvolvimento neurológico.

Figura 7. Relevância do transportador GLUT-1 nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e seus efeitos regulatório: As células endoteliais são altamente glicolíticas e geram a maior parte de sua energia através da quebra da glicose em lactato. Ao mesmo tempo, o papel principal dos CE é permitir o transporte de glicose para os tecidos circundantes. GLUT1 é altamente expresso em

29

CEs do sistema nervoso central e é frequentemente implicado na disfunção da barreira hematoencefálica (adaptado de Veys, et al 2020).

1.4. Efeitos da exposição ao álcool na BHE

Ao entendermos toda a complexidade do desenvolvimento do SNC, é importante estudarmos os danos causados pela exposição pré-natal ao álcool e seus impactos significativos no desenvolvimento do SNC. Durante o período fetal, o SNC está em um estágio crucial de formação, e alterações nesse processo podem resultar em uma variedade de defeitos congênitos ou até mesmo interromper completamente a gravidez,

caso as malformações sejam graves (Caputo C et al., 2016) Uma característica importante que torna o SNC em desenvolvimento vulnerável à exposição ao álcool é a menor atividade enzimática responsável por metabolizar o etanol nos tecidos fetais em comparação com adultos (Gupta et al., 2016). Como resultado, as concentrações de etanol podem permanecer mais altas e por mais tempo no feto, o que aumenta o risco de danos celulares.

No SNC o etanol e seus metabólitos são tóxicos, e o estresse oxidativo, relacionado aos elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), já foi demonstrado alterar a integridade de células que compõem a BHE (Pamela et al., 2009; Haorah et al., 2005). A citotoxicidade induzida pelo etanol pode levar neurônios e células progenitoras à apoptose, causando possíveis alterações corticais, podendo resultar em microcefalia, hipoplasia do córtex cerebral, [FALAR DE MIGRAÇÃO CELULAR] corpo caloso, hipocampo, dentre outras, que em último caso afetam a cognição e comportamento (Koop et al., 2006). O estresse oxidativo também contribui para o dano da BHE através do óxido nítrico, que pode levar à inflamação e comprometer a função da barreira. A inflamação resulta em alterações na estrutura e função da BHE, incluindo a ativação das células gliais e recrutamento de leucócitos (Varatharaj et al., 2017), eventos previamente relacionados a alteração nos níveis e organização de proteínas de junções ocludentes como ocludina e claudina-5 (Spindler et al., 2012). Estudos também mostraram que os metabólitos do álcool, como o acetaldeído, e o aumento do estresse oxidativo contribuem para o aumento da permeabilidade das células endoteliais do cérebro (Haorah et al., 2005).

Além dos efeitos do álcool na permeabilidade endotelial, o etanol também pode afetar os níveis e a atividade de transportadores de nutrientes como GLUT-1. Um estudo

30

específico utilizando camundongos *knockouts* para o GLUT1 descreveu a letalidade dos embriões não maior que o dia embrionário 14 (Wang et al., 2006).

Recentemente, nosso grupo demonstrou, em modelo murino de TEAF, que a exposição gestacional ao álcool, resultou em mudanças no desenvolvimento neurovascular e nas interações neurogliais no córtex cerebral. Demonstramos que fêmeas de camundongos suíços expostas ao etanol do dia 14 ao dia 19, geram camundongos com restrição do peso corporal e redução das camadas corticais, o que

corresponde ao eventos observados no final do primeiro trimestre. Além disso, observou-se uma hipervascularização cortical, com vasos sanguíneos permeáveis e distribuição aberrante de proteínas ZO-1 e claudina 5. *In vitro*, foi demonstrado que a exposição HBMECs expostas ao tratamento com álcool em diferentes concentrações, reduzem a expressão dos genes de ZO-1, Claudina 5 e GLUT-1, o que também foi acompanhado pela redução de captação de glicose por estas células. As células astrocíticas expostas ao secretoma de HBMECs expostas ao etanol também apresentaram um perfil de secreção de proteínas angiogênicas alterada, o que induziu diretamente a reatividade astrocítica (Siqueira, et al 2021).

31

2. JUSTIFICATIVA

É crucial ampliar nosso entendimento dos efeitos teratogênicos do álcool. Apesar de termos publicações sobre esse assunto há pelo menos 50 anos e a conscientização sobre o tema ter aumentado desde então, pouco foi alcançado para mitigar efetivamente os danos do uso de álcool durante a gravidez. Além disso, ainda não existe uma ferramenta diagnóstica universalmente aceita (Can et al 2019).

A presente dissertação surge como uma continuação das investigações conduzidas pelo nosso grupo de pesquisa, focadas nos impactos da exposição ao álcool durante a gestação, uma simulação do Transtorno do Espectro do Álcool Fetal (TEAF), em modelos animais. Nossa pesquisa anterior proporcionou um marco significativo, trazendo à luz pela primeira vez evidências concretas das profundas modificações desencadeadas tanto *in vivo* quanto *in vitro* pela exposição ao álcool.

Há uma série de razões fundamentais que nos motivam a avançar com este estudo. Em primeiro lugar, existe a necessidade premente de desvendar as complexas interferências do álcool nos processos celulares e moleculares que constituem a Barreira Hematoencefálica (BHE). Essa compreensão é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e intervenção no Transtorno do Espectro do Álcool Fetal (TEAF).

Em segundo lugar, esta pesquisa adota uma abordagem translacional, estabelecendo uma correlação entre dados clínicos e experimentos *in vitro*. Essa ligação entre a pesquisa científica e sua aplicação prática é um pilar do progresso, que permite a análise de amostras humanas que representam nossa população, tornando nossas descobertas

ainda mais significativas e aplicáveis.

Em resumo, esta dissertação representa um esforço incansável para desvendar a relação entre o álcool e a saúde cerebral fetal. Seu valor vai além da pesquisa acadêmica, pois tem o potencial de gerar impactos positivos e tangíveis na vida das pessoas, particularmente daquelas que enfrentam os desafios complexos impostos pelo TEAF.

32

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto é investigar como o consumo de álcool durante a gravidez influencia as células endoteliais que compõem a barreira hematoencefálica (BHE). Buscaremos identificar biomarcadores que possam indicar as mudanças causadas pelo consumo de álcool durante a gestação e entender os processos biológicos envolvidos nas disfunções da BHE. Em resumo, nosso objetivo é esclarecer os efeitos do álcool na BHE durante a gravidez e identificar marcadores e vias relacionadas a essas alterações.

3.2. Objetivos Específicos

a) Descrever a prevalência de consumo de álcool durante a gestação por gestantes admitidas em um hospital da rede pública de saúde na cidade do Rio de Janeiro, por meio de entrevistas com as pacientes;

b) Analisar a apresentação clínica dos recém-nascidos de mães que reportaram ou não o consumo de álcool durante a gestação e coletar o sangue de cordão umbilical para isolamento do soro;

c) Analisar os impactos do tratamento de culturas de células endoteliais cerebrais humanas (HBMECs) exposta á moléculas do soro de cordão umbilical e analisar a intensidade de marcação e organização de proteínas da barreira como ZO-1 e GLUT-1 por imunocitoquímica;

d) Analisar os impactos do tratamento de culturas de HBMECs ao soro de pacientes e realizar ensaios funcionais de permeabilidade da monocamada endotelial ao corante azul de Evans e de migração celular, por *scratch wound assay*;

e) Realizar ensaios de caracterização do perfil de proteínas relacionadas a

angiogênese secretadas por HBMECs em resposta ao tratamento com os soros; f) Identificar as proteínas presentes no soro de sangue cordão umbilical por meio de ensaios de Proteômica, para caracterização das proteínas mais e menos abundantes. g) Realizar o *follow up* das crianças incluídas no estudo com 1-1,5 anos após a coleta da amostra biológica para acompanhar o estabelecimento de marcos do desenvolvimento motor, cognitivo e sensorial.

33

4. METODOLOGIA:

4.1 - Obtenção de dados sobre a prevalência de consumo de álcool na gestação e amostras biológicas humanas.

Para a realização deste projeto, estabelecemos uma colaboração com a equipe de Obstetrícia e Pediatria do Núcleo Perinatal do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. Nilson Ramires de Jesus, médico, Professor Associado da UERJ. Nossa abordagem incluiu o desenvolvimento de um questionário específico que foi aplicado às pacientes gestantes admitidas no núcleo de obstetrícia do HUPE. Por meio deste questionário, coletamos dados importantes sobre a prevalência do consumo de álcool durante a gestação, momento em que o consumo ocorreu e faixa etária das gestantes (**anexo 1**). A aplicação dos formulários ocorreu entre 24/11/2021 e 08/04/2022. Todas as pacientes participantes autorizaram o uso dos dados coletados, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Estes procedimentos foram realizados através da aprovação do comitê de ética do HUPE (CEP: 4.667.085).

4.2 - Critério de inclusão e exclusão da seleção dos pacientes.

Para a seleção das participantes deste estudo, aplicamos critérios rigorosos de exclusão, como doenças infecciosas ou pré-existentes, bem como uso de outras drogas de abuso. Isso garantiu que nossa amostra biológica, coletada para os estudos *in vitro* deste trabalho, fosse representativa e livre de fatores de confusão. As participantes foram divididas em dois grupos distintos: o grupo "Controle", composto por mães que relataram não ter consumido álcool durante a gestação, e o grupo "Exposto", formado por mães que admitiram ter consumido álcool durante o período gestacional. Essa seleção resultou em um total de 5 pacientes no grupo Controle e 4 pacientes no grupo Exposto, a partir das quais pudemos coletar amostras de sangue de cordão umbilical ao nascimento, bem

como realizar estudos de *follow up* do desenvolvimento das crianças após o 1º ano de vida.

4.3 - Coleta e processamento do sangue de cordão umbilical

Após a seleção das pacientes dos grupos de interesse, procedemos com a coleta de amostras de SCU no momento do parto. Utilizamos tubos hematológicos contendo gel ativador de coágulo, especialmente projetados para a obtenção do soro. Após a coleta, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por até 30 minutos para permitir a

34

ativação da coagulação do sangue. Em seguida, foram armazenadas a 4°C por até 12 horas. Após o período de armazenamento, as amostras foram submetidas à centrifugação a 1000g por 10 minutos. O soro foi cuidadosamente coletado e aliqotado em tubos eppendorfs estéreis e armazenado em freezer -80°C. Estas amostras foram utilizadas em ensaios *in vitro* e também para caracterização por proteômica..

4.4- APGAR

O índice de APGAR avalia cinco sinais vitais do recém-nascido, é medido no primeiro e quinto minutos após o nascimento. Cada um dos cinco sinais é pontuado de 0 a 2, totalizando uma pontuação máxima de 10. Os sinais vitais avaliados são: Frequência cardíaca (pontuação 2 se a frequência cardíaca for maior que 100 batimentos por minuto, 1 se for menor e 0 se estiver ausente); Esforço respiratório (pontuação de 2 se o bebê chorar vigorosamente, 1 se a respiração for irregular ou lenta e 0 se não houver respiração); Tônus muscular (pontuação 2 se o bebê tiver bom tônus muscular, 1 se tiver tônus reduzido e 0 se estiver flácido); Reflexo de irritabilidade (pontuação de 2 se o bebê chorar e resistir ao estímulo, 1 se chorar apenas em resposta ao estímulo e 0 se não houver resposta); Cor da pele (pontuação de 2 se a cor for rosada, 1 se a cor for pálida e 0 se houver coloração azulada). Pontuação 7 a 10, representam os bebês em boas condições e com boa adaptação ao nascimento. Pontuações 4 a 6 indicam que o bebê pode precisar de ajuda adicional para se adaptar ao ambiente extrauterino, e pontuações abaixo de 4 são um sinal de que o bebê pode precisar de atendimento médico de emergência (Apgar et al., 1953).

4.5 - Cultura de células endoteliais microcapilares de cerebrais humanas (HBMEC)

A linhagem de células endoteliais de microcapilares cerebrais humanas (HBMEC) foi

cultivada seguindo os protocolos descritos previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Siqueira et al., 2021). As células HBMEC foram plaqueadas em lâminulas de vidro redondas com 13 mm de diâmetro, em placas de 24 poços, a uma densidade de 25 mil células por poço. O meio de cultura utilizado foi o M199 (Invitrogen), adicionado de 1% de glutamina e 0,1% de penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen). Durante o cultivo, o meio foi trocado a cada 2 dias até que as células atingissem a confluência, momento em que foram utilizadas para os experimentos, nas passagens 36-38. As células HBMEC em condição confluenta foram

35

então submetidas a diferentes tratamentos: meio contendo soro de pacientes controle (S-controle) e meio contendo soro de pacientes expostos ao etanol (S-etanol), diluídos a 10%. Os tratamentos foram mantidos por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram processadas para análises posteriores.

4.6 - Imunocitoquímica

Após o cultivo e tratamentos, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (Vetec) por 15 minutos e, em seguida, foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora em uma solução de bloqueio e permeabilização contendo albumina de soro bovino (BSA) a 3% e soro normal de cabra (NGS) a 5%, juntamente com Triton X-100 a 0,2%, diluídos em PBS (Sigma Aldrich). Na etapa seguinte, as células foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio, sendo anti-ZO-1 a 1:25 (Thermo Fisher) e anti-GLUT 1 a 1:25 (Santa Cruz Biotechnologies), ambos produzidos em coelho. Essa incubação foi realizada *overnight* a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher), diluído em solução de bloqueio, por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para a visualização dos núcleos, foi utilizado o corante fluorescente DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol; Sigma Aldrich). Após a incubação com o DAPI, as células foram novamente lavadas com PBS, e as lâminulas foram montadas em meio de montagem *Aqueous Mounting Medium* (Dako). A visualização das células foi realizada utilizando-se microscópio óptico de fluorescência Axiovert (Zeiss), sendo capturados 10 campos em duplicata na objetiva de 40x. As fotomicrografias obtidas foram analisadas por densitometria utilizando o software Image 1.44. Os números foram obtidos

calculando a intensidade de fluorescência da área e dividindo-a pelo número total de células no campo, que foram marcadas com DAPI.

4.7- Ensaio de permeabilidade endotelial em *transwell*

As células HBMEC foram cultivadas em insertos *transwell* com poros de 0,4µm (Millipore) posicionados em poços de placas de 24 poços, a uma densidade de 1.6 mil células por inserto, e mantidas em meio M199 suplementado conforme descrito anteriormente (item 4.3). Também foram plaqueadas células em um poço da mesma placa de 24 na mesma proporção densidade celular/área do poço, para que pudéssemos visualizar o crescimento das células ao microscópio de contraste de fase e verificar os

36

estágios de confluência, visto que a visualização das células cultivadas nos insertos *transwell* não é possível durante o cultivo. Quando as células atingiram a confluência, foram submetidas a diferentes tratamentos por 24 horas: meio contendo soro de pacientes controle (S-controle) ou meio contendo soro de pacientes expostos ao etanol (S-etanol). Após os tratamentos, adicionou-se à superfície superior dos insertos contendo as HBMECs em cultura, o corante azul de Evans conjugado com albumina (Sigma-Aldrich) diluído a 4% em meio sem soro (MSS). Após 1, 5 e 24 horas de incubação do corante, coletou-se 100µl do meio de cultivo presente na superfície oposta dos insertos (no poço da placa de 24 poços) nos respectivos horários. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi medida utilizando um leitor de placas no comprimento de onda de 620nm (Radu, M., et al 2013). Em seguida, com base em uma curva padrão previamente confeccionada, analisou-se o índice de passagem do corante azul de Evans através da monocamada endotelial, como forma de mensurar a permeabilidade dessas células expostas às diferentes condições experimentais nos diferentes tempos analisados.

4.8- Ensaio de migração (*scratch wound assay*) de células endoteliais expostas ao soro do sangue de cordão umbilical

Culturas confluentes de HBMEC foram submetidas a um "risco" na monocamada, utilizando a extremidade de uma ponteira de plástico de 10uL. Após a realização do "risco", as células foram mantidas por 1 hora em meio MCS em estufa e, em seguida, tratadas com S-controle e S-etanol. Em todas as condições, adicionou-se 10 µM de Ara-C (arabinofuranose citidina, Sigma-Aldrich) para inibir a proliferação celular. A migração das

células endoteliais foi analisada por imagem de contraste de fase, na região do "risco" após 0, 5 e 24 horas, utilizando a objetiva de 10x do microscópio óptico Nikon TS2. O índice de migração foi calculado através da diferença entre a área inicial do "risco" e a área remanescente nos determinados períodos de análise. Esses cálculos foram realizados utilizando o software Image 1.44.

4.9 - Preparo dos meios condicionados endoteliais de células expostas ao soro do sangue de cordão umbilical

Após atingirem a confluência, as células endoteliais HBMECs (cultivadas conforme descrito no item 4.3) foram tratadas com S-controle ou S-etanol por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez em meio sem

37

soro e novo meio sem soro foi adicionado, sendo mantido por mais 24 horas. Após esse período adicional de 24 horas, o meio condicionado (MC) das células endoteliais expostas ao soro de pacientes expostos (MC-S-etanol) ou não expostos (MC-S-controle) ao álcool foi recolhido. O MC foi centrifugado a 12.800g em centrífuga refrigerada (Thermo fisher) e o sobrenadante foi coletado em tubos eppendorfs estéreis. Os MCs foram então armazenados em freezer a -80°C até serem utilizados para análises posteriores.

4.10 - Ensaio de caracterização do perfil de proteínas relacionadas à angiogênese secretadas pelas células endoteliais expostas ao soro do sangue de cordão umbilical

Os meios condicionados (MCs) das células endoteliais HBMECs expostas ao soro do sangue do cordão umbilical dos pacientes foram obtidos conforme descrito no item anterior, e analisados por meio do kit *Proteome Profiler™ Human Angiogenesis Antibody Array* (R&D Systems). Neste kit, membranas de nitrocelulose possuem aderidos, anticorpos para reconhecer 53 proteínas relacionadas à angiogênese. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. As membranas de nitrocelulose contendo anticorpos de captura foram incubadas com solução de bloqueio por 1 hora em agitação e temperatura ambiente. Utilizamos um pool de MCs derivadas de 2 culturas de HBMECs tratadas com amostras S-controle de 3 pacientes e S-etanol de 3 pacientes. Como o kit possui 4 membranas, realizamos o ensaio em duplicata: 2 membranas para amostras de MC-S-controle e 2 membranas para amostras de MC-S-etanol. Os MCs endoteliais foram

misturados a um coquetel de anticorpos biotinizados durante 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, incubados com as membranas durante a noite, em agitação a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, em agitação para remover o material não ligado. Em seguida, as membranas foram incubadas por 30 minutos em agitação com estreptavidina-HRP. As proteínas capturadas foram visualizadas através de um sistema de detecção por quimioluminescência, expondo as membranas a filmes auto radiográficos Kodak. As proteínas detectadas foram analisadas por densitometria utilizando o software Image 1.44.

4.11 - Proteômica dos soros de cordão umbilical

O ensaio de proteômica do soro de sangue de cordão umbilical foi realizado no Laboratório de apoio ao desenvolvimento tecnológico da UFRJ (LADETEC). As amostras

38

para proteômica foram preparadas a partir de 2 µL (100 µg de proteínas) de soro de sangue umbilical de amostras "Controle (S-controle)" e "Expostos ao álcool(S-Etanol)", processados conforme previamente descrito. O soro foi diretamente adicionado a um tampão 8M uréia e 2M tiourea, e em seguida foram reduzidos com ditioneitol (DTT) 10 mM a 37°C por 1 h, e alquilados iodoacetamida (IAA) 40 mM, por 30 min no escuro e temperatura ambiente. A amostra de proteínas extraída, reduzida e alquilada foi então submetida a digestão por tripsina (1:50, m/m, Promega), por aproximadamente 18h em Thermomixer 900 rpm a 37 °C. Após digestão, as amostras foram dessalinizadas em Spin Column (C18) e Resina Poros R2. As colunas foram previamente ativadas com 150 µL de acetonitrila 100% (v/v), por 15 min, duas vezes. Em seguida, equilibrada com 100 µL de uma solução de TFA 0,1 % em água, por 3 vezes. Então, a amostra foi aplicada à coluna, recolhida, e o procedimento de aplicação repetido. A limpeza das amostras retidas na coluna foi realizada com 100 µL de TFA 0,1 % em água, por 3 vezes. Os peptídeos foram então eluídos por dois ciclos de lavagem: 100 µL de TFA 0,1 % em ACN 50 % (v/v), seguido de 100 µL de TFA 0,1 % em ACN 70 % (v/v). Por fim, as amostras foram concentradas em evaporador Speed Vac (Savant, Thermo Fisher). Após a digestão, dessalinização e secagem as amostras foram ressuspensas em 20 uL de ácido fórmico 0,1% e a concentração de peptídeos presente nas amostras foi determinada utilizando-se o método fluorimétrico no equipamento Qubit, seguindo o protocolo do Kit Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen). Todas as amostras foram então diluídas a uma

concentração de peptídeos igual a 0,2 µg/µL em ácido fórmico 0,1% para análise. Proteínas totais das amostras foram analisadas por cromatografia líquida Easy 1000 nano LC (Thermo Scientific) acoplada à espectrometria de massas, com analisador do tipo Orbitrap (Q Exactive Plus). De cada amostra, 10 µL (~2 µg) de digesto de peptídeos trópticos foram aplicados à coluna Reprosil Gold C18 (3 µm, 200 Å, 75 µm x 25 cm) para separação. A coluna foi conectada a um sistema cromatográfico operando num fluxo de 300 nL/min., acoplado ao espectrômetro de massas Q Exactive Plus com fonte de ionização nano-electrospray. As fases móveis utilizadas foram: A – H₂O 95 % e ACN 5 % com ácido fórmico 0,1 % e B – ACN 99 % e H₂O 1 % com ácido fórmico 0,1 % e o gradiente da fase móvel: 5-23% de B em 57 min, 23-45% de B em 20 min, 98% de B por 5 min. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 3,4 kV e 280 °C, a aquisição de dados foi controlada pelo software Xcalibur e o

39

espectrômetro foi operado no modo DDA (Data Dependent Acquisition – Aquisição dependente de dados), utilizando uma varredura de massas na região de m/z de 375 a 2000, seguida de HCD (High Energy Collision Dissociation – Dissociação por maior energia de colisão) dos 15 íons mais intensos com energia de colisão de 30. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 45 segundos. A identificação de proteínas foi feita por PSM (Peptide Spectrum Match) através do software Proteome Discoverer 2.1 utilizando o algoritmo SEQUEST contra uma base de dados de proteínas Homo sapiens - obtidas do UniProt. Como parâmetros de busca foram usados: modificação fixa de carbamidometilação (cisteína), modificação variável de oxidação (metionina) e acetilação no N-terminal, duas clivagens perdida pela tripsina e tolerância de erro de massa dos íons precursores de 20 ppm e dos fragmentos de 0,1 Da para HCD, e 1% FDR. Para análise das proteínas, a identificação foi feita com proteínas contendo ao menos 2 peptídeos únicos, e a análise de expressão considerando todas as replicatas biológicas de cada condição experimental, em que a quantificação estivesse presente em pelo menos duas replicatas biológicas de cada condição, seguindo a condição de que cada grupo é independente. As proteínas com teste t de Student $p < 0,05$ entre os grupos s-controle e s-etanol foram consideradas diferencialmente expressas. Os dados são apresentados como Log₂ da razão s-etanol/s-controle de cada proteína. A análise da ontologia gênica e vias metabólicas proteínas foi realizada

utilizando Metascape (metascape.org/) utilizando os parâmetros padrões, e os bancos de dados: KEGG Pathway, GO Biological Processes e Reactome. Interações proteína-proteína foram aplicadas a redes de proteínas para identificar clusters e processos envolvidos utilizando String database (string-db.org/).

4.12 – Follow up das crianças após o 1º ano de vida.

Realizamos entrevistas telefônicas semiestruturadas com as mães das crianças participantes deste estudo. As entrevistas com as mães das crianças, realizadas 12 a 17 meses após o nascimento, foram conduzidas utilizando um questionário elaborado para avaliar o desenvolvimento cognitivo, motor e sensorial das crianças (**anexo 3**).

Descrição de cada parâmetro analisado:

1. Desenvolvimento motor: questões como os meses que se iniciou o engatinhar, ficar em pé com e sem apoio, dar os primeiros passos e levar alimentos à boca as

40

próprias mãos. Esses marcos são importantes para avaliar o desenvolvimento físico e a coordenação motora (**Tabela 2**).

2. Desenvolvimento cognitivo e sensorial: investigamos fatores como o momento do início de aquisição de fala (fonação), balbuciar e emitir as primeiras palavras, o entendimento de comandos simples, atenção compartilhada e padrão de sono .

Realizamos perguntas detalhadas e cuidadosas tanto sobre o **estado de saúde** delas quanto sobre o seu bem-estar social (**Tabela 2**). Primeiramente, abordamos questões relacionadas à saúde, como se a criança tem alguma doença ou se toma algum medicamento de forma contínua. Essas informações nos ajudam a entender melhor o estado de saúde geral da criança e se há algum problema de saúde que possa estar afetando o seu desenvolvimento. Além disso, **perguntamos à mãe se elas observaram algum atraso no desenvolvimento da criança**. Essa é uma etapa importante, pois pode nos fornecer pistas sobre possíveis desafios ou dificuldades no desenvolvimento motor, neural, sensorial ou cognitivo da criança. Também consideramos a **interação social da criança**, fazendo perguntas sobre sua frequência à creche e como ela se relaciona com outras crianças. Entender o aspecto social é fundamental, pois as interações com outras crianças desempenham um papel crucial no desenvolvimento socioemocional e na aquisição de habilidades sociais importantes.

4.13 –Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 8.0), adotando um nível de significância de $p \leq 0,05$. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Os resultados são representativos de 2-3 culturas independentes, e cada condição experimental foi conduzida em duplicata.

41

5. RESULTADOS

5.1 - Estudo do perfil de consumo de álcool durante a gestação e apresentação clínica dos recém-nascidos.

Durante esta primeira etapa do estudo, coletamos um total de 77 formulários preenchidos por gestantes admitidas no núcleo perinatal do Hospital Universitário Pedro Ernesto, abrangendo o período de novembro de 2021 a agosto de 2022. **5.1.1 -**

Avaliação da faixa etária das gestantes.

Inicialmente, realizamos uma análise da faixa etária das gestantes que participaram deste estudo. Observamos uma notável diversidade nas faixas etárias, com maior representatividade na faixa de 33 a 43 anos, conforme ilustrado na **Figura 8**. **As gestantes com idades entre 16 e 25 anos compõem 30,6% do grupo, enquanto as gestantes com idades entre 26 e 32 anos representam 24,2%. Notavelmente, a faixa etária de 33 a 43 anos é a mais prevalente, compreendendo 45,2% das gestantes participantes.**

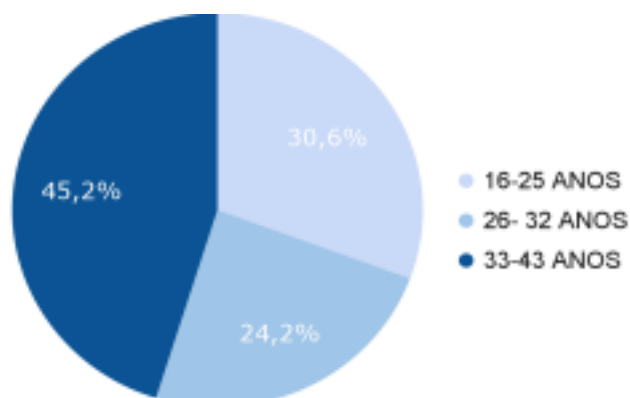


Figura 8. Análise da distribuição da faixa etária das gestantes participantes do estudo.

5.1.2 - Avaliação da frequência de consumo de álcool na durante a gestação.

Analisamos a regularidade do consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez,

identificando que 10,4% das gestantes relataram ingerir álcool pelo menos uma vez por mês, enquanto 16,9% o faziam de 2 a 4 vezes mensalmente, resultando em um total de 27,8% das gestantes que admitiram algum nível de consumo. Por outro lado, a grande maioria, correspondendo a 72,7%, afirmou nunca ter consumido bebidas alcoólicas durante a gestação (**Figura 9**).

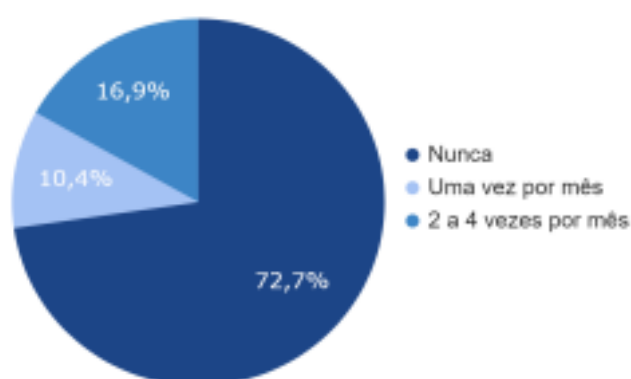
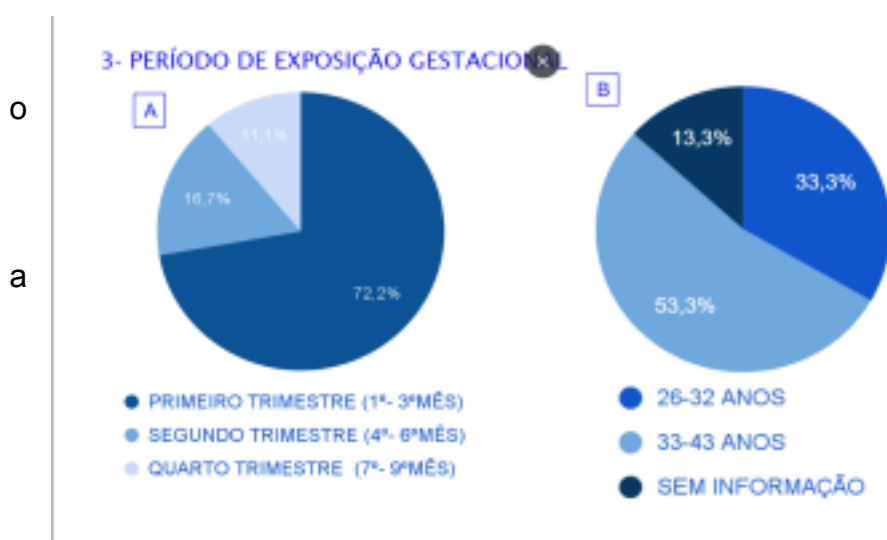


Figura 9. Percentual de gestantes que relataram a frequência de consumo de bebidas alcoólica

5.1.3 - Avaliação da frequência de consumo de álcool durante a gestação e período do consumo.

Conforme evidenciado no resultado anterior, cerca de 27,8% das mães participantes deste estudo admitiram o consumo mensal de álcool. Nossa análise também buscou compreender em qual estágio da gestação esse consumo foi mais predominante. Descobrimos que a maioria esmagadora, ou seja, 72,2% das gestantes, relatou ter consumido álcool durante o primeiro trimestre da gravidez, em contraste com 16,7% e 11,1% das gestantes que admitiram o consumo durante o segundo e terceiro trimestres, respectivamente (**Figura 10A**). Além disso, ao investigar a faixa etária das gestantes que



relataram o consumo durante primeiro trimestre, observamos que maioria significativa, equivalente a 53,3%, estava

na faixa etária de 33 a 43 anos (**Figura 10B**).

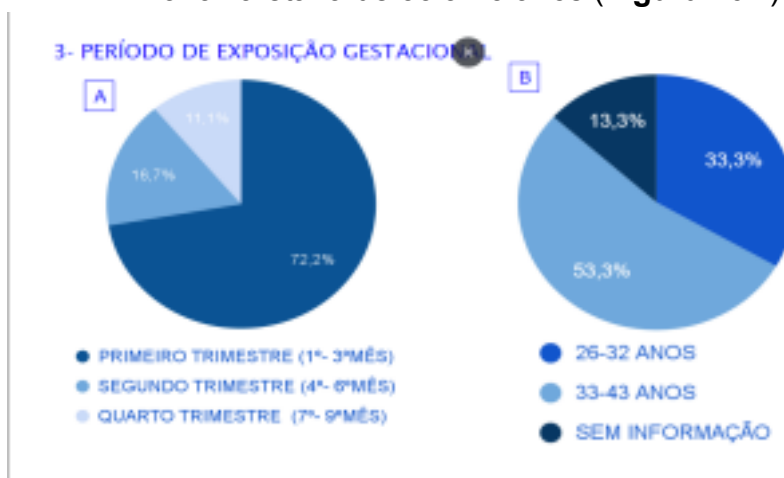


Figura 10. Avaliação da frequência de consumo de álcool durante a gestação e período que o consumo ocorreu. (A) Identificação e prevalência do momento (trimestre gestacional) em que o consumo de bebida alcoólica ocorreu. (B) Identificação da faixa etária prevalente relacionada ao grupo em que houve maior prevalência de consumo.

43

5.1.4 -Análise da diversidade racial entre as mães participantes do estudo. Além de ser amplamente normalizado, o consumo de bebidas alcoólicas é uma prática comum em diversos grupos socioeconômicos e étnicos da nossa sociedade, abrangendo também mulheres em idade fértil. Para uma análise mais detalhada, realizamos uma segmentação social dentro do nosso grupo de participantes do estudo. **Ao examinar as características de nossa coorte de mães de seleção para a coleta das amostras, formada por mães controle** (sem consumo de álcool durante a gravidez) e aquelas que relataram ter consumido álcool durante a gestação, notamos que aproximadamente 60% das mães do grupo controle se autodeclararam pardas, enquanto 40% se identificaram como brancas. **Entre as mães que reportaram o consumo de álcool durante a gravidez, 75% se autodeclararam pardas e 25% pretas** (**Figura 11**). Esse recorte social nos permite uma compreensão mais abrangente dos hábitos de consumo de álcool durante a gravidez em diferentes grupos étnicos dentro da nossa amostra. Vale ressaltar que apenas as gestantes que selecionamos para a coleta de amostras biológicas dos recém-nascidos, conforme detalhado nos tópicos a seguir, foram incluídas no nosso estudo.

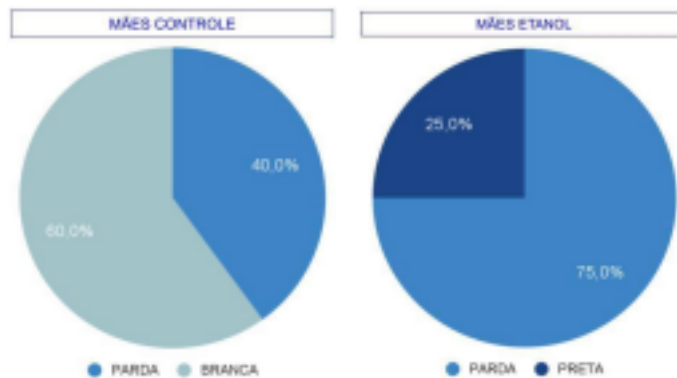


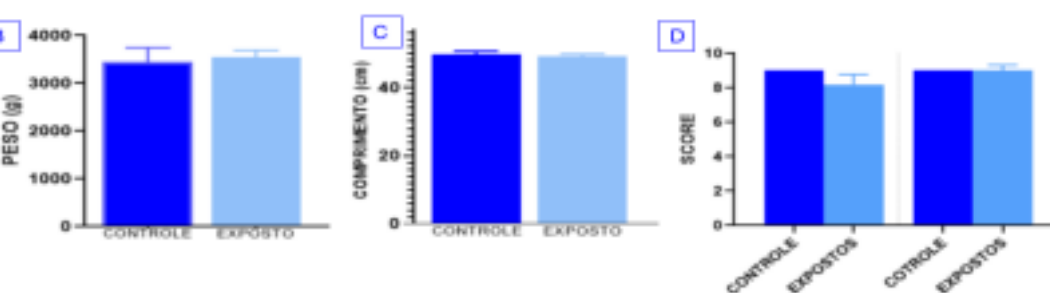
Figura 11. Perfil racial das mães incluídas no estudo: Comparação da composição racial entre grupos de mães que reportaram já terem consumido bebidas alcoólicas durante a gestação (Controle, 5 Participantes) e o grupo que relatou ter consumido bebidas alcoólicas em qualquer momento durante a gestação (Etanol, 4 Participantes).

5.1.5 - Apresentação clínica dos recém-nascidos.

Após a análise das informações das gestantes, procedemos à avaliação da apresentação clínica dos recém-nascidos dessas mães. Utilizamos os dados disponíveis nos prontuários médicos das pacientes, que nos permitiram analisar o peso (em gramas), o comprimento (em centímetros) e o escore de APGAR.

44

Os resultados da nossa investigação não revelaram diferenças significativas nos parâmetros analisados, que incluem o peso, o comprimento e o escore de Apgar, ao compararmos os bebês nascidos de mães do grupo controle com os bebês cujas mães foram expostas ao álcool durante a gestação (Figura 12). Além disso, não observamos nenhuma predominância de alterações nos parâmetros em relação ao sexo dos bebês.



A	RN	SEXO	PESO (g)	COMPRIMENTO (cm)	APGAR
	Controle 1	F	3.085	48CM	NI
	Controle 2	M	4.560	53CM	9\9
	Controle 3	F	3.170	50CM	9/9
	Controle 4	F	3.585	50CM	9/9
	Controle 5	M	2.820	48CM	9/9
	Exposto 1	F	3.560	NI	6\8
	Exposto 2	M	3.620	48,5CM	8\9
	Exposto 3	M	3.075	48CM	9\9
	Exposto 4	M	3.470	50CM	9/10
	Exposto 5	M	4.000	50,5CM	9/9

Figura 12. Apresentação clínica dos recém-nascidos (RN): (A) Valores brutos das medidas de peso (g), comprimento (cm), APGAR (minuto 1/5) e o sexo dos recém-nascidos no grupo controle e no grupo exposto ao álcool durante a gestação. Comparação das médias dos pesos (g), (C) do comprimento corporal (cm) e (D) do escore APGAR dos recém-nascidos das mães controle e das mães que relataram consumo de álcool durante a gestação. NI: não informado.

Com base nos dados coletados, não observamos evidências físicas de alterações significativas que possam estabelecer uma correlação entre os dois grupos do nosso estudo no momento do nascimento.

5.2 - Estudo experimental dos efeitos das moléculas do soro de sangue de cordão umbilical na função endotelial *in vitro*.

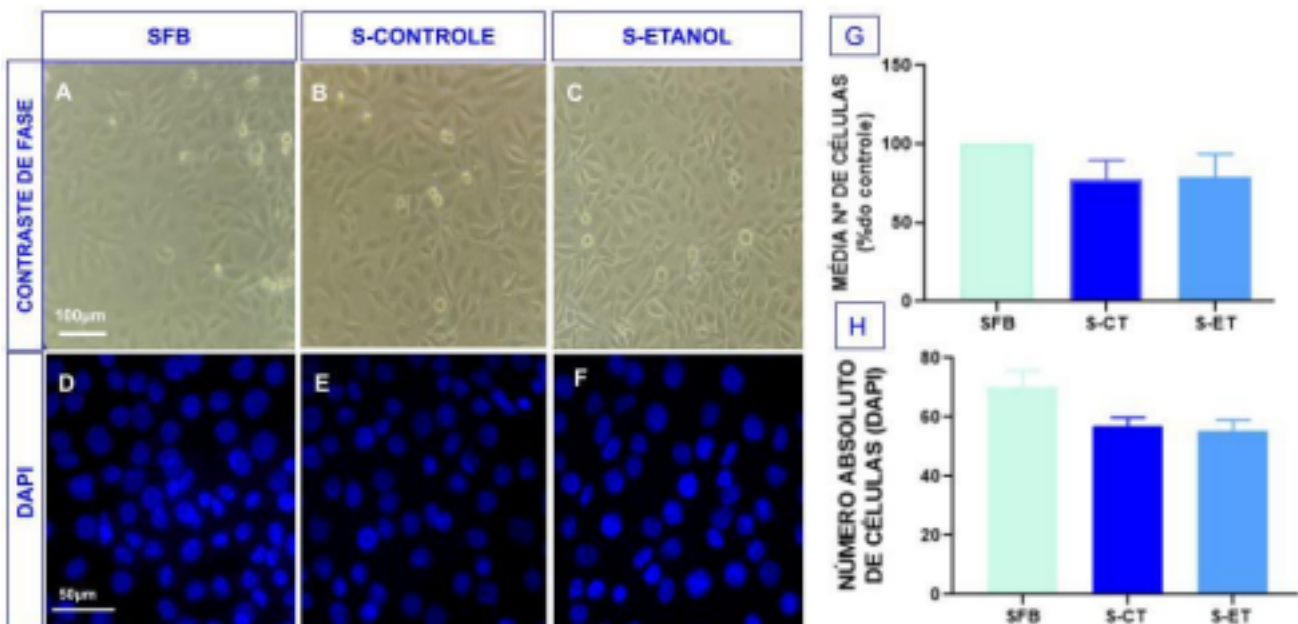
5.2.1 - Avaliação morfológica de células endoteliais cerebrais humanas cultivadas em presença do soro de sangue de cordão umbilical.

Para avaliar os impactos do consumo de álcool durante a gestação na função da BHE e avaliar possíveis efeitos tóxicos, inicialmente analisamos a morfologia e o número de

45

células endoteliais após o tratamento com os soros. Cultivamos as células HBMEC e as submetemos a um tratamento de 24 horas: com meio de cultivo contendo soro fetal bovino (SFB), soro do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos controle (S-controle) e soro de recém-nascidos expostos ao álcool (S-etanol).

Após os tratamentos, observamos que a exposição das HBMECs aos soros de pacientes não resultou em alterações significativas na morfologia das células, quando comparamos com as células tratadas com SFB, nosso soro padrão de tratamento (**Figura 13 A-C**). Também não observamos alterações significativas no número de células através da marcação com DAPI (**Figura 13 D-F**), quando comparamos os percentuais em relação ao controle (SFB) (**Figura 13 G**), nem quando avaliamos o número absoluto de células



(Figura 13 H).

Figura 13. Tratamento de culturas de HBMECs com soro de pacientes não altera a morfologia e densidade destas células. (A-C) fotomicrografias em contraste de fase de células cultivadas em meio contendo soro fetal bovino (D-E) fotomicrografias de células cultivadas nas mesmas condições e coradas com o marcador nuclear DAPI (G) Quantificação em valores percentuais ($p=0.6647$) (H) Quantificação em valores absolutos de células ($p=0,0742$) $n=4$. S-CT: S-controle; S-ET: S-etanol.

Estes resultados sugerem que moléculas, ainda a serem identificadas, presentes no soro de pacientes expostos ao consumo de álcool durante a gestação não alteram a morfologia e densidade de células HBMECs, possivelmente não apresentando efeitos tóxicos.

46

5.2.2 - Avaliação dos níveis e distribuição da proteína de junção ocludente ZO-1 em células endoteliais expostas ao soro de sangue de cordão umbilical.

Com o objetivo de investigar os efeitos das moléculas presentes no soro do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos expostos ou não ao consumo gestacional de etanol, realizamos culturas de HBMECs e o tratamento com S-controle ou S-etanol e analisadas por imunofluorescência para a proteína ZO-1.

Observamos que as células tratadas com S-controle exibiram predominantemente maior intensidade de fluorescência de ZO-1 em comparação com as células tratadas com S-etanol (**Figura 14 C e D**), demonstrando uma perda na distribuição da proteína nas junções celulares na condição com etanol em comparação com o controle. Ao

analisarmos a média das intensidades de marcação, verificamos uma redução de aproximadamente 68% quando comparamos os grupos (Figura 14 E).

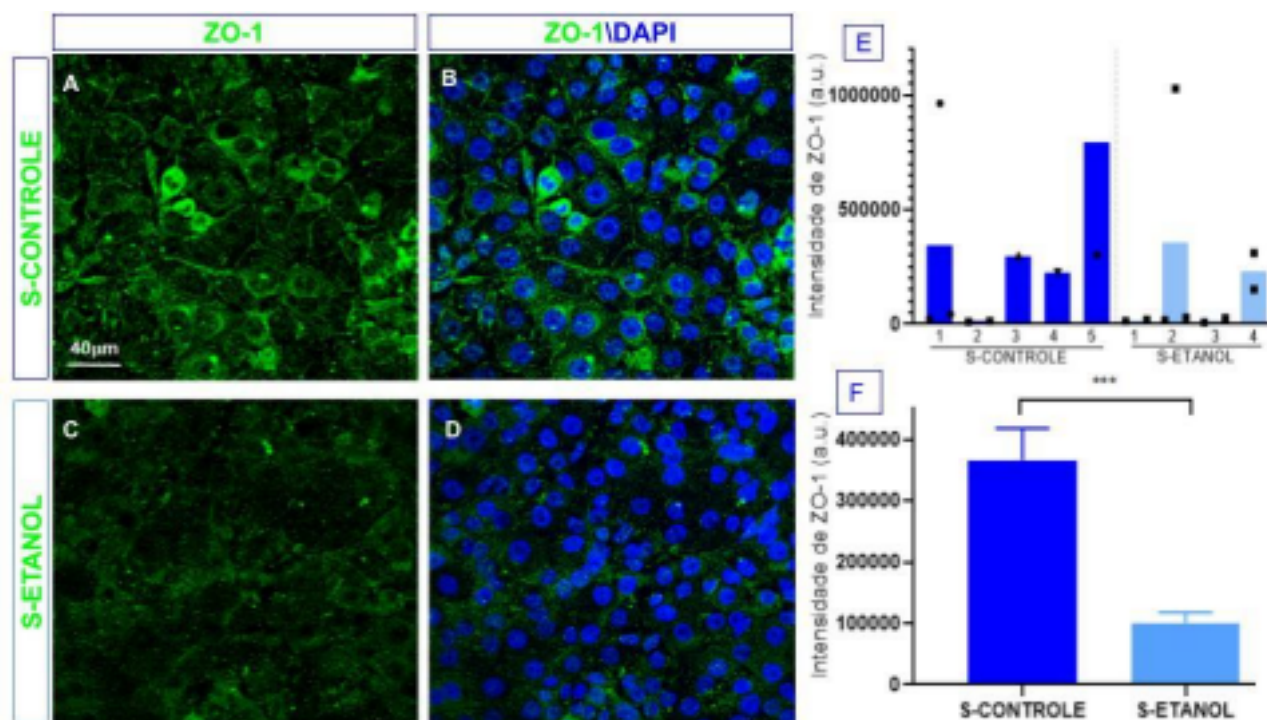


Figura 14. HBMECs tratadas com S-etanol apresentam níveis reduzidos de proteína de junção ocludente ZO-1. (A, C) fotomicrografias de células tratadas com S-controle mostrando a típica distribuição de ZO-1. (B, D) fotomicrografias de células tratadas com S-etanol demonstrando níveis reduzidos de intensidade de fluorescência (E) Perfil de intensidade de ZO-1 em células expostas ao S-controle (5 paciente) e S-etanol (4 pacientes) (F) Análise dos pacientes agrupados demonstrando redução estatisticamente significativa em 68% da intensidade de fluorescência de ZO-1 em células tratadas com S-etanol, em comparação àquelas tratadas com S-controle. *** $p < 0.001$. $n = 3$ culturas.

Os resultados deste estudo sugerem uma possível relação entre as células endoteliais e a intensidade de marcação da proteína ZO-1, o que, por sua vez, pode ter implicações

47

na função da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica.

5.2.3 - Avaliação dos níveis da proteína transportadora de glicose GLUT-1 em células endoteliais expostas ao soro de sangue de cordão umbilical. Com o objetivo de investigar os impactos das moléculas presentes no soro do sangue de cordão umbilical, tanto expostos quanto não expostos ao consumo gestacional de etanol nas células endoteliais. Conduzimos culturas de HBMECs, posteriormente, submetidas a tratamentos com S-controle e S-etanol, por 24 horas. Para avaliar a possível influência desses tratamentos, conduzimos análises por meio da técnica de imunofluorescência.

Como pode ser observado na **Figura 15**, as culturas tratadas com S-controle (**Figura 15 A,B**) a exposição das células ao S-etanol resultou em uma redução na intensidade de fluorescência de GLUT-1 ao longo da superfície celular (**Figura 15 C,D**). A análise da intensidade de marcação para GLUT-1, evidencia que os níveis de GLUT-1 em células tratadas com S-etanol parecem reduzidos, em comparação com S-controle (**Figura 15 E**). Ao agruparmos as médias das intensidades de marcação, observamos que os níveis de GLUT-1 encontram-se reduzidos em aproximadamente 38% quando comparamos os dois grupos (**Figura 15 F**).

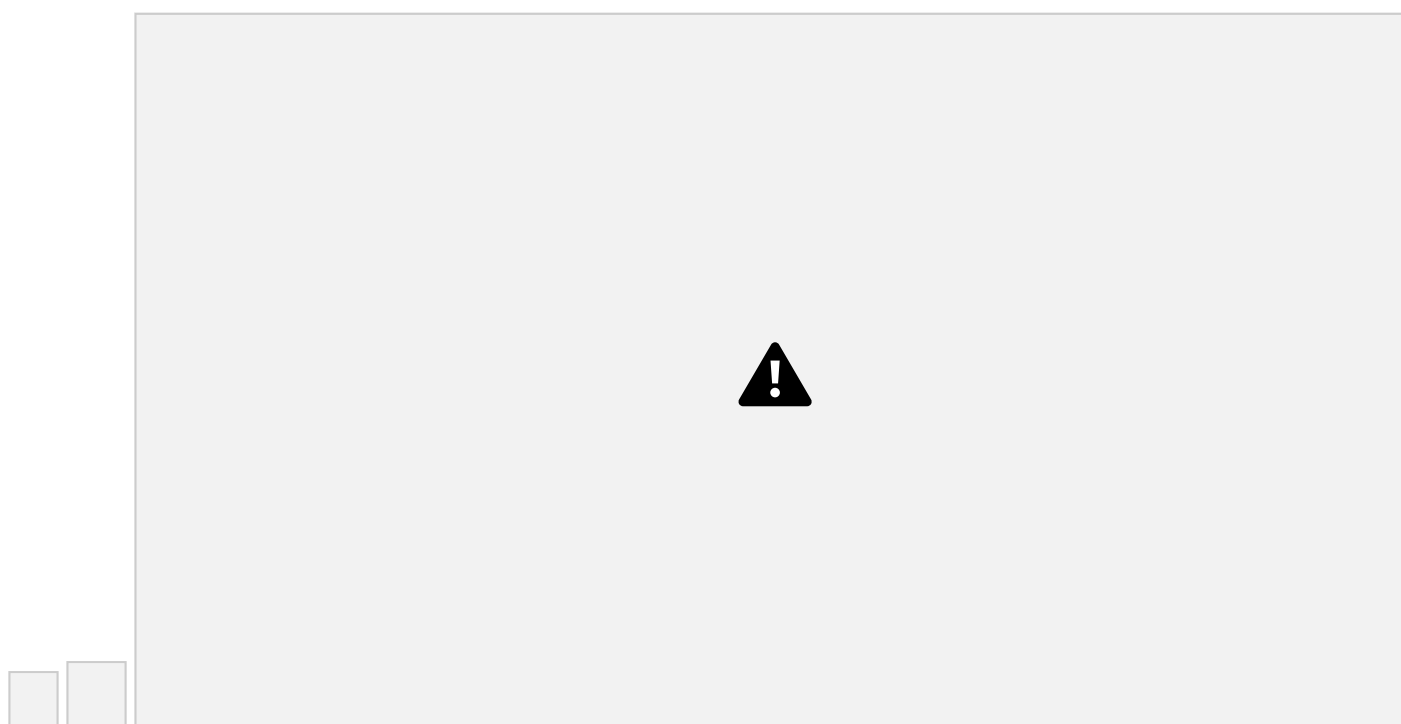


Figura 15. HBMECs tratadas com S-etanol apresentam níveis reduzidos de proteína transportadora de glicose GLUT-1. (A, B) fotomicrografias de células tratadas com S-controle mostrando a distribuição de GLUT-1 ao longo de toda superfície celular. (C, D) Fotomicrografias de células tratadas com S-etanol demonstrando níveis reduzidos de intensidade de fluorescência para GLUT-1 na superfície celular. (E) Perfil de distribuição das medidas de densidade integrada de GLUT-1 em células tratadas com S-controle (5 pacientes) e S-etanol (4 pacientes). (F) Análise dos pacientes agrupados demonstrando redução estatisticamente significativa em 38% da intensidade de fluorescência de GLUT-1 em células tratadas com S-etanol, em comparação àquelas tratadas com S-controle. **p=0.0098 n= 3 culturas.

48

a distribuição de GLUT-1 ao longo de toda superfície celular. (C, D) Fotomicrografias de células tratadas com S-etanol demonstrando níveis reduzidos de intensidade de fluorescência para GLUT-1 na superfície celular. (E) Perfil de distribuição das medidas de densidade integrada de GLUT-1 em células tratadas com S-controle (5 pacientes) e S-etanol (4 pacientes). (F) Análise dos pacientes agrupados demonstrando redução estatisticamente significativa em 38% da intensidade de fluorescência de GLUT-1 em células tratadas com S-etanol, em comparação àquelas tratadas com S-controle. **p=0.0098 n= 3 culturas.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a ocorrência de alterações que podem influenciar a expressão da proteína GLUT-1, possivelmente afetando a função de captação de glicose por essas células.

5.2.4 – Avaliação funcional de células HBMECs expostas ao soro de sangue de

cordão umbilical.

5.2.4.1 – Ensaios de permeabilidade da monocamada endotelial Conforme mencionado anteriormente, identificamos uma significativa redução nos níveis da proteína ZO-1 em células endoteliais expostas ao soro dos pacientes. Para avaliar se essa alteração está associada a mudanças na função de barreira das células endoteliais, realizamos ensaios de permeabilidade utilizando o corante azul de Evans conjugado a albumina, que possui tamanho molecular de 960 Da, podendo atravessar rapidamente a fenda para celular em caso de desorganização das junções ocludentes (Yang et al., 2019).

Após o tratamento das células HBMECs com S-controle e S-etanol por 24 horas, cultivadas em insertos *transwell*, adicionamos o corante azul de Evans à face superior do inserto e, após 1, 5 e 24 horas, coletamos o meio na face inferior (no poço da placa de cultivo) para realizar a leitura da densidade óptica em um leitor de placas com esquematizado na **Figura 16A**. As análises revelaram que após 1 hora, a passagem do corante azul de Evans através da monocamada de células tratadas com S-controle e S-etanol ocorreu em níveis similares. Entretanto, após 5 horas, a monocamada tratada com S-controle mantém níveis similares aos iniciais, enquanto a monocamada tratada com S-etanol apresenta significativo aumento em 40% da passagem (permeabilidade) do corante, em relação ao controle. Após 24 horas, os níveis de passagem do corante se igualam entre as células tratadas com S-controle e S-etanol (**Figura 16 B**).

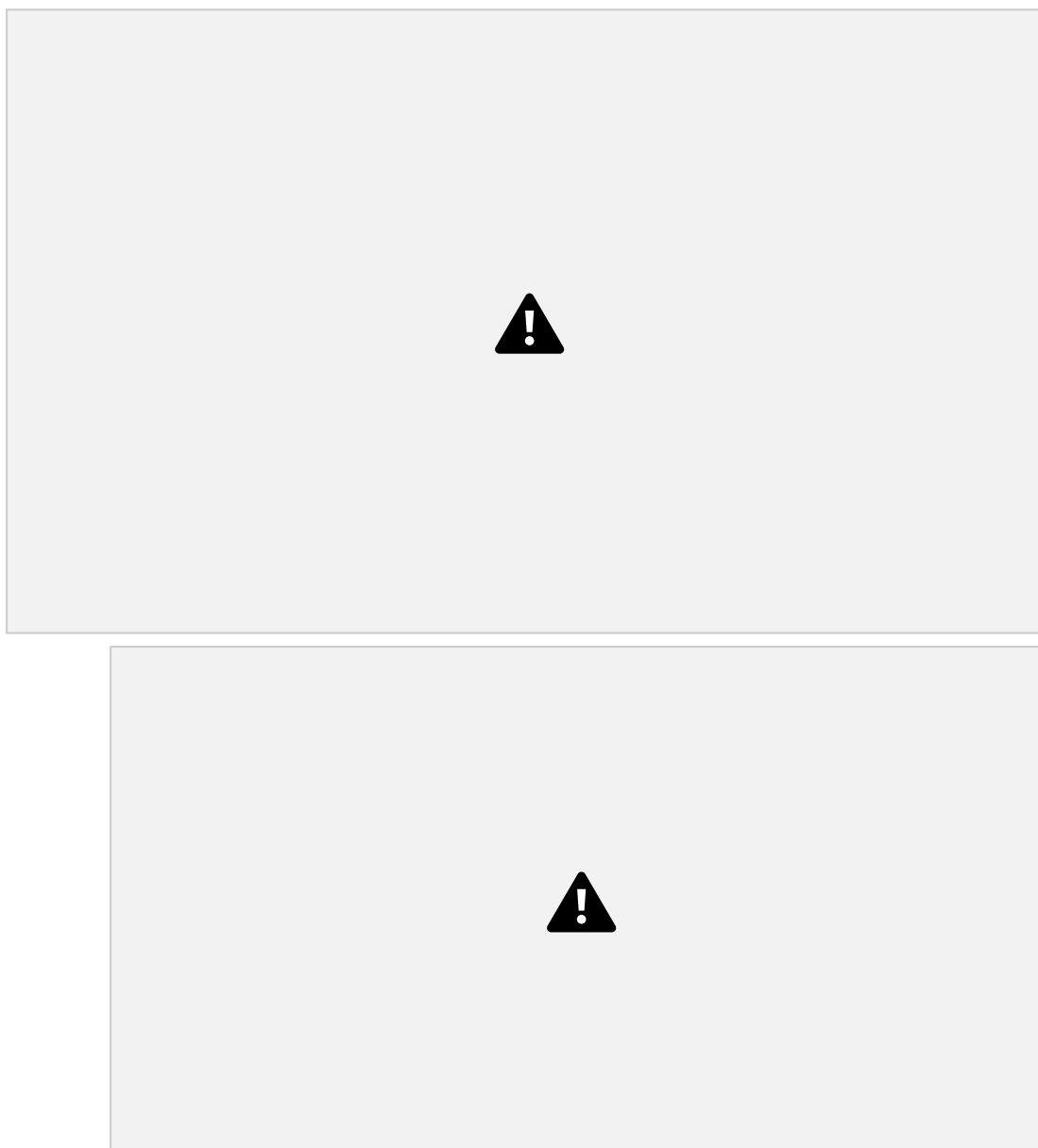


Figura 16. O tratamento de culturas de HBMECs tratadas com S-etanol induz o aumento da permeabilidade da monocamada endotelial. (A) Esquema representativo do ensaio de permeabilidade ao corante azul de Evans em culturas de células endoteliais cultivadas em insertos *transwell*. (B) Análise da passagem do azul de Evans através da monocamada endotelial após 1, 5 e 24 horas, demonstrando aumento da permeabilidade em células tratadas com S-etanol após 5 horas de adição do corante, em comparação com a condição de controle.* $p=0,0278$. $n=3$.

5.2.4.2 – Ensaios de migração em *Scratch*.

Além da função de barreira na BHE, as células endoteliais também possuem função migratória quando estimuladas para formação de novos vasos sanguíneos por angiogênese (Siqueira et al., 2017; Siqueira & Stipursky, 2022). A angiogênese anômala no SNC em desenvolvimento já foi demonstrada no contexto da exposição gestacional ao

etanol por nosso grupo (Siqueira et al., 2021) e outros (Radu, et al., 2013). Com base nisso, nos questionamos se as moléculas presentes no soro de sangue de cordão umbilical poderiam modular a migração de células endoteliais.

Para investigar essa questão, realizamos o ensaio de migração celular após a confluência das culturas de HBMECs. Realizamos um "risco" nas monocamadas endoteliais e, após 1 hora, as células foram tratadas com S-controle ou S-etanol. A migração das células em direção à área do "risco" foi registrada com microscópio de contraste de fase nos tempos 0, 5 e 24 horas (**Figura 17**).

50

Observamos que após 5 horas, as células tratadas com S-etanol apresentavam índice de migração 60% menor que as células tratadas com S-controle, uma vez que a área ocupada pelas células tratadas com S-etanol se encontrava menor, em comparação com as células tratadas com S-controle (**Figura 17 A, B, D, E, G**).

Após 24 horas, tanto as células tratadas com S-controle quanto as tratadas com S-etanol já haviam ocupado a área do "risco" (**Figura 17 C, F, G**).



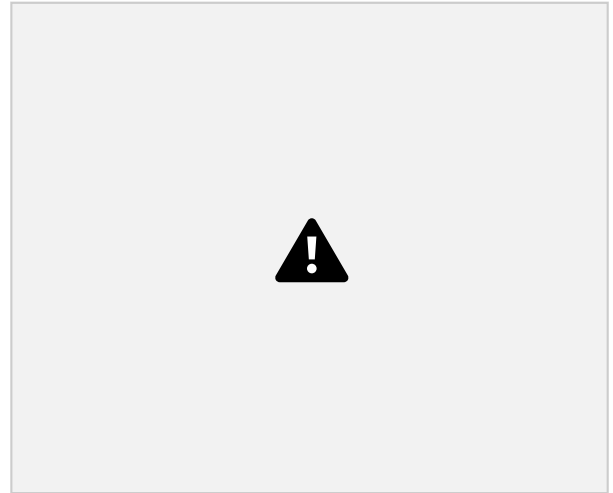


Figura 17. O tratamento de culturas de HBMECs tratadas com S-etanol reduz o índice de migração celular. (A-F) Fotomicrografias em contraste de fase mostrando a migração de células HBMECs no risco em diferentes tempos de tratamento com S-controle ou S-etanol. (G) Cinética de migração endotelial sobre o risco demonstrando que células tratadas com S-etanol apresentam menor índice de migração após 5 horas de análise, mas que se iguala em 24 horas quando comparado com as células tratadas com S-controle. **p=0,0016. n=3

Estes resultados sugerem que moléculas presentes no soro de pacientes expostos ao consumo de álcool durante a gestação podem afetar tanto a função de barreira e de migração das células endoteliais, que demonstraram aumento da permeabilidade da monocamada endotelial, e menor potencial migratório, sugerindo disfunções importantes relacionadas à organização estrutural e funcional da BHE.

5.2.4.3 – Array de proteínas relacionadas a angiogênicas secretadas por células endoteliais.

Para investigar se a exposição ao soro do sangue de cordão umbilical de pacientes expostos ou não ao consumo de álcool poderia modular os níveis de proteínas secretadas relacionadas à angiogênese e a função endotelial, cultivamos HBMECs, coletamos o meio condicionado (MC) e avaliamos os níveis de proteínas relacionadas a

51

angiogênese utilizando-se um kit (R&D System) composto por membranas de nitrocelulose com anticorpos específicos, capazes de reconhecer 53 proteínas associadas à regulação da angiogênese.

A partir dessa abordagem, identificamos a presença de 15 proteínas no MC de células endoteliais expostas ao S-controle (MC-S-controle) e S-etanol (MC-S-etanol) (**Figura 18A**). Dentre essas proteínas, observamos redução dos níveis das proteínas Serpin E1

(66%), SerpinF1 (78%), TIMP-1 (79%), Trombospondina 1 (67%), uPA (44%) e VEGF-A (47%) no MC-S-etanol, em comparação ao MC-S-controle. Angiogenina, Colágeno XVIII, IL-8 e LAP (TGF- β 1) apresentaram-se 29, 26, 30 e 37% em níveis aparentemente menores no MC-S-etanol, respectivamente. **ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP 1) apresentou-se com níveis aproximadamente 52% maiores no MC-S-etanol.** As demais proteínas identificadas, Anfiregulina, MMP 9, IGFBP 2 e IGFBP 3 apresentaram variações de aproximadamente 10% em seus níveis (**Figura 18B**). Além da identificação das proteínas relacionadas a angiogênese presentes no MC endotelial, pudemos construir o gráfico de interações *String* (<https://string-db.org/>) para descrever potenciais correlações funcionais e estruturais entre as proteínas identificadas (**Figura 18C**). Observamos um número de 15 nós, com grau médio de 8.4, e valor de $p < 1.0e-16$, (*PPI enrichment p-value*), indicando que os nós na rede de interações proteína-proteína não são **ao acaso e que o número de bordas de interações são significativas estatisticamente, e que as proteínas estão conectadas biologicamente como um grupo.**

52

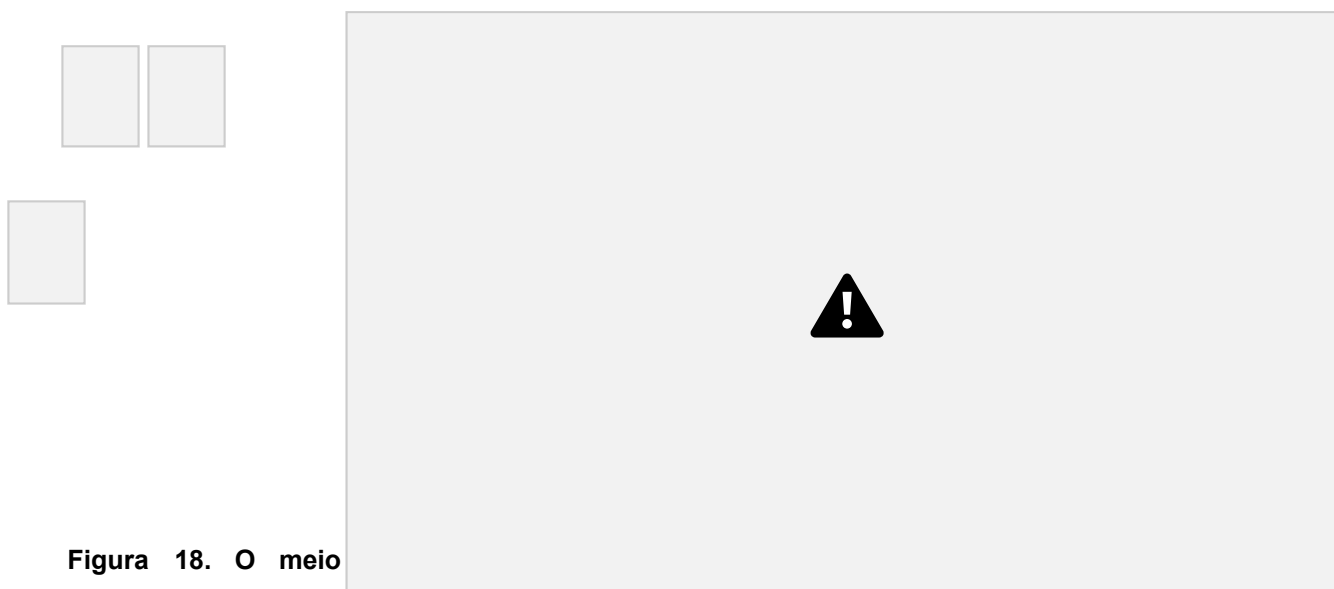


Figura 18. O meio condicionado de células

endoteliais tratadas com S-etanol apresenta alterações no perfil de proteínas relacionadas à angiogênese. A análise do meio condicionado por CEs tratadas com soro controle (MC-S-controle) ou pacientes etanol (MC-S-etanol) revelou a presença de 15 proteínas, sendo algumas delas moduladas de forma específica (A-B). (C) Análise da interconexão proteica utilizando a plataforma *String* para investigar as correlações funcionais entre as proteínas. $n=2$ culturas tratadas com 3 amostras S-controle e 3 S-etanol. (D) Análise da interconexão proteica utilizando a plataforma *String* para investigar as correlações funcionais

entre as proteínas.

Esses resultados sugerem que moléculas séricas, promovem uma mudança no perfil de secreção de proteínas envolvidas na angiogênese pelas células endoteliais, o que pode ter implicações significativas para o desenvolvimento neurovascular. **5.3**

-Análise Proteômica do soro de sangue de cordão umbilical

Para identificar as proteínas presentes do soro de sangue de cordão umbilical, realizamos a análises proteômicas por espectrometria de massas no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) da UFRJ. Utilizamos amostras de soro de pacientes controle e daqueles expostos ao consumo de álcool durante a gestação. Realizamos a análise com amostras de 3 pacientes controle (S-controle) e 3 expostos ao álcool (S-etanol).

Nas amostras S-controle e S-etanol, identificamos um total de 392 proteínas. Destas 12 estavam presentes nas duas condições, 30 exclusivamente em S-controle e 10 exclusivamente em S-etanol (Figura 19A). As 12 proteínas duplamente presentes foram: cadeia Kappa de imunoglobulina variável 3-20 (IGKV3), cadeia kappa de

53

imunoglobulina (IgG) variável 1D-13 (IGKV1D), proteína dependente de vitamina K (PROS1), glicoproteína alfa 2 rica em leucina (LRG1), cadeia lambda de IgG variável 3-10 (IGLV3), proteína do complemento C6, Apolipoproteína F (APOF), Hemopexina (HPX), Apolipoproteína A-IV (APOA4), cadeia gama da proteína do complemento C8 (C8G), subunidade delta de hemoglobina (HBD), gelsolina (GSN). Das 12 duplamente presentes em ambas as condições, 10 foram reguladas positivamente e 2 negativamente pelo S-etanol (Figura 19B). A análise de interação proteína-proteína representada pelo diagrama *String* (Figura 19C), demonstrou a presença de 9 nós, regulados positiva e negativamente em relação ao controle e valor de $p < 3.45e-12$, (*PPI enrichment p-value*), indicando que os nós na rede de interações proteína-proteína não são ao acaso, e que as proteínas estão conectadas biologicamente como um grupo. Destaca-se também as proteínas identificadas como “alcohol binding” (azul), descritas por serem moduladas ou por se ligarem alvos do etanol, e proteínas identificadas como “Innate immune system” (vermelho), por serem relacionadas a resposta imune inata.

Agrupando as proteínas reguladas positivamente em amostras S-etanol, por função biológica (GO: *gene ontology*) (Figura 19D), identificamos a relação a vias de

resposta imune adaptativa, a via da cascata do complemento, a vias de resposta ao Sars-CoV2, produção de imunoglobulina transporte de ácidos graxos e lipoproteínas em hepatócitos e resposta à lesão. É relevante destacar que as 10 proteínas encontradas exclusivamente presentes em S-etanol (**Figura 19A**), a maioria representa subunidades proteicas de imunoglobulinas: cadeia pesada de IgG variáveis 2-70D, 3-20, 3-64, 1-8, 5-51 (IGHV2-70D, IGHV3-20, IGHV3-64, IGHV18, IGHV5-51); cadeia lambda de IgG variáveis 2-11 e 3-1 (IGLV2-11, IGLV3-1); cadeia kappa 1-9 (IGKV1-9); Osteomodulina (OMD) e proteína sérica amilóide A-2 (SAA2), e que estas podem indicar um perfil exclusivo presente no soro de indivíduos expostos ao etanol.

Figura 19. Análise diferencial de proteínas no soro do cordão umbilical de pacientes expostas ao etanol e ou não (controle). (A) Diagrama de venn demonstrando as proteínas analisadas. (B) Gráfico com a expressão diferencial (Log2 fold change) das proteínas significativamente distintas entre etanol e controle, teste t-Student $p < 0.05$. (C) Análise de redes de interação proteína-proteína com proteínas diferencialmente expressas (up- e down-reguladas) em etanol com relação ao controle. (D) Análise de termos de ontologia gênica e vias enriquecidas a partir de proteínas encontradas up-reguladas em amostras de etanol em comparação ao controle. p-values hiper geométricos > 0.05 .

Essas informações nos indicam que a exposição gestacional ao álcool pode influenciar significativamente a composição protéica do soro, levando a diferenças notáveis entre os grupos estudados. Identificamos proteínas exclusivamente presentes no grupo controle, bem como proteínas exclusivas do grupo de exposição ao álcool. Além disso, observamos níveis significativamente alterados em proteínas compartilhadas por ambos os grupos. Esses resultados destacam a capacidade do álcool de modular as proteínas séricas e sublinham a importância de investigações adicionais para elucidar as implicações dessas alterações para o desenvolvimento do SNC.

6.11 - *Follow up*: acompanhamento do desenvolvimento das crianças após aproximadamente 1 ano de coleta do sangue de cordão umbilical. Para avaliar o desenvolvimento das crianças um ano após o nascimento, sejam elas expostas ou não ao consumo de álcool durante a gestação, conduzimos entrevistas telefônicas com as mães que participaram dos estudos descritos anteriormente e cujas amostras de soro de cordão umbilical foram coletadas. Desenvolvemos um questionário estruturado e objetivo, destinado a avaliar os marcos do desenvolvimento motor, cognitivo e sensorial. Essa avaliação foi baseada nas respostas fornecidas pelas mães que fazem parte deste estudo. Até o momento, obtivemos as respostas de 4 das mães do grupo "controle" e de 2 das mães do grupo "etanol" dentre as 5 mães do primeiro grupo e 4 do segundo grupo, conforme apresentado nas **Tabelas 2**.

Tabelas 2 - Análise das Entrevistas Telefônicas: Descrevendo os marcos do desenvolvimento das Participantes do Estudo

Conforme ilustrado na tabela 2, tanto as crianças controle quanto às expostas ao etanol nasceram dentre as semanas 39 a semana 41, sendo 1 paciente controle, pós-termo (42 semanas), com relatos de ausência de complicações no nascimento.

Conforme descrito anteriormente, a apresentação clínica dos recém-nascidos apresentou características semelhantes (Figura 12). Tanto o peso quanto o comprimento das crianças, considerando as correções de idade no momento da entrevista, não apresentaram diferenças significativas. Ao avaliar o desenvolvimento motor não observamos diferenças nas medianas do início do engatinhar (Figura 20A), embora a mediana do início da posição em pé com apoio tenha sido 80% maior nas crianças expostas ao etanol, uma vez que as mães controle relataram uma média de 8 meses e o etanol O grupo relatou uma média de cerca de 14,5 meses para o início deste marco (Figura 20B). Paralelamente, os meses do evento da transição da posição em pé com apoio para a caminhada sem apoio foi 30% maior nas crianças expostas ao etanol (Figura 20C), em comparação com as crianças controle. Em relação ao desenvolvimento cognitivo e sensorial, observamos diminuição da mediana do tempo de exploração de brinquedos ou objetos em crianças expostas ao etanol em 50% (Figura 20D), o que está correlacionado com o aumento da frequência de brinquedos ou trocas de objetos neste mesmo grupo (Figura 20D e 20E), quando comparadas às crianças controle. A qualidade do sono, também avaliada, mostra que as crianças expostas ao etanol apresentaram aumento na frequência de despertares noturnos, representado pela diminuição da qualidade do sono em 50% (Figura 20F), quando comparadas às crianças controle.



estudo piloto pode sugerir que as crianças expostas ao consumo de álcool durante a gravidez parecem ter um início tardio nos parâmetros motores e cognitivos.

Figura 20. Comparação das respostas do questionário entre os grupos: Análise das respostas no grupo controle (4 pacientes) em relação ao grupo exposto ao etanol (2 participantes) cerca de 1 ano após o nascimento. (A) Início do engatinhar (B) Postura em pé com apoio (C) Caminhada sem suporte (D) Brincar com um brinquedo por um período considerável de tempo (E) Troca de brinquedos com frequência (F) Troca de brinquedos com frequência. (Valores analisados utilizando a mediana).

58

7- DISCUSSÃO

Neste estudo translacional, temos como objetivo compreender os efeitos da exposição gestacional ao etanol analisando as moléculas presentes no soro do sangue de cordão umbilical, especialmente no que se refere à formação da microvasculatura da BHE em desenvolvimento. Para alcançar esse objetivo, dividimos nossa pesquisa em duas etapas. Iniciamos então gerando e analisando dados sobre o perfil e prevalência de consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação.

Na primeira etapa, realizamos um levantamento e rastreamento do consumo de álcool por gestantes admitidas em uma maternidade pública do município do RJ, bem como avaliamos a análise do desenvolvimento pós natal aproximadamente 1 ano após o nascimento das crianças expostas ou não ao consumo de álcool durante a gestação.

Na segunda parte desta dissertação, focamos em investigar os efeitos diretos do soro

do sangue de cordão umbilical dos pacientes sobre as células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMECs) . Descobrimos que o etanol pode induzir a redução nos níveis de proteínas essenciais para o funcionamento adequado da vasculatura cerebral. Além disso, identificamos modificações no secretoma das HBMECs, de proteínas relacionadas à angiogênese e a outros processos biológicos. Essas alterações podem ter implicações significativas no desenvolvimento do cérebro em formação. Por fim, realizamos um estudo de caracterização das moléculas presentes no soro por proteômica, o que nos proporcionou uma compreensão mais aprofundada da interface mãe-feto. Essa análise nos permitiu identificar possíveis mediadores que podem influenciar o desenvolvimento da microvasculatura cerebral durante a gestação, e que podem, talvez, ser apontados futuramente como potenciais biomarcadores das desordens do espectro alcoólico fetal.

7.1- Perfil de consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação: números acima da média global

Diante da constatação de que a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) é uma condição evitável, torna-se imperativo estabelecer políticas públicas e programas de educação e conscientização no Brasil. Além disso, é crucial sensibilizar os profissionais de saúde para a identificação precoce e a mitigação de seus efeitos adversos. É importante ressaltar que, no contexto deste estudo, não havia a prática regular de realizar

59

questionários, testes ou triagens de rastreio do uso de drogas lícitas ou ilícitas durante o acompanhamento das gestantes no sistema público de saúde.

Neste estudo, utilizamos um questionário de auto relato materno sobre o consumo de álcool como ferramenta de rastreamento e constatamos número está acima da média global, que indica um consumo de apenas 10% para gestantes, no presente estudo, cerca de 27% delas relataram o consumo de bebidas alcoólicas em algum momento durante a gestação. Essa disparidade ressalta a subnotificação de TEAF\SAF e a necessidade de intervenção imediata associados ao consumo de álcool durante a gravidez e, conseqüentemente, a incidência da TEAF\SAF em nosso país.

Ao discutirmos as conseqüências causadas pelo consumo de álcool durante a gestação, é necessário considerar as nuances sociais presentes nos diversos grupos socioeconômicos e étnicos, destacamos então a necessidade de fazer recortes dentro do

grupo das participantes do estudo. Observamos que a maior parte das gestantes que reportaram não terem consumido bebidas alcoólicas durante a gestação são brancas (60%) ou pardas (40%), entretanto das mães que reportaram o consumo de álcool durante a gestação 25% das mães eram pretas e 75% pardas. Dessa forma, também foi possível analisar fatores sociais das participantes do estudo, incluindo questões como etnia e cor, a fim de compreender o impacto desses elementos relacionados com a prevalência do consumo de álcool durante a gestação e suas possíveis implicações para o desenvolvimento das crianças.

Visto pelo baixo custo e fácil acesso, o álcool é uma droga de abuso mais difundida nas classes sociais menos favorecidas e há muitas razões para que uma mulher permaneça com o seu vício de alcoolismo durante a gravidez, como: depressão desencadeada pela atitude negativa em relação à gravidez, uma carência afetiva global, um baixo padrão socioeconômico, um estado nutricional comprometido, acesso inadequado à assistência pré-natal, problemas de saúde mental, histórico de abuso físico ou sexual, violência por parceiro íntimo e situação de pobreza (Popova et al., 2023). Em nosso estudo, foi possível rastrear a prevalência de 11% de mães que relataram um consumo contínuo de álcool durante todo o período da gestação, trazendo **um forte início da grandiosidade** de encontrar grandes problemas de saúde pública analisando até mesmo pequenas populações e possibilitando endereçamento de futuras perspectivas de um maior levantamento de dados tão importante para o sistema de saúde do nosso país.

60

É fundamental destacar que, até o momento, o número de pacientes do estudo permanece relativamente limitado. Nossa pesquisa englobou aproximadamente 77 pacientes, considerando apenas uma unidade de saúde perinatal. Este tamanho amostral, embora valioso para nossos propósitos iniciais, é insuficiente para estabelecer uma representação abrangente da prevalência do consumo de álcool durante a gestação. É importante ressaltar que, até o momento, não existe um levantamento oficial de prevalência de TEAF no Brasil, o que realça a necessidade de investigações adicionais em uma escala mais ampla para obtermos uma compreensão mais precisa dessas questões em nosso contexto nacional.

Sofremos a consequência da ausência de dados estatísticos oficiais de prevalência, e obtemos como dados mais próximos, estudos pontuais e isolados, em diferentes regiões

brasileiras, como por exemplo: um estudo realizado no Rio de Janeiro revelou que 40,6% das gestantes estudadas consumiram álcool em algum momento durante a gravidez, enquanto 10,1% continuaram a fazê-lo até o final da gestação. Em São Paulo, outro estudo com pessoas em vulnerabilidade relatou que 33,3% das gestantes consumiam álcool em algum momento da gestação, com 21,4% continuando o consumo durante toda a fase gestacional. Já em Minas Gerais, o estudo de 2017 apontou que 23,1% das gestantes ingeriram álcool em algum momento da gestação, e 6,1% continuaram o consumo até o final da gravidez. (Aparecida C, et al 2017).

No estudo de meta-análise global, nos informa que em países da Europa a cada 10.000 nascidos vivos, 198 indivíduos foram expostos ao álcool, demonstrando a média global mais alta do estudo apresentado. É importante se perguntar se esses números se dão pelo alto acesso a recursos de saúde em países desenvolvidos e se em países com menor desenvolvimento econômico e recursos de saúde limitados, a TEAF\SAF pode ser subdiagnosticada ou mal diagnosticada. O acesso limitado a serviços médicos e a falta de conscientização pública podem resultar em uma menor identificação de casos de TEAF E SAF em diversas regiões. Isso não significa que a TEAF\SAF tenha números baixos, mas sim que ela pode estar subestimada em países com menos infraestrutura para identificação e recursos para pesquisa.

Diante das inúmeras perguntas ainda sem respostas sobre esses fatos, é essencial citar o Dr. Larry Burd e Svetlana Popova ao descreverem nosso cenário atual: **“A TEAF continua a ser um enigma. As taxas de prevalência são altas, mas as taxas de**

61

diagnóstico são baixas. O TEAF representa um enorme fardo clínico e de saúde pública, mas recebe apenas uma atenção modesta dos médicos. O TEAF é mais prevalente do que o autismo (...) no entanto, esses serviços recebem apenas uma pequena fração do que é alocado para o autismo. O TEA é potencialmente evitável, mas o financiamento para a prevenção também é mínimo. O TEAF impõe um fardo enorme à saúde mental, ao bem-estar infantil e aos sistemas correcionais. No entanto, faltam investimentos equivalentes em pesquisa ou prática clínica. Este tem sido o estado do TEAF por décadas.” (Popova S, et al., 2018).

7.2 - Impactos do consumo de álcool para o estabelecimento de TEAF Com base em estudos anteriores, nosso grupo já demonstrou que a exposição gestacional ao etanol

causa impactos significativos no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) (Siqueira et al., 2021). Buscando correlacionar e confirmar esses achados em pacientes humanos, analisamos os primeiros indicadores vitais dos participantes do estudo. Essa abordagem visa estabelecer uma conexão entre as descobertas prévias em modelos animais e os potenciais efeitos em bebês humanos expostos ao álcool durante a gestação.

Apesar de nossos resultados até o momento não terem evidenciado diferenças significativas nos pesos (g) e comprimento (cm) entre os recém-nascidos expostos ao álcool durante a gestação e controles, é essencial ressaltar que um dos pacientes expostos apresentou um escore de APGAR de 6. Esse achado reforça a necessidade da individualidade necessária ao analisarmos as informações dessas crianças. É essencial destacarmos que a ausência de alterações no peso e tamanho ao nascer **não exclui** a possibilidade de impactos no desenvolvimento dessas crianças em fases mais tardias, e em parâmetros que não podem ser analisados na ocasião do nascimento.

Embora a exposição gestacional ao álcool tenha sido confirmada por meio do auto relato das mães, o que se mostra um indicativo importante para futuros diagnósticos, mesmo não havendo alterações evidentes ao nascimento, o acompanhamento cuidadoso do desenvolvimento da criança é crucial para identificar precocemente possíveis problemas de desenvolvimento.

62

7.3 - Análise do desenvolvimento dos participantes do estudo

Conduzimos um acompanhamento, aproximadamente um ano após o nascimento das crianças que faziam parte deste estudo, com o propósito de avaliar se os marcos do desenvolvimento estavam sendo alcançados nas fases esperadas.

Com relação ao desenvolvimento cognitivo, observamos, como o tempo de atenção delas a um objeto e também com relação aos padrões de sono. Aparentemente, crianças que foram expostas ao consumo de álcool durante a gestação parecem trocar com frequência objetos de interesse (brinquedos), sugerindo menores tempo de atenção pelos objetos, e parecem acordar com mais frequência durante a noite, sugerindo alterações na duração das fases do sono. Estudos prévios demonstram que crianças expostas ao alcoolismo materno apresentam profundas modificações de aspectos neurocomportamentais que impactam o desenvolvimento cognitivo (Mattson et al. 2019).

Um aspecto de grande relevância é a avaliação dos marcos de desenvolvimento motor, com foco especial na transição das crianças de engatinhar para se manterem de pé com apoio. No desenvolvimento típico, a maioria dos bebês inicia esse processo, geralmente entre os 9 e 12 meses de idade, segurando-se em objetos ou com o auxílio dos pais, antes de adquirir a capacidade de caminhar de forma independente.

Destacar a diferença significativa entre o marco "ficar em pé com apoio" é essencial para uma análise precisa e relevante. No entanto, é fundamental considerar importantes características relacionadas à idade das crianças para realizar comparações significativas e evitar disparidades.

Um ponto relevante a ser mencionado é o momento do nascimento das crianças, que pode influenciar o desenvolvimento de marcos motores. Por exemplo, ao analisarmos as informações clínicas disponíveis, observamos que o paciente S-etanol 1 nasceu com 41 semanas de gestação, a idade esperada de nascimento. De fato, estudos prévios comprovam que através de análises por neuroimagem e avaliação neurocomportamental de crianças com TEAF, há déficits motores durante o desenvolvimento infantil (Glass et al, 2014).

Realizamos um acompanhamento aproximadamente um ano após o nascimento das crianças envolvidas neste estudo, com o objetivo de avaliar o alcance dos marcos de desenvolvimento esperados.

63

Para avaliar o desenvolvimento cognitivo, analisamos o tempo de atenção das crianças a objetos e seus padrões de sono. Observamos que crianças expostas ao consumo de álcool durante a gestação parecem trocar frequentemente de objetos de interesse, sugerindo menor tempo de atenção aos objetos, e tendem a acordar mais durante a noite, indicando possíveis alterações na duração das fases do sono. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores que destacaram profundas modificações nos aspectos neurocomportamentais em crianças expostas ao alcoolismo materno, impactando seu desenvolvimento cognitivo (Mattson et al., 2019).

A avaliação dos marcos de desenvolvimento motor, com foco especial na transição das crianças de engatinhar para ficar em pé com apoio, é um aspecto crucial deste estudo. Tipicamente, bebês começam esse processo entre os 9 e 12 meses, apoiando-se em

objetos ou com a ajuda dos pais antes de adquirirem a capacidade de caminhar de forma independente. É fundamental ressaltar a diferença significativa observada no marco "ficar em pé com apoio" para uma análise precisa e relevante. No entanto, para realizar comparações significativas e evitar disparidades, é importante considerar o contexto da idade da criança. Nesse sentido, é relevante destacar o caso do paciente S-etanol 1, conforme relatado pela mãe, que atingiu esse marco aos 17 meses de idade. Importante notar que esse paciente nasceu com 41 semanas de gestação, que é a idade esperada de nascimento, não havendo necessidade de correção da idade quando fazemos comparações. Esse detalhe é essencial para considerarmos não apenas a exposição ao álcool, mas também as características individuais de cada criança, incluindo a idade gestacional no nascimento, para uma análise mais precisa e contextualizada.

Estudos anteriores com crianças diagnosticadas com TEAF já comprovaram déficits motores durante o desenvolvimento infantil, tanto por meio de análises de neuroimagem quanto de avaliações neurocomportamentais (Glass et al., 2014).

É crucial ressaltar que, devido às frequentes subnotificações, muitos pacientes só recebem o diagnóstico na fase pré-escolar, quando comportamentos impulsivos e ansiosos se tornam mais evidentes. Portanto, ao compreender estudos prévios com indivíduos expostos ao álcool após o primeiro ano de vida, identificamos uma notável lacuna na literatura científica que aborda essa fase crucial do desenvolvimento.

64

Além disso, é importante mencionar que, devido à falta de profissionais de saúde especializados em desenvolvimento, nosso questionário pode não ter abordado todos os aspectos essenciais. No entanto, mesmo com essa limitação e em amostras reduzidas, conseguimos identificar resultados significativos no desenvolvimento. Isso destaca a relevância dessas descobertas e ressalta o potencial impacto que pesquisas como a nossa podem ter no campo do TEAF/SAF, mesmo quando recursos são limitados. A capacidade de identificar resultados significativos em amostras pequenas pode servir como incentivo para futuras pesquisas e o desenvolvimento de estratégias de intervenção mais eficazes destinadas a crianças afetadas por TEAF.

7.4 - Estudo experimental sobre os impactos das moléculas do soro de cordão umbilical na função da BHE

O SNC é um dos sistemas mais afetados pela exposição ao etanol durante o

desenvolvimento embrionário e fetal. Neste estudo, investigamos se o consumo de bebidas alcoólicas por gestantes pode alterar a composição de moléculas presentes no sangue fetal, e avaliar se estas poderiam impactar a função de células endoteliais da BHE. Utilizando o soro de sangue de cordão umbilical para tratar culturas de HBMECs, nossos resultados indicam que a exposição ao soro levou a uma redução significativa de 68% na proteína ZO-1 em comparação com células expostas ao soro de pacientes controle. A ZO-1 é uma proteína fundamental para a organização das junções ocludentes que compõem a BHE (Guillemot et al., 2007).

Pesquisadores vêm demonstrando estudos onde, a desregulação da expressão e distribuição de ZO-1 pode levar a alterações globais na estrutura das junções ocludentes e induzir a permeabilidade da BHE. Estudos anteriores, demonstram que a exposição pré-natal ao etanol induz a diminuição da expressão de ZO-1 e Claudin-5, bem como a indução das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, resultando em aumento da permeabilidade vascular (George et al., 2018; Haorah et al., 2008) e que este evento está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular (Siqueira et al., em preparação).

Em um estudo sobre o AVC, é destacado que durante a isquemia cerebral, ocorre um aumento na permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE) e uma diminuição em sua estabilidade. Clinicamente, o grau de dano à BHE geralmente está associado a taxas de sobrevivência reduzidas em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico agudo. Recentemente, estudos abrangentes sugeriram que a resposta inflamatória desempenha

65

um papel fundamental na quebra da BHE após a isquemia cerebral. Os inflamassomas, componentes cruciais do sistema imunológico inato, têm sido identificados como participantes importantes na patogênese de várias doenças neurológicas relacionadas à inflamação (Xu et al 2021).

Este estudo concentrou-se na análise do gene AIM2 (absent in melanoma 2) e seu contexto inflamatório. Ao longo dos experimentos, foram examinados os marcadores inflamatórios e os relacionados à integridade da BHE. Os resultados do estudo contribuíram para o entendimento de que a deleção do gene AIM2 reduz o volume do infarto, melhora as funções neurológicas e motoras e diminui a quebra da BHE. Em um ambiente in vitro, a privação e reoxigenação de oxigênio e glicose demonstraram um aumento significativo nos níveis das proteínas AIM2 e ICAM-1, além de uma diminuição

nas proteínas de junção estreita (TJ) ZO-1 e ocludina (Xu Sy et al 2021). Esse estudo corrobora com os dados sobre a integridade da Barreira Hematoencefálica e reforça a conexão entre o contexto inflamatório e a integridade da BHE.

Para compreendermos o impacto do álcool durante o desenvolvimento, um estudo publicado em abril desse ano (2023), onde fornece uma caracterização morfológica e celular fina do desenvolvimento da microvasculatura retiniana e das interações neurovasculares em um modelo de camundongo FASD. Os dados revelaram que o EAF prejudicou o desenvolvimento do plexo vascular superficial. Em particular, a progressão da frente de migração vascular diminuiu significativamente nas retinas EAF, apoiando um atraso na progressão do plexo. Além disso, uma diminuição significativa na densidade dos vasos e no número de vasos perfurantes foi quantificada em camundongos EAF, apoiando menos angiogênese. E lança luz sobre novos caminhos de investigação sobre uma contribuição neurovascular nos efeitos deletérios do álcool na retina em desenvolvimento e apoia que o exame oftalmológico pode tornar-se uma abordagem promissora para a detecção precoce de crianças expostas ao álcool que apresentam defeitos cerebrais neurovasculares. (Dumanoir et al 2023)

Assim, nossos resultados sugerem que a exposição ao etanol durante a gestação pode ter implicações para a integridade vascular. De fato, ensaios de permeabilidade ao corante azul de Evans indicaram que após apenas 5 horas de exposição das HBMECs ao soro de pacientes expostos ao consumo de álcool durante a gestação, já foi suficiente para verificar um aumento significativo da permeabilidade da monocamada endotelial,

66

evento este que possivelmente está relacionado aos menores níveis e/ou desorganização das junções ocludentes.

Nessa linha de pensamento, extrapolando o tema do desenvolvimento e do modelos, em 2005 foi publicado um artigo, onde descreve que uma dose única de etanol em múltiplos parâmetros do processo de cicatrização de feridas in vivo e sugerem um mecanismo potencial pelo qual o etanol prejudica a cicatrização após lesão traumática. Além disso, o conteúdo total de colágeno foi significativamente reduzido nas feridas de camundongos tratados com etanol em comparação com os controles. O efeito mais significativo da exposição ao etanol nas feridas foi na vascularização, havendo redução na densidade dos vasos, apesar dos níveis normais dos fatores pró-angiogênicos VEGF

e fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2), sugerindo um efeito direto da exposição ao etanol na função das células endoteliais. Evidências adicionais de um efeito direto foram observadas em um ensaio de angiogênese *in vitro* no qual a exposição das células endoteliais ao etanol reduziu a capacidade de resposta angiogênica (Radek et al 2005), sugerindo que estes eventos envolvam processos inflamatórios neste contexto.

Além dos nossos resultados sobre a integridade da BHE, investigamos também as proteínas transportadoras de nutrientes. Nesse contexto, os transportadores de glicose no cérebro desempenham um papel crucial para as complexas funções realizadas pelo SNC.

Nossos resultados revelaram que as células endoteliais da microvasculatura cerebral, quando expostas ao soro de pacientes que consumiram álcool durante a gestação, apresentaram uma redução na distribuição da proteína GLUT-1. Estudos prévios, realizados *in vitro* demonstraram que a exposição direta das células endoteliais cerebrais ao etanol também resultou na diminuição da expressão de GLUT1, acompanhada pela redução na captação de glicose por essas células (Siqueira et al., 2021). Esses achados destacam a influência negativa do consumo de álcool durante a gravidez nos mecanismos de transporte de glicose no cérebro, o que pode ter implicações significativas para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central Fetal.

Estudos de análise de moléculas placentárias têm destacado GLUT-1 como o principal marcador relacionado ao crescimento fetal, entre os 20 subtipos que compõem a família de transportadores de glicose (Illsley, et al., 2018). Esses achados sugerem que a redução de GLUT-1 pode ser um indicador para a diminuição do crescimento em bebês,

67

uma vez que a falta do suporte de energia primária para o SNC pode levar a déficits no metabolismo, resultando em redução de áreas cerebrais e problemas no desenvolvimento (Illsley, et al., 2018). Em nosso estudo, por ensaios *in vitro*, descrevemos uma redução dos níveis de GLUT-1 parece ser um indicador de danos potenciais às células endoteliais da BHE, causados pela exposição gestacional ao álcool, causando impactos na transferência adequada de nutrientes para o tecido neural, mediado pela BHE, o que pode contribuir para os déficits do desenvolvimento do SNC, como demonstrado em crianças diagnosticadas com SAF, as quais podem apresentar microcefalia e hipoplasia de diferentes regiões encefálicas.

Com base nos nossos resultados sobre o ensaio de migração, buscamos na literatura científica artigos que pudessem dialogar com meus resultados e descrevo aqui um estudo publicado em 2017 que buscou determinar como o consumo de álcool afeta o potencial angiogênico das células endoteliais cerebrais. Neste estudo, as células endoteliais microvasculares cerebrais de camundongos (MBMVECs) foram utilizadas como modelo. Para investigar o impacto crônico do álcool, um ensaio de migração celular foi conduzido. As células foram tratadas com etanol em concentrações de 5 e 10 mM por 2 horas ou 50 mM por 4 horas, uma vez ao dia, durante 7 dias. Especificamente, este estudo revelou que o etanol a 50 mM aumentou a capacidade angiogênica quando exposto agudamente, mas levou a uma diminuição na capacidade angiogênica quando a exposição foi crônica. (Li J et al 2021)

Esses achados são essenciais para a compreensão dos efeitos do álcool na capacidade angiogênica, especialmente considerando diferentes concentrações e padrões de consumo. Os resultados deste experimento de migração celular apresentam semelhanças com os resultados do nosso estudos, nos levam a refletir sobre os padrões de consumo de álcool entre as pacientes do nosso estudo, além de como as moléculas resultantes do metabolismo do álcool podem afetar várias estruturas no organismo.

7.5- Estudo experimental sobre o efeito das proteínas do soro de sangue de cordão umbilical no perfil secretório endotelial.

Embora vários estudos tenham sugerido previamente que o etanol pode causar danos ao SNC, pouco se sabe como o consumo de álcool durante a gestação pode modificar o perfil molecular no sangue fetal e como essas moléculas circulantes podem afetar a função das células que compõem a vasculatura da BHE. Neste sentido, é fundamental

68

caracterizar a composição molecular de amostras humanas, especificamente a proteica, e avaliar seus efeitos em processos biológicos, especialmente aqueles relacionados ao desenvolvimento vascular no SNC.

Um exemplo notável é a regulação das proteínas TIMP-1, Serpina F1 (PEDF) e Serpina E 1 (PAI-1) na angiogênese fetal, um processo complexo que envolve a regulação do crescimento e a remodelação dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário. A proteína TIMP-1 é um inibidor de metaloproteinases,

enzimas envolvidas na degradação da MEC e que desempenham um papel crucial na regulação da angiogênese (Brew & Nagase, 2010). Estudos destacam que o TIMP-1 tem como função inibir a atividade das metaloproteinases, afetando a migração, proliferação e remodelação das células endoteliais durante a formação dos vasos sanguíneos (Brew et al, 2010).

A PEDF é uma proteína multifuncional que possui propriedades antiangiogênicas. A PEDF tem sido implicada na inibição da formação de novos vasos sanguíneos, bloqueando a proliferação e migração de células endoteliais (Zhang et al, 2018). Por outro lado, a Serpina E1 (PAI-1) inibidor de serpinoprotease, envolvidas na degradação da matriz extracelular. A PAI-1 pode influenciar a angiogênese fetal através da regulação da proteólise da matriz extracelular, que é necessária para a formação e remodelação dos vasos sanguíneos (Bajou et al., 2001). Além disso, a PAI-1 também pode modular a migração de células endoteliais e influenciar o direcionamento de seus comportamentos durante a angiogênese (Schleef et al, 1992). A regulação coordenada dessas proteínas é essencial para a adequada formação e remodelação dos vasos sanguíneos durante a angiogênese fetal. TIMP-1, PEDF e PAI-1 interagem de forma complexa para equilibrar a atividade das metaloproteinases, a formação de novos vasos sanguíneos e a estabilidade dos vasos já formados, garantindo assim um desenvolvimento adequado do sistema vascular durante a gestação.

Também constatamos uma redução nos níveis de Anfiregulina (AREG), IGFBP1 e IGFBP2, indicando que a ingestão de álcool durante o desenvolvimento e pode ter impactos relevantes no processo de angiogênese fetal (Chokkalingam, et al. 2017).

A AREG, é um fator de crescimento que desempenha um papel importante na regulação da proliferação e migração de células endoteliais durante a angiogênese fetal.

69

Sua redução pode levar a alterações na formação dos vasos sanguíneos e comprometer o desenvolvimento adequado do sistema vascular no feto.

Nessa mesma análise, podemos observar que existem alterações em respostas ao tratamento com MC-S-etanol em relação a MC-S-controle, observamos que os níveis de IGFBP 1 apresentaram níveis aproximadamente 52% maiores, nestas condições, e as demais proteínas identificadas

A alteração do perfil de proteínas secretadas por células endoteliais tratadas com S-etanol de fato pode promover alterações no potencial angiogênese, modulando mecanismos chave para este evento como a capacidade de migração celular, que é uma característica fundamental das células endoteliais, seja em eventos fisiológicos, como a formação de novos vasos sanguíneos através da angiogênese, ou na expansão e oxigenação de tecidos durante a embriogênese, como também na reparação tecidual e cicatrização (Mantel, et al., 2013).

De fato observamos que HBMECs expostas ao tratamento do soro, apresentaram redução significativa de sua capacidade migratória, sugerindo um impacto direto das moléculas séricas no potencial angiogênico destas células. Esses achados indicam que a exposição ao álcool durante a gestação pode ter implicações significativas na formação adequada dos vasos sanguíneos no cérebro em desenvolvimento, e potencialmente afetar a formação e função da BHE

Esses achados destacam os efeitos do etanol na formação da rede vascular cortical e nas interações neurovasculares, por isso nossos dados sugerem que a vasculatura em desenvolvimento é um importante alvo das ações teratogênicas e podem contribuir para os déficits observados na TEAF/SAF. Essas descobertas podem contribuir para o entendimento dos efeitos prejudiciais do consumo de álcool durante a gestação e abrir novas perspectivas para compreender o papel da comunicação neurovascular durante o desenvolvimento e em contextos de doenças.

7.6 - Estudo piloto para caracterização de potenciais biomarcadores da TEAF/SAF

Um dos grandes questionamentos que estes estudos levantaram foi em relação à composição molecular do soro de sangue de cordão umbilical dos pacientes. Neste sentido, a realização da análise proteômica das amostras de S-controle e S-etanol, permitiram a identificação e caracterização das proteínas amostras.

70

De acordo com nossos critérios de análise, identificamos um total de 220 proteínas que estavam presentes em diferentes níveis em ambos os grupos, além de proteínas exclusivas a cada grupo. Com o propósito de discernir possíveis marcadores da exposição gestacional ao álcool, examinamos as 10 proteínas exclusivas encontradas no

oro de pacientes expostos ao álcool (S-etanol) e investigamos suas funções biológicas, notando uma relação com a resposta imune adaptativa. Identificamos diferentes variantes das cadeias de imunoglobulinas (IgG) e diversas isoformas de proteínas do sistema complemento. Essas descobertas sugerem que a exposição ao álcool pode ter um impacto substancial na modulação de proteínas e vias relacionadas à resposta imune durante o desenvolvimento fetal.

O sistema imune adaptativo é essencial no desenvolvimento e na proteção contra infecções. Durante o desenvolvimento fetal e neonatal, o sistema imunológico amadurece para responder eficazmente a patógenos específicos. Esse processo envolve a formação de células imunológicas, como linfócitos T e B, na medula óssea e no fígado do feto. Embora o sistema imunológico fetal seja inicialmente imaturo e dependa da imunidade passiva materna, ele desenvolve memória imunológica ao longo do tempo. Isso permite respostas mais rápidas a infecções futuras. O ambiente e as experiências do bebê influenciam significativamente esse desenvolvimento imunológico (Zinkernagel et al, 2003).

Estudos prévios mostram que o consumo de álcool durante a gravidez foi relacionado a um maior risco de infecções bacterianas neonatais, com a identificação de linfócitos anormais e taxas aumentadas de infecções como meningite, pneumonia e otite. As hospitalizações durante o primeiro ano de vida foram significativamente prolongadas em bebês expostos ao álcool no útero, sendo a pneumonia uma das principais razões para internações. Ademais, os recém-nascidos cujas mães tiveram consumo alcoólico excessivo durante a gravidez apresentaram um aumento substancial (15 vezes maior) nas chances de manifestar sinais de sepse bacteriana de início precoce em comparação com recém-nascidos prematuros não expostos ao álcool (Gauthier et al 2015).

Além da identificação destas proteínas também observamos que estas fazem parte de uma rede de interações proteína-proteína, demonstrada pela análise do diagrama *String* confirmando que as proteínas estão conectadas biologicamente como um grupo, e destacando que a ApoA4 se encontra centralizada na rede de interações, demonstrando

71

que esta é relevante para regular vias relacionadas por outras proteínas com as quais ela interage.

Embora a avaliação das diferenças dos níveis proteicos entre as duas amostras seja

relevante, também foi possível verificar que algumas proteínas eram exclusivas apenas em S-etanol. Neste sentido a ausência destas no S-controle, poderia indicar um perfil exclusivo apenas encontrado em pacientes expostos ao consumo de álcool durante a gestação.

Nos últimos anos a busca por biomarcadores da TEAF/SAF tem se revelado um grande desafio. Neste sentido, nosso estudo pode contribuir para a descrição de potenciais biomarcadores neste contexto. De fato a maioria, 8, das 10 proteínas encontradas exclusivamente presentes em S-etanol são subunidades de IgG (IGHV2-70D, IGHV3-20, IGHV3-64, IGHV18, IGHV5-51, IGLV2-11, IGLV3-1, IGKV1-9). Das outras 2 proteínas, uma delas está envolvida com mecanismos de mineralização óssea, a osteomodulina (OMD) e outra é a proteína sérica amilóide (SAA2), uma apolipoproteína relacionada à fase aguda da inflamação, lesão tecidual e metabolismo de ácidos graxos (Young et al, 2015).

Como mencionado anteriormente, a exposição ao álcool é capaz de afetar o desenvolvimento do sistema imune fetal (Gauthier et al., 2015; Johnson et al., 1981). As IgGs são componentes da resposta imune adaptativa humoral, produzidas por linfócitos B diferenciados e reconhecem antígenos específicos. O sítio de ligação ao antígeno é formado pelo domínio variável de uma cadeia pesada, juntamente com o da sua cadeia leve associada (Schroeder & Cavacini, et al 2010). Assim, cada imunoglobulina possui dois locais de ligação ao antígeno com notável afinidade por um antígeno específico. Os domínios variáveis são montados por um processo denominado rearranjo V-(D)-J e podem então ser submetidos a hiper mutações somáticas que, após exposição ao antígeno e seleção, permitem a maturação da afinidade para um determinado antígeno (Teng G, et al, 2007). Logo, como em nosso estudo observamos um enriquecimento de isoformas específicas de IgGs exclusivamente no S-etanol, isto poderia indicar um mecanismo alterado de produção, rearranjos V-(D)-J e de liberação destas proteínas por linfócitos B pelo sistema imune fetal, diferente do esperado para o desenvolvimento do indivíduo, podendo indicar um padrão único em indivíduos expostos ao consumo gestacional de álcool.

Por outro lado, além destas IgGs a presença de proteínas relacionadas ao desenvolvimento ósseo ou mesmo a metabolismo de ácidos graxos, como a OMD e

SAA2, também podem indicar uma resposta à lesão tecidual e resposta aguda à inflamatória, respectivamente, devido a indução de toxicidade promovida pelo etanol. Embora não haja estudos correlacionando a OMD aos déficits no desenvolvimento ósseo observado em indivíduos portadores de TEAF/SAF, já foi demonstrado que adolescentes expostos ao álcool durante a gestação por suas mães, apresentam ossos mais curtos e possuem menor densidade mineral óssea (Young et al., 2022). Surpreendentemente, neste mesmo estudo, crianças nos primeiros anos de vida expostas ou não ao consumo gestacional de álcool, não apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento ósseo, confirmando que em muitos casos, o estabelecimento de alterações relacionadas a TEAF/SAF pode ser mais tardio, demonstrando a importância de se desenvolver biomarcadores precoces para tais alterações. Nossos achados podem contribuir para estudos futuros nesta área.

Além disso, também não existem estudos correlacionando os efeitos do alcoolismo materno e a modulação dos níveis de SAA2. Entretanto, um estudo prévio demonstrou que a administração de etanol 6g/kg induz o aumento dos níveis séricos de SAA2, e que este evento é dependente da ativação de receptor do tipo Toll 4 (TLR4), aumentando a resposta inflamatória (Pruett et al, 2006).

Um estudo publicado em 2016, parte da premissa da permeabilidade como seu ponto de partida para analisar pacientes com Alzheimer e as vias inflamatórias que são frequentemente observadas na circulação periférica. Neste estudo, foram investigados os marcadores inflamatórios séricos e as respostas imunes periféricas, bem como os marcadores inflamatórios no cérebro. Os resultados concluíram que o comprometimento da BHE está correlacionado com as alterações nas respostas imunes periféricas (Susmita Sil.,2016)

Em 2017, foi publicado um estudo no modelo animal e reforçou que a ativação excessiva do sistema imunológico materno pode resultar em anomalias no desenvolvimento neurológico de seus descendentes. Foram identificadas que mudanças nos padrões de citocinas maternas durante a gravidez, principalmente o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, podem influenciar o risco de TEAF\SAF. Embora os mecanismos exatos pelos quais as citocinas contribuem para o FASD ainda

influência sobre o desenvolvimento cerebral fetal. A possibilidade de que desequilíbrios na regulação das citocinas durante a gravidez possam ter efeitos distintos no FASD justifica a necessidade de investigações adicionais (Sowell et al, 2017)

Embora nosso estudo ainda não possua um número grande de amostras representativas da população, conseguimos identificar preliminarmente por análise proteômica algumas proteínas que podem ser candidatas e estudos futuros para confirmar seu potencial como biomarcadores para a TEAF/SAF e indicadores para o diagnóstico precoce. Além disso, é importante mencionar que ainda será necessário testar e validar se estas proteínas enriquecidas nas amostras S-etanol estão envolvidas nos efeitos observados nos ensaios *in vitro* que demonstraram alterações importantes na função das células endoteliais da BHE. Nossos achados por proteoma, também precisarão ser correlacionados com as alterações do desenvolvimento fetal, sendo ainda necessários estudos com modelos *in vivo* para comprovar se alteração do perfil proteico no sangue em crianças expostas ao consumo gestacional de bebidas alcoólicas pode desencadear as diversas alterações corporais observadas na TEAF/SAF, como as observadas no SNC em desenvolvimento.

Em conclusão, é fundamental a realização de mais estudos translacionais que acompanhem a dinâmica do consumo de álcool por gestantes, identifiquem o tamanho de nossa população sujeita a algum tipo de vulnerabilidade, empregar ferramentas *in vitro*, utilizar análises de estruturas essenciais e conduzir análises ômicas, além de todas as etapas educacionais necessárias, com essas abordagens, poderemos, em um futuro próximo, reduzir as lacunas de compreensão em relação a uma síndrome evitável, dada a tecnologia disponível na atualidade. Essas descobertas têm o potencial de impactar positivamente a saúde pública, fornecendo informações cruciais para a prevenção e intervenção precoces, com o objetivo de proteger o desenvolvimento saudável do sistema nervoso central em bebês expostos ao álcool durante a gestação.

74

8- CONCLUSÕES:

- Com base nas informações dos formulários preenchidos no nosso estudo, aproximadamente 28% das mães acompanhadas no Núcleo Perinatal do Hospital Pedro Ernesto afirmaram ter consumido álcool durante a gestação.
- Identificamos que a maioria das gestantes, 72,2%, relataram o consumo no 1º

trimestre, em comparação com 16,7% e 11,1% das gestantes que reportaram o consumo no 2º e 3º trimestres, respectivamente.

- Observamos que dentre as gestantes que relataram consumo no 1º trimestre, a maioria delas, 53,3%, estava incluída na faixa etária de 33-43 anos de idade, e que a maioria era de mulheres pardas e pretas;
- As moléculas presente no S-etanol, são capazes de reduzir os níveis proteicos do transportador de glicose GLUT-1 e os níveis da proteína de junção ocludente ZO-1 em HBMECs, sugerindo uma perda de função de transporte de nutrientes e de barreira destas células;
- A exposição de HBMECs ao S-etanol induziu o aumento dos níveis de secreção de 15 proteínas relacionadas à angiogênese e a outros processos biológicos essenciais como, proliferação, migração, resposta inflamatória e sinaptogênese. Esta alteração de fato foi capaz de alterar o potencial de migração celular e a permeabilidade paracelular endotelial, demonstrando que moléculas presentes no S-etanol causam disfunções estruturais e funcionais em células da BHE;
- A caracterização proteômica do S-etanol e do S-controle, demonstrou um padrão de proteínas exclusivas para estas amostras e ainda a modulação dos níveis de proteínas comuns em ambas, sendo neste último caso os níveis alterados em amostras S-etanol;

Este estudo proporcionou uma contribuição inédita, revelando que as moléculas presentes no soro do sangue do cordão umbilical de mães que consumiram álcool durante a gestação desempenham um papel fundamental nas ações teratogênicas do etanol durante o desenvolvimento fetal. Essa descoberta fortalece a base da nossa hipótese e aponta para novos caminhos na compreensão da extensão dos impactos do sistema imunológico, da permeabilidade da barreira hematoencefálica e das vias pró-inflamatórias associadas ao consumo de álcool.

75

Esses resultados representam um avanço significativo no nosso entendimento dos efeitos prejudiciais do consumo de álcool durante a gravidez. Eles têm o potencial de contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores, além disso, ressaltam a importância crucial de políticas públicas de saúde preventivas, visando aumentar a conscientização sobre os riscos do consumo de álcool durante a gestação e suas

consequências evitáveis, que ainda são lamentavelmente frequentemente negligenciadas.

76

9. Referências:

- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jun;8(6):464-78. doi: 10.1038/nrm2183. PMID: 17522591. ● APARECIDA, C. Efeitos do Álcool na Gestante, no Feto e no Recém-Nascido. 2ª ed. São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo, 2017.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE. The Apgar Score. *Pediatrics.* 2015 Oct;136(4):819-22. doi: 10.1542/peds.2015-2651. PMID: 26416932.
- Astley SJ, Clarren SK. Diagnosing the full spectrum of fetal alcohol-exposed individuals: introducing the 4-digit diagnostic code. *Alcohol Alcohol.* 2000 Jul-Aug;35(4):400-10. doi: 10.1093/alcalc/35.4.400. PMID: 10906009.
- Bager H, Christensen LP, Husby S, Bjerregaard L. Biomarkers for the Detection of Prenatal Alcohol Exposure: A Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017 Feb;41(2):251-261. doi: 10.1111/acer.13309. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28098942.
- Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noël A. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):777-84. doi: 10.1083/jcb.152.4.777. PMID: 11266468; PMCID: PMC2195770.
- Balda MS, Anderson JM, Matter K. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett.* 1996 Dec 16;399(3):326-32. doi: 10.1016/s0014-5793(96)01352-x. PMID: 8985173.
- Bertrand J, Floyd RL, Weber MK. Fetal alcohol syndrome: guidelines for referral and diagnosis. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); National Task Force on Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Effect; 2004.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):55-71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003. Epub 2010 Jan 15. PMID: 20080133; PMCID: PMC2853873.
- Caputo C, Wood E, Jabbour L. Impact of fetal alcohol exposure on body systems: A systematic review. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016 Jun;108(2):174-80. doi: 10.1002/bdrc.21129. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27297122.
- Choi YK, Kim KW. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep.* 2008 May 31;41(5):345-52. doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.5.345. PMID: 18510863.
- Chudley AE, Conry J, Cook JL, Loock C, Rosales T, LeBlanc N; Public Health Agency of Canada's National Advisory Committee on Fetal Alcohol Spectrum Disorder. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *CMAJ.* 2005 Mar 1;172(5 Suppl):S1-S21. doi: 10.1503/cmaj.1040302. PMID: 15738468; PMCID: PMC557121.
- Cook JL, Green CR, Lilley CM, Anderson SM, Baldwin ME, Chudley AE, Conry JL, LeBlanc N, Loock CA, Lutke J, Mallon BF, McFarlane AA, Temple VK, Rosales T; Canada Fetal Alcohol

Spectrum Disorder Research Network. Fetal alcohol spectrum disorder: a guideline for diagnosis across the lifespan. *CMAJ*. 2016 Feb 16;188(3):191-197. doi: 10.1503/cmaj.141593. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26668194; PMCID: PMC4754181.

77

- Dannemann M, Andrés AM, Kelso J. Introgression of Neandertal- and Denisovan-like Haplotypes Contributes to Adaptive Variation in Human Toll-like Receptors. *Am J Hum Genet*. 2016 Jan 7;98(1):22-33. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.015. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2016 Feb 4;98(2):399. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2016 Feb 4;98(2):399. PMID: 26748514; PMCID: PMC4716682.
- Dong T, Hu W, Zhou X, Lin H, Lan L, Hang B, Lv W, Geng Q, Xia Y. Prenatal exposure to maternal smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: A meta-analysis. *Reprod Toxicol*. 2018 Mar;76:63-70. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.12.010. Epub 2017 Dec 30. PMID: 29294364.
- Dumanoir M, Leroy A, Burel D, Laquerrière A, Janin F, Lebon A, Valet M, Godefroy D, Przegralk L, Lecointre M, Picaud S, Marret S, Marguet F, Gonzalez BJ, Brasse-Lagnel C. *In Utero* Alcohol Exposure Impairs Retinal Angiogenesis and the Microvessel-Associated Positioning of Calretinin Interneurons. *eNeuro*. 2023 Apr 26;10(4):ENEURO.0295-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0295-22.2022. PMID: 37068950; PMCID: PMC10135090.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 2004 Jan 1;117(Pt 1):19-29. doi: 10.1242/jcs.00930. PMID: 14657270.
- Furuse M, Takai Y. Recent advances in understanding tight junctions. *Fac Rev*. 2021 Feb 23;10:18. doi: 10.12703/r/10-18. PMID: 33718935; PMCID: PMC7946388. • Gauthier TW. Prenatal Alcohol Exposure and the Developing Immune System. *Alcohol Res*. 2015;37(2):279-85. PMID: 26695750; PMCID: PMC4590623.
- George AK, Behera J, Kelly KE, Mondal NK, Richardson KP, Tyagi N. Exercise Mitigates Alcohol Induced Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Cognitive Impairment through ATF6-Herp Signaling. *Sci Rep*. 2018 Mar 26;8(1):5158. doi: 10.1038/s41598-018-23568-z. PMID: 29581524; PMCID: PMC5980102.
- Glass L, Ware AL, Mattson SN. Neurobehavioral, neurologic, and neuroimaging characteristics of fetal alcohol spectrum disorders. *Handb Clin Neurol*. 2014;125:435-62. doi: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00025-2. PMID: 25307589.
- Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol*. 2009 Mar-Apr;44(2):108-14. doi: 10.1093/alcalc/agn105. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19147799; PMCID: PMC2724862.
- Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):601-13. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.09.032. Epub 2007 Oct 9. PMID: 18339298.
- Gupta KK, Gupta VK, Shirasaka T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016 Aug;40(8):1594-602. doi: 10.1111/acer.13135. Epub 2016 Jul 4. PMID: 27375266.
- Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, Miller DW, Persidsky Y. Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Jun;29(6):999-1009. doi: 10.1097/01.alc.0000166944.79914.0a. PMID: 15976526.

- Hansmeier N, Chao TC, Goldman LR, Witter FR, Halden RU. Prioritization of biomarker targets in human umbilical cord blood: identification of proteins in infant blood serving as validated biomarkers in adults. *Environ Health Perspect.* 2012 May;120(5):764-9. doi: 10.1289/ehp.1104190. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22538116; PMCID: PMC3346780.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1 Suppl):218S-26S. doi: 10.1093/jn/136.1.218S. PMID: 16365086.
- Hoyme HE, May PA, Kalberg WO, Kodituwakku P, Gossage JP, Trujillo PM, Buckley DG, Miller JH, Aragon AS, Khaole N, Viljoen DL, Jones KL, Robinson LK. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatrics.* 2005 Jan;115(1):39-47. doi: 10.1542/peds.2004-0259. PMID: 15629980; PMCID: PMC1380311.
- Illsley NP, Baumann MU. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Feb 1;1866(2):165359. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.010. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30593896; PMCID: PMC6594918.
- Institute of Medicine (US) Committee on Assessing Interactions Among Social, Behavioral, and Genetic Factors in Health. *Genes, Behavior, and the Social Environment: Moving Beyond the Nature/Nurture Debate.* Hernandez LM, Blazer DG, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2006. PMID: 20669442.
- Koop DR. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Res Health.* 2006;29(4):274-80. PMID: 17718406; PMCID: PMC6527031.
- Mattson SN, Bernes GA, Doyle LR. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Review of the Neurobehavioral Deficits Associated With Prenatal Alcohol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019 Jun;43(6):1046-1062. doi: 10.1111/acer.14040. Epub 2019 May 2. PMID: 30964197; PMCID: PMC6551289.
- McQuire C, Mukherjee R, Hurt L, Higgins A, Greene G, Farewell D, Kemp A, Paranjothy S. Screening prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in a region of the United Kingdom: A population-based birth-cohort study. *Prev Med.* 2019 Jan;118:344-351. doi: 10.1016/j.ypmed.2018.10.013. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30503408; PMCID: PMC6344226.
- Moore G, Audrey S, Barker M, Bond L, Bonell C, Cooper C, Hardeman W, Moore L, O'Cathain A, Tinati T, Wight D, Baird J. Process evaluation in complex public health intervention studies: the need for guidance. *J Epidemiol Community Health.* 2014 Feb;68(2):101-2. doi: 10.1136/jech-2013-202869. Epub 2013 Sep 10. Erratum in: *J Epidemiol Community Health.* 2014 Jun;68(6):585. PMID: 24022816; PMCID: PMC3892708.
- Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):562-71. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.12.015. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18206110; PMCID: PMC2276178.
- Popova S, Lange S, Shield K, Burd L, Rehm J. Prevalence of fetal alcohol spectrum disorder among special subpopulations: a systematic review and meta-analysis. *Addiction.* 2019 Jul;114(7):1150-1172. doi: 10.1111/add.14598. Epub 2019 Apr 29. PMID: 30831001; PMCID: PMC6593791.
- Popova S, Lange S, Burd L, Chudley AE, Clarren SK, Rehm J. Cost of fetal alcohol spectrum disorder diagnosis in Canada. *PLoS One.* 2013 Apr 4;8(4):e60434. doi: 10.1371/journal.pone.0060434. PMID: 23593216; PMCID: PMC3617033.

- Pamela BL Pun, Jia Lu & Shabbir Moochhala. Envolvimento de ROS na disfunção da BBB, *Free Radical Research*, 2009

79

- Pruett, S. R., & Chan, F. (2006). The development and psychometric validation of the Disability Attitude Implicit Association Test. *Rehabilitation Psychology*, 51(3), 202–213. <https://doi.org/10.1037/0090-5550.51.3.202>
- Radek KA, Matthies AM, Burns AL, Heinrich SA, Kovacs EJ, Dipietro LA. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Sep;289(3):H1084-90. doi: 10.1152/ajpheart.00080.2005. Epub 2005 Apr 29. PMID: 15863463.
- Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. 2013 Mar 16;(73):e50062. doi: 10.3791/50062. PMID: 23524912; PMCID: PMC3639515. ● Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev*. 2011 Jun;21(2):73-80. doi: 10.1007/s11065-011-9166-x. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21499711; PMCID: PMC3779274.
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID: 20176268; PMCID: PMC3670108.
- Shi J, Wang L, Zou C, Xia Y, Qin S, Keller E, Mizokami A, Zhang J, Lu Y. Tumor microenvironment promotes prostate cancer cell dissemination via the Akt/mTOR pathway. *Oncotarget*. 2018 Jan 9;9(10):9206-9218. doi: 10.18632/oncotarget.24104. PMID: 29507684; PMCID: PMC5823632.
- Siqueira M, Araujo APB, Gomes FCA, Stipursky J. Ethanol Gestational Exposure Impairs Vascular Development and Endothelial Potential to Control BBB-Associated Astrocyte Function in the Developing Cerebral Cortex. *Mol Neurobiol*. 2021 Apr;58(4):1755-1768. doi: 10.1007/s12035-020-02214-8. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33387302.
- Siqueira M, Francis D, Gisbert D, Gomes FCA, Stipursky J. Radial Glia Cells Control Angiogenesis in the Developing Cerebral Cortex Through TGF- β 1 Signaling. *Mol Neurobiol*. 2018 May;55(5):3660-3675. doi: 10.1007/s12035-017-0557-8. Epub 2017 May 18. PMID: 28523566.
- Siqueira M, Stipursky J. Blood brain barrier as an interface for alcohol induced neurotoxicity during development. *Neurotoxicology*. 2022 May;90:145-157. doi: 10.1016/j.neuro.2022.03.009. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35307464.
- Sowell KD, Uriu-Adams JY, Van de Water J, Chambers CD, Coles CD, Kable JA, Yevtushok L, Zymak-Zakutnya N, Wertelecki W, Keen CL; Collaborative Initiative on Fetal Alcohol Spectrum Disorders (CIFASD). Implications of altered maternal cytokine concentrations on infant outcomes in children with prenatal alcohol exposure. *Alcohol*. 2018 May;68:49-58. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.08.006. Epub 2017 Aug 12. PMID: 29453023; PMCID: PMC5820219.
- Spindler KR, Hsu TH. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol*. 2012 Jun;20(6):282-90. doi: 10.1016/j.tim.2012.03.009. Epub 2012 May 6. PMID: 22564250; PMCID: PMC3367119.
- Stipursky J, Francis D, Dezone RS, Bérnago de Araújo AP, Souza L, Moraes CA, Alcantara Gomes FC. TGF- β 1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 21;8:393. doi: 10.3389/fncel.2014.00393. Erratum in: *Front Cell Neurosci*. 2015;9:232. PMID: 25484855; PMCID: PMC4240069. .
- Stipursky J, Gomes FC. TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in

vitro: implications for radial glia development. *Glia*. 2007 Aug 1;55(10):1023-33. doi: 10.1002/glia.20522. PMID: 17549683.

80

- Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet*. 2007;41:107-20. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130340. PMID: 17576170.
- Xu SY, Bian HJ, Shu S, Xia SN, Gu Y, Zhang MJ, Xu Y, Cao X. AIM2 deletion enhances blood-brain barrier integrity in experimental ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther*. 2021 Oct;27(10):1224-1237. doi: 10.1111/cns.13699. Epub 2021 Jun 22. PMID: 34156153; PMCID: PMC8446221.
- Wälchli T, Wacker A, Frei K, Regli L, Schwab ME, Hoerstrup SP, Gerhardt H, Engelhardt B. Wiring the Vascular Network with Neural Cues: A CNS Perspective. *Neuron*. 2015 Jul 15;87(2):271-96. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.038. PMID: 26182414.
- Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet*. 2006 Apr 1;15(7):1169-79. doi: 10.1093/hmg/ddl032. Epub 2006 Feb 23. PMID: 16497725.
- Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019 Feb 1;316(2):C135-C153. doi: 10.1152/ajpcell.00136.2018. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30379577; PMCID: PMC6397344.
- Peguera B, Segarra M, Acker-Palmer A. Neurovascular crosstalk coordinates the central nervous system development. *Curr Opin Neurobiol*. 2021 Aug;69:202-213. doi: 10.1016/j.conb.2021.04.005. Epub 2021 May 30. PMID: 34077852; PMCID: PMC8411665.
- Yoshida T, Akiba J, Matsui T, Nakamura K, Hisamoto T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Yamagishi SI, Torimura T. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice. *Dig Dis Sci*. 2017 Jun;62(6):1527-1536. doi: 10.1007/s10620-017-4550-x. Epub 2017 Apr 1. PMID: 28365916.
- Zinkernagel RM. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001 Nov 1;345(18):1331-5. doi: 10.1056/NEJMra012493. PMID: 11794153.