

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

O alto consumo de etanol parental pós-púbere e o desenvolvimento e a
inflamação mamária e ovariana na prole feminina não exposta

VANESSA CAROLINE FIORAVANTE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Francisco Eduardo Martinez

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

O alto consumo de etanol parental pós-púbere e o desenvolvimento e a
inflamação mamária e ovariana na prole feminina não exposta

VANESSA CAROLINE FIORAVANTE

Prof. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

Dra. JOYCE REGINA ZAPATERINI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Francisco Eduardo Martinez

BOTUCATU – SP
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Fioravante, Vanessa Caroline.

O alto consumo de etanol parental pós-púbere e o desenvolvimento e a inflamação mamária e ovariana na prole feminina não exposta / Vanessa Caroline Fioravante. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Coorientador: Joyce Regina Zapaterini

Capes: 20100000

1. Etanol. 2. Mamas. 3. Ovários. 4. Genealogia.
5. Reprodução.

Palavras-chave: Etanol; Mama; Ovário; Preconcepção; Prole.

Impacto potencial desta pesquisa

A pesquisa tem impacto para a sociedade visto o crescente uso de álcool entre os jovens, ressaltando a importância dos cuidados pré-concepcionais para as futuras gerações. Além disso, a relação do consumo parental pós-púbere sobre os parâmetros reprodutivos da prole feminina não exposta permanece inconclusiva, necessitando de maior atenção. Outro ponto importante é a avaliação da contribuição individual, materna ou paterna, ou de ambos os pais para os efeitos observados na prole, mostrando que a importância do cuidado pré-concepcional não é apenas da mãe, pois ambos os pais podem contribuir.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O alto consumo de etanol parental pós-púbere e o desenvolvimento e a inflamação mamária e ovariana na prole feminina não exposta

AUTORA: VANESSA CAROLINE FIORAVANTE

ORIENTADOR: FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

COORDINADORA: JOYCE REGINA ZAPATERINI ROSSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências da Botucatu - Unesp

Profa. Dra. CIBELE DOS SANTOS BORGES (Participação Virtual)
Departamento de Biociências / Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Profa. Dra. ANA CAROLINA INHASZ KISS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências da Botucatu - Unesp

Dr. SÉRGIO ALEXANDRE ALCANTARA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Cancer Signaling and Microenvironment / Fox Chase Cancer Center

Botucatu, 29 de agosto de 2024

Documento assinado digitalmente
 MARI VICTÓRIA RAMALHO DA CUNHA
Data: 02/09/2024 17:05:47 -0300
CPF: 093.910.110-04, validade 03/09/25

Mari Vitória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II de Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Campus de Botucatu -
Rua Christa Antônia Carlos Prigent Zarco, s/nº, 13051-860
<https://www.ibe.unesp.br/Instituto-de-Biociencias/programa-de-pos-graduacao/programa-de-pos-graduacao-biologia-geral-e-aplicada/CPF%3A09391011004>

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me auxiliado durante todo esse percurso.

Ao meu orientador, Francisco Eduardo Martinez, por cada minuto concedido. Seus questionamentos reflexivos, e por vezes intrigantes, me mostraram que na vida precisamos ter coragem e persistência para alcançar o objetivo almejado.

A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos. Devo todas as minhas conquistas a vocês. Sou o que sou por todo amor que demonstram por mim.

Aos membros titulares e suplentes da minha banca de defesa do Doutorado, pela disponibilidade em participar desse momento e compartilhar conhecimento para lapidação da minha tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste projeto, concedido na forma de Bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste projeto, concedido na forma de Bolsa de Doutorado (Processo nº 2021/00355-0).

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e formação.

Muito obrigada! Minha eterna gratidão!

“A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam positivamente que esse ou aquele problema nunca pode ser resolvido pela ciência.” - Charles Darwin

Resumo

Introdução: A influência parental sobre os descendentes se inicia antes da concepção, portanto, a mãe e o pai são decisivos no desenvolvimento, nas alterações fenotípicas e na gênese de doenças na prole. Estudos prévios relataram que exposição alcoólica parental no período púbere prejudica o desenvolvimento da prole feminina e masculina, sendo os mecanismos envolvidos menos evidentes nas fêmeas. Assim, com o crescente uso do etanol entre os jovens, são necessários estudos que verifiquem seu prejuízo às futuras gerações. Dessa forma, avaliamos se o consumo de alta quantidade de etanol parental na pós-puberdade interfere no desenvolvimento, no estresse oxidativo, na inflamação e na fisiologia do ovário e da mama em diferentes idades, e a contribuição materna, paterna ou de ambos para os efeitos observados. **Material e métodos:** 40 casais de ratos da variedade UChB, consumidores voluntários de alta quantidade de etanol (> 2g / kg / dia), foram distribuídos em quatro grupos (n = 10 casais / grupo): controle (C), alimentados com ração e água; etanol (E), alimentados com ração, água e acesso livre ao etanol por machos e fêmeas; mães expostas ao etanol (ME), alimentados com ração e água, sendo o acesso ao etanol exclusivo das fêmeas, e pais expostos ao etanol (PE), alimentados com ração e água, sendo o acesso ao etanol exclusivo dos machos. Os animais com acesso ao etanol receberam uma garrafa de etanol a 10% do dia pós-natal (DPN) 65 ao 80, com retirada após esse período. O acasalamento ocorreu no DPN 100. No nascimento da prole, as fêmeas foram monitoradas, sendo divididas em quatro fases: juvenil (DPN 30), púbere (DPN 50), adulta (DPN 150) e adulta tardia (DPN 300). Os ovários e as mamas foram coletados, pesados e armazenados. Uma parte da glândula mamária foi destinada para contabilizar o número de brotos terminais (TEB) e os parâmetros de crescimento. ER- α , PR, TGF- β 1 e NF-kB foram analisados por *Western blot*. A apoptose e os folículos ovarianos foram avaliados por HE, enquanto a proliferação celular por imuno-histoquímica. Os mediadores pró-inflamatórios, hormônios reprodutivos e o estresse oxidativo também foram dosados. **Resultados:** A prole E apresentou atraso no desenvolvimento físico, na instalação da puberdade e aumento da distância anogenital, enquanto os grupos tratados apresentaram baixo peso corpóreo pré-desmame e alteração no consumo alimentar. Na glândula mamária, observamos aumento na expressão de TGF- β 1 em E, de PR em ME e ER- α em PE. Menor perímetro mamário, em E e PE, e contagem de TEBs, em PE, foi observado. Em relação ao ovário, observamos, em todos os grupos, menor expressão de ER- α e PR e aumento de citocinas pró-inflamatória. Menor porcentagem de proliferação da granulosa em PE e ME no DPN 300, e nos níveis de estradiol, em E no DPN 30, também foram observados. Menor expressão de TGF- β 1 e aumento da enzima antioxidante e do NF-kB foram constatados apenas em E. **Conclusões:** O uso alcoólico parental pós-púbere interfere no desenvolvimento físico e nos parâmetros reprodutivos da prole feminina não exposta, com resultados modulados segundo o uso materno, paterno ou por ambos os pais. O consumo alcoólico por ambos os pais acentua seus efeitos, principalmente, sobre as características de desenvolvimento físico, níveis hormonais e puberdade. Em relação aos tecidos hormônios-dependentes, o ovário mostrou-se mais suscetível comparado à glândula mamária, sendo o consumo por ambos os pais capaz de aumentar os níveis da enzima antioxidante devido a possível inflamação na idade adulta tardia. A glândula mamária alterou a expressão de receptores em idades pontuais, mas não o seu desenvolvimento geral. O consumo por ambos os pais e exclusivamente paterno alteraram maior quantidade de parâmetros. Segundo nossas análises, o consumo por ambos os pais influencia significativamente a prole feminina, seguido pelo consumo exclusivamente paterno e, posteriormente, o materno. Nossos resultados contribuem na conscientização do uso do etanol precoce e pré-concepcional para as futuras gerações.

Palavras-chave: preconcepção; etanol; desenvolvimento; mama; ovário; inflamação; prole; fêmeas; reprodução.

Abstract

Background: Parental influence on offspring begins before conception; therefore, both mother and father are crucial in the development, phenotypic changes, and genesis of diseases in their progeny. Previous studies have reported that parental alcohol exposure during puberty impairs the development of both male and female offspring, with the mechanisms involved being less evident in females. Thus, with the high use of ethanol among young people, studies are needed to verify its impact on future generations. In this context, we evaluated whether high parental ethanol consumption in post-puberty interferes with development, oxidative stress, inflammation, and the physiology of the ovary and mammary gland at different ages, as well as the maternal, paternal, or combined contributions to the observed effects. Our results contribute to raising awareness of the impact of early and pre-conceptional ethanol use on future generations. **Material and Methods:** Forty pairs of UChB rats, voluntary consumers of high amounts of ethanol (> 2g/kg/day), were distributed into four groups (n = 10 pairs/group): Control (C), fed with standard chow and water; Ethanol (E), fed with standard chow, water, and free access to ethanol by males and females; Ethanol-exposed Mothers (ME), fed with standard chow and water, with ethanol access restricted to females; and Ethanol-exposed Fathers (PE), fed with standard chow and water, with ethanol access restricted to males. The animals with ethanol access received a 10% ethanol bottle from postnatal day (PND) 65 to 80, with removal after this period. Mating occurred on PND 100. Upon offspring birth, the females were monitored and divided into four phases: juvenile (PND 30), pubertal (PND 50), adult (PND 150), and late adult (PND 300). The ovaries and mammary glands were collected, weighed, and stored. A portion of the mammary gland was used to count terminal end buds (TEB) and growth parameters. ER- α , PR, TGF- β 1, and NF- κ B were analyzed by Western blot. HE evaluated apoptosis and ovarian follicles, while cell proliferation was assessed by immunohistochemistry. Pro-inflammatory mediators, reproductive hormones, and oxidative stress were also measured. **Results:** The E offspring showed delayed physical development, delayed puberty onset, and increased anogenital distance, while all groups exhibited low pre-weaning body weight and altered food intake. In the mammary gland, we observed increased TGF- β 1 expression in E, PR in ME, and ER- α in PE. Reduced mammary perimeter in E and PE, and TEB counts in PE were observed. All groups showed reduced ER- α and PR expression and increased pro-inflammatory cytokines regarding the ovary. Lower granulosa cell proliferation in PE and ME on PND 300 and reduced estradiol levels in E on PND 30 were also observed. Lower TGF- β 1 expression and increased antioxidant enzyme and NF- κ B levels were found only in E. **Conclusions:** Post-pubertal parental alcohol use interferes with physical development and reproductive parameters in ethanol-naïve offspring, with results modulated by maternal, paternal, or combined parental use. Alcohol consumption by both parents exacerbates its effects, particularly on physical development, hormonal levels, and puberty onset. Regarding hormone-dependent tissues, the ovary was more susceptible compared to the mammary gland, with consumption by both parents capable of increasing antioxidant enzyme levels due to possible inflammation in late adulthood. The mammary gland altered receptor expression at specific ages but did not affect overall development. Consumption by both parents and exclusively by the father altered the most parameters. According to our analyses, consumption by both parents significantly influences female offspring, followed by exclusively paternal and then maternal consumption.

Keywords: preconception; ethanol; development; mammary gland; breast; ovary; inflammation; offspring; female; reproduction.

Lista de abreviatura

97	
98	
99	ADH: álcool desidrogenase
100	AB: brotos alveolares
101	ALDH: aldeído desidrogenase
102	CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
103	CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal
104	CEA: coeficiente de eficácia alimentar
105	CNA: comprimento nasoanal
106	DAG: distância anogenital
107	EGF: fator de crescimento endotelial
108	ERO: espécie reativa de oxigênio
109	ER- α : receptor de estrógeno alfa
110	FSH: hormônio luteinizante
111	GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina
112	GPCC: coeficiente de ganho de peso por consumo calórico
113	GSH: glutathiona reduzida
114	HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal
115	HHG: hipotálamo-hipófise-gônada
116	IBB: Instituto de Biociência de Botucatu
117	IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
118	IL-6: interleucina 6
119	LH: hormônio luteinizante
120	MDA: malonaldeído
121	NADH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
122	NF-kB: factor nuclear kappa B
123	PR: receptor de progesterona
124	SEMO: sistema de enzimas microssomais oxidativas
125	SOD: superóxido dismutase
126	UCh: <i>Universidad</i> de Chile
127	TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
128	TGF- β 1: fator de crescimento transformador beta 1
129	TED: brotos terminais finais
130	TD: ductos terminais
131	VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

Capítulo 1	5
Introdução Geral.....	5
Justificativa.....	13
Hipóteses	14
Objetivos	14
Material e Métodos.....	14
Capítulo 2	25
Objetivos	25
Resultados	25
Discussão.....	34
Conclusão	39
Capítulo 3	39
Objetivos	39
Resultados	39
Discussão.....	48
Conclusão	52
Conclusões gerais.....	53
Perspectivas futuras.....	54
Referências	55
Apêndice.....	63
Anexo	75

Capítulo 1

Introdução Geral

Aspectos epidemiológicos do consumo de etanol

O etanol é a droga psicoativa mais ingerida mundialmente, sendo o consumo crônico um dos principais problemas de saúde pública e responsável por 5,3% das mortes globais, ou seja, 3 milhões de mortes todos os anos resultam do uso nocivo do álcool (REHM *et al.*, 2009; BALDDIN *et al.*, 2018, GBD, 2018; WHO, 2018). O consumo pesado caracteriza-se pela ingestão de mais de 6 doses em uma ocasião, enquanto, bebedores leves à moderados podem consumir em torno de um a dois copos de bebida por dia (WHO, 2014). O consumo alcoólico, associado a dose e a frequência da ingestão, pode causar direta ou indiretamente mais de 60 tipos de doenças, incluindo a dependência alcoólica e a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer (HHS, 2005; BALDDIN *et al.*, 2018; VARGHESE, 2022). O uso do etanol pode impactar o consumidor de diferentes formas. De acordo com a Incidência de Doenças Mundiais (GBD, 2018), 27,1% das mortes femininas e 18,9% das masculinas foram acometidas pelo câncer atribuído ao uso alcoólico em consumidores com mais de 50 anos. Os parâmetros reprodutivos femininos e masculinos, tanto em modelos experimentais (OREMOS; AKANG, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2018) quanto em humanos (EGGERT *et al.*, 2004; SANSONE *et al.*, 2018; VARGHESE, 2022), também são afetados. As moléculas tóxicas do etanol podem atingir, direta ou indiretamente, as gônadas, conduzir ao estresse oxidativo, prejudicar a integridade do DNA germinativo, bem como interferir no desenvolvimento do embrião (JANA *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2017; GANGISETTY *et al.*, 2022).

Metabolismo do etanol

Os efeitos nocivos e toxicológicos do etanol no organismo humano são consequência de seu metabolismo que, dentre os variados fatores, podem ocasionar hipóxia no fígado, interações entre os metabólitos do etanol e os componentes celulares e aumento de fatores de necrose tumoral e espécies reativas de oxigênio (ERO), conduzindo ao estresse oxidativo (ZAKHARI, 2006). O etanol atravessa as membranas biológicas devido a sua elevada capacidade de difusão. Sua distribuição é proporcional ao conteúdo relativo de água existente nos tecidos e o equilíbrio do etanol no plasma é alcançado rapidamente (CEDERBAUM, 2012). Dessa forma, as mulheres apresentam maior eliminação alcoólica, menor distribuição do etanol devido a maior proporção de

gorduras, mantendo-o mais concentrado no organismo, e alcançam mais rapidamente altas concentrações de etanol plasmáticas (COLE-HARDING; WILSON, 1987; CEDERBAUM, 2012).

Após a ingestão alcoólica, ocorre a metabolização, sendo o fígado responsável por metabolizar aproximadamente 90% do etanol, enquanto 10% é excretado pelos pulmões, rins e suor (CEDERBAUM, 2012). A metabolização inicial ocorre no estômago, com isoformas da enzima álcool desidrogenase (ADH), convertendo etanol à acetaldeído e o fígado executa a maior parte da oxidação devido a extensa disponibilidade de ADH. Três vias estão envolvidas na metabolização: a ADH, o sistema de enzimas microssomais oxidativas (SEMO) e a catalase. A via pela ADH é a principal delas e, quando sua atividade se encontra suprimida, ocorre a metabolização pelo SEMO, ativado pelo consumo crônico de etanol. A enzima catalase é a menos usual, localizada nos peroxissomos (ZAKHARI, 2006). Qualquer uma das vias origina o acetaldeído, substância altamente reativa e tóxica ao organismo, conduzindo a danos teciduais, formações de ERO e alteração nas reações de redução-oxidação das células hepáticas (ZAKHARI, 2006).

Na catalisação do acetaldeído à acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), é necessária a intermediação de carreadores de elétrons, NAD^+ , reduzido à NADH (ZAKHARI, 2006). Com a diminuição na proporção NAD^+/NADH , reações importantes como glicólise, ciclo do ácido cítrico, gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos são inibidas (CEDERBAUM, 2012). O acetato, em excesso, pode aumentar o fluxo sanguíneo no fígado, afetar processos metabólicos e deprimir o sistema nervoso central (ZAKHARI, 2006).

Os efeitos do etanol sobre a reprodução humana

Aproximadamente 15% dos casais que tentam engravidar apresentam sinais de infertilidade, sendo o declínio no volume espermático ao longo dos anos assim como as disfunções sexuais femininas contribuintes para isso (SHARLIP *et al.*, 2002; SENGUPTA; DUTTA; KRAJEWSKA-KULAK, 2016). Sabe-se que os hábitos cotidianos, incluindo a dieta, a prática de exercícios físicos e a exposição ambiental, são moduladores do organismo (ASIMES *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2024). Nessa perspectiva, ressalta-se os prejuízos do uso de etanol e outras drogas à saúde humana, no entanto, seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos necessitam de maiores e constantes investigações (BARAZANI *et al.*, 2014). O etanol pode interferir diretamente no eixo hipotálamo-hipófise-gônada/adrenal (HHG/HHA) e nas gônadas, ter caráter epigenético e diminuir a expectativa de vida (CARTER *et al.*, 2014; MASEMOLA *et al.*, 2015; BALDDIN *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2024).

O consumo crônico feminino pode afetar de diversas maneiras a fertilidade, com ao menos uma desordem reprodutiva relatada em mais da metade das bebedoras frequentes (WILSNACK,

1984). O consumo excessivo associado às desordens ascende a relação da dose em amplificar os efeitos observados. Irregularidade menstrual, infertilidade, abortamento e parto prematuro foram maiores durante a alta ingestão alcoólica, enquanto o atraso no início da menopausa, suscetibilidade aumentada a endometriose e taxas diminuídas de engravidar associaram-se ao consumo independentemente da dose (EGGERT, THEOBALD; ENGFELDT, 2004; TANERI *et al.*, 2016). O consumo alcoólico moderado também foi correlacionado com menor sucesso de inseminação artificial, menores taxas de fecundidade, com resposta dose-dependente no sexo feminino, e redução na taxa de sucesso na fertilização *in vitro* quando ambos os parceiros consumiam etanol (ZAADSTRA *et al.*, 1994; JENSEN *et al.*, 1998; ROSSI *et al.*, 2011).

A ingestão masculina também apresenta prejuízos notáveis à reprodução. A diminuição na concentração espermática, o aumento de espermatozoides morfologicamente defeituosos e as baixas concentrações de testosterona foram reportados pela primeira vez em alcoólatras, em 1985 (KUCHERIA; SAXENA; MOHAN, 1985). Além disso, Pajarinen e Karhunen (1994) encontraram parada parcial ou completa da espermatogênese em mais da metade dos consumidores crônicos. O consumo crônico conduz a desregulações hormonais e altera os parâmetros espermáticos, incluindo o volume, a contagem e a motilidade dos espermatozoides (MUTHUSAMI; CHINNASWAMY, 2005; HANSEN *et al.*, 2012, KONG *et al.*, 2024). Em contraste ao uso crônico, o uso moderado não se associou a qualidade espermática, mas ao aumento de testosterona (JENSEN *et al.*, 2014). Enquanto a alta ingestão de etanol tem efeitos visíveis, doses baixas à moderadas ainda estão em debate (SANSONE *et al.*, 2018).

Os efeitos do etanol sobre a descendência

Além do consumidor, o etanol também é fator de risco para a descendência. A exposição alcoólica uterina é, sem dúvida, precursora de diversas doenças para a prole (KAMINEN-AHOLA *et al.*, 2010; AN; ZHANG, 2013; LIANG *et al.*, 2014), ressaltando seus efeitos diretos sobre o desenvolvimento dos descendentes (POPOVA *et al.*, 2023). A teratogenicidade do etanol em progênie expostas intrauterinamente induziu menor massa corpórea e dos órgãos, modificações no padrão de transcrição dos genes, risco aumentado de mutagênese e aumento na taxa de mortalidade (BADR; BADR, 1975; MURILLO-FUENTES *et al.*, 2001; KAMINEN-AHOLA *et al.*, 2010; AN; ZHANG, 2013; LIANG *et al.*, 2014; POPOVA *et al.*, 2023). Em adição, aumenta a suscetibilidade da prole em consumir o etanol e outras drogas ao longo da vida (PFINDER; LIEBG; FELDMANN, 2014). O baixo consumo gestacional também pode interferir no desenvolvimento dos descendentes com efeitos pronunciados sobre as funções cognitivas, reduzindo a aprendizagem e memória, além de diminuir a expectativa de vida da prole (VAGLENOVA; PETKOV, 1998).

Contudo, estudos têm verificado a ligação entre o consumo alcoólico pré-concepcional paterno e materno e o desenvolvimento das futuras gerações (ZHOU, 2019; LEE *et al.*, 2020; FIORAVANTE *et al.*, 2021). O estilo de vida dos pais, como a dieta, o estado metabólico, a exposição a compostos tóxicos e a genética parental modulam a saúde, o desenvolvimento e a expressão gênica dos filhos (LANE *et al.*, 2014; GUTHERZ *et al.*, 2022). Na concepção, os gametas fornecem o material genético paterno e materno para a formação do embrião, juntamente com informações adicionais que refletem as exposições e experiências anteriores (LANE *et al.*, 2014). Esses processos de programação das células germinativas são capazes de impactar o fenótipo da prole e sua plasticidade de desenvolvimento (BEDY *et al.*, 2019). As alterações na prole podem ocorrer por diversos motivos, incluindo por meio da programação fetal, mecanismo vital para sobrevivência do feto em condições intrauterinas inadequadas (MARCINIAK *et al.*, 2017). Contudo, esse ambiente desfavorável durante o desenvolvimento fetal pode originar doenças crônicas tardias nos filhos (CAROLAN-OLAH *et al.*, 2015). Os mecanismos epigenéticos também são fatores adicionais associados as alterações fenotípicas da progênie (MONTESINOS *et al.*, 2016; ASIMES *et al.*, 2017; 2018), sendo a exposição alcoólica parental capaz de interromper hereditariamente fatores fundamentais da programação epigenética (MAHNKE *et al.*, 2017; YOUNG *et al.*, 2022). Alterações epigenéticas são modificações químicas no DNA ou nas histonas que influenciam a expressão genética e frequentemente ocorrem em resposta a exposições ambientais, sendo esses mecanismos potentes em programar o desenvolvimento no contexto das “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD)” (BIANCO-MIOTTO *et al.*, 2017; GUTHERZ *et al.*, 2022). A programação do desenvolvimento se refere a eventos no início da vida ou durante o desenvolvimento de um órgão específico que podem programar esse indivíduo para um risco aumentado de doença crônica na idade adulta (BARKER *et al.*, 1990).

Nessa perspectiva, ressalta-se que o uso de etanol precoce pode apresentar efeitos a longo prazo, tanto para o consumidor como para a descendência (FIORAVANTE *et al.*, 2022). Alterações em vias apoptóticas e inflamatórias e falhas no funcionamento dos eixos HHA/HHG foram observados em roedores adultos expostos ao etanol durante a puberdade, ressaltando seus prejuízos na vida adulta, mesmo após a abstinência (LAMONT *et al.*, 2020, ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, tanto o alto quanto o baixo consumo de álcool na puberdade pode diminuir a capacidade reprodutiva na vida adulta, com a redução no tamanho da ninhada, observado em roedores (FIORAVANTE *et al.*, 2022).

A nutrição da mulher antes da gravidez também é um dos fatores que afeta a resposta metabólica materna (KIND *et al.*, 2006). Interferências no sistema imunológico e endócrino podem afetar a via de comunicação hormonal materno-fetal, o desenvolvimento de metabólitos fetais e as funções endócrinas da prole (ZHANG *et al.*, 2005). A ingestão alcoólica, além de

interferir no balanço energético e no metabolismo termogênico, pode conduzir ao estado nutricional deficiente (SEBASTIANI *et al.*, 2018). Assim, o suprimento de nutrientes fetais pode ser alterado por meio de vários mecanismos, incluindo a inadequada absorção e distribuição de nutrientes e o aumento da excreção urinária de micronutrientes essenciais (SEBASTIANI *et al.*, 2018). Hiperresponsividade ao estresse, baixo peso corporal da prole (JABBAR *et al.*, 2016) e inadequada função placentária, observada por alterações na morfologia placentária, expressão gênica e programação de restrição de crescimento fetal (GARDBEJER *et al.*, 2014), foram constatados pelo uso alcoólico materno na preconcepção. As experiências paternas também são de grande importância para a descendência (LANE *et al.*, 2014; BEDI *et al.*, 2019). O fluido seminal estimula o trato reprodutivo feminino a produzir fatores de crescimento e citocinas que protegem o embrião (ROBERTSON, 2005). Mudanças na sinalização seminal devido à exposição ambiental são capazes de influenciar o fenótipo dos filhos (BROMFIELD *et al.*, 2014). Redução no peso do saco gestacional e diminuição na eficiência placentária da prole foram observados pelo uso de álcool paterno (CHANG *et al.*, 2017). Assim, o histórico de vida parental define o curso de vida dos filhos (ASIMES *et al.*, 2018). A existência da relação entre a dieta dos pais e as alterações na descendência são cada vez mais conclusivas, sendo que o padrão alimentar dos pais pode exacerbar processos inflamatórios e modificar a expressão gênica e o desenvolvimento mamário na prole feminina, com aumento na suscetibilidade ao câncer (WALKER, 2011; FONTENELES *et al.*, 2016). Em relação ao consumo alcoólico materno e paterno na preconcepção, nosso grupo constatou atraso no desenvolvimento físico e no início da puberdade, baixo peso corpóreo e dos órgãos reprodutivos na prole (FIORAVANTE *et al.*, 2020).

Caracterizado os impactos do etanol no consumidor e no feto exposto, há pouco entendimento da relação entre o uso crônico precoce e seus impactos nos descendentes não expostos (TERASAKI; SCHWARZ, 2016; BEDY *et al.*, 2019). Sabe-se que condições inadequadas de desenvolvimento podem conduzir a programação fetal (ZHANG *et al.*, 2005; HOCHBERG *et al.*, 2011; LILLYCROP; BURDGE, 2014; RANDO; SIMMONS, 2015). Apesar do nosso grupo ter relatado algumas alterações no desenvolvimento e parâmetros reprodutivos provinda de consumo alcoólico parental na adolescência (FIORAVANTE *et al.*, 2021), poucos mecanismos foram desvendados nas fêmeas. Assim, torna-se desafiador avaliar a relação entre o uso de etanol pré-concepcional e seus impactos na prole feminina não exposta (TERASAKI; SCHWARZ, 2016; BEDY *et al.*, 2019), principalmente sobre órgãos relacionados à reprodução, como a mama e o ovário, e suscetíveis ao desenvolvimento de doenças por fatores hormonais, genéticos e epigenéticos (XIE *et al.*, 2021).

Ovário e mama: estrutura e funcionamento

Estudos apoiam que a saúde, o estilo de vida e o estado nutricional nos períodos pré-concepcionais são essenciais para o normal desenvolvimento do feto (BEDI *ET AL.*, 2019; ÖZTÜRK *et al.*, 2021). Assim, tantos os mecanismos epigenéticos, ocasionados pelas exposições ambientais anteriores à concepção, como a programação fetal exercem um impacto significativo na saúde e no desenvolvimento da prole (CHANG *et al.*, 2017; MARCINIAK *et al.*, 2017). Recentemente, nosso grupo relatou alterações reprodutivas e físicas na prole feminina provinda de pais bebedores de etanol durante a puberdade (FIORAVANTE *et al.*, 2021), entretanto, poucos mecanismos foram desvendados. Nessa perspectiva, ressalta-se a importância de aprofundar o conhecimento, principalmente, em órgãos hormônio-dependentes, como o ovário e a glândula mamária.

O ovário se diferencia no período fetal, sendo dividido anatomicamente em regiões cortical, medular e intersticial (ROBKER *et al.*, 2009). Suas principais funções são a gametogênese, para a reprodução, e a produção de hormônios esteroides e outros fatores que atendam às necessidades endócrinas do organismo (ZHAO *et al.*, 2021). A gametogênese, em humanos, inicia-se durante o desenvolvimento embrionário pela migração das células germinativas primordiais à crista gonadal. Essas células formam os folículos primordiais, contendo a reserva ou estoque ovariano (PIPREK, 2016). Durante a 20ª semana gestacional, há em torno de 6 a 7 milhões de folículos primordiais. Após o nascimento, os folículos primordiais decrescem para 1 a 2 milhões, e na puberdade restam apenas 400.000. Após o período púbere, há o constante recrutamento e ativação dos folículos primordiais que se diferenciam até se tornarem folículos antrais. Apenas uma parcela desses folículos se desenvolve em pré-ovulatórios, enquanto a maioria sofre atresia (PIPREK, 2016). O constante recrutamento e seleção de folículos conduz a uma diminuição contínua e progressiva no estoque de folículos primordiais disponíveis. Assim, a menopausa surge após o esgotamento dos folículos ovarianos, destacando a importância da reserva ovariana na duração da vida reprodutiva (FADDY; GOSDEN, 1995).

Na mesma perspectiva, em roedores, os folículos iniciam sua maturação a partir do dia pós-natal (DPN) 15 (PICUT *et al.*, 2015), evoluindo de primordial à folículo ovulatório, liberado a partir do primeiro estro na puberdade (HAO *et al.*, 2019). A idade reprodutiva das fêmeas inicia-se a partir da maturidade sexual e limita-se até aproximadamente o 15º mês. Os estágios de vida da fêmea podem ser divididos em períodos neonatal, infantil, juvenil, pré-puberal, puberal, pós-puberal e adulto (PICUT *et al.*, 2015) e cada período é marcado por interações neuroendócrinas, necessárias para o normal desenvolvimento. Alterações teciduais, como o desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, induzem a processos inflamatórios, sendo a inflamação crônica

contribuinte na progressão de doenças (SAVANT *et al.*, 2018). A figura 1 representa o desenvolvimento folicular ovariano.

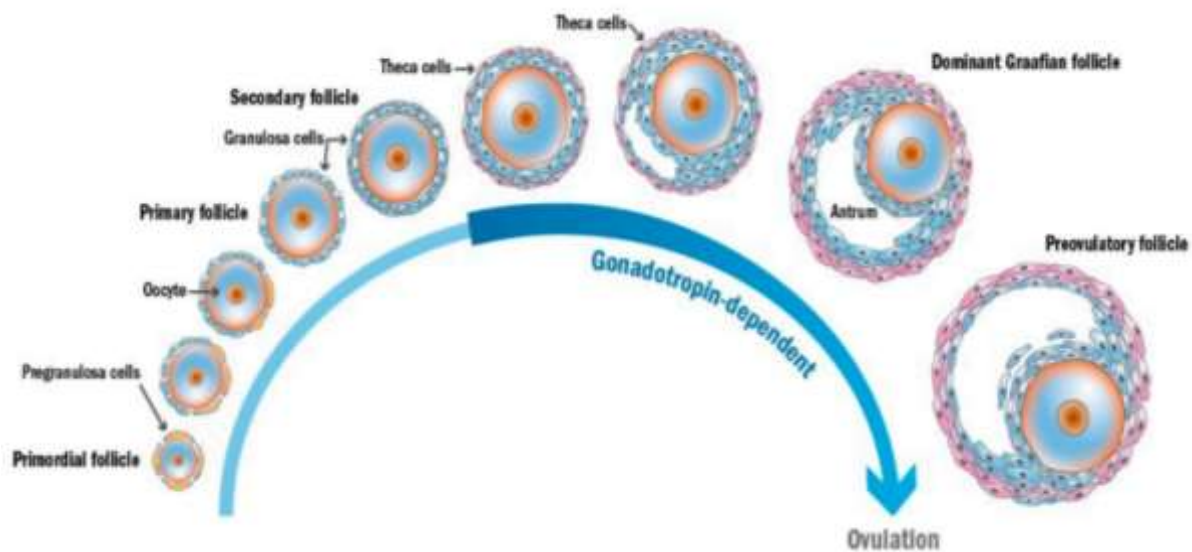


Figura 1. Desenvolvimento folicular. Os folículos podem ser classificados em: folículo primordial: composto pelo oócito primário circundado por uma única camada de células da pré-granulosa em formato achatado; folículo primário: o oócito primário está envolvido por uma única camada de células da granulosa em formato cuboide; folículo secundário: o oócito primário está circundado por mais de uma camada de células da granulosa; folículo terciário (também conhecido como folículo antral): o oócito primário está cercado por várias camadas de células da granulosa e há a formação do antro (espaço constituído de fluido); folículo de Graaf (também conhecido como folículo ovulatório): estágio tardio do folículo antral, no qual o oócito primário é cercado pelo *cumulus oophorus*. Após a oocitação, os corpos lúteos são formados (não mostrado). Fonte: HAO *et al.*, 2019

Em relação a glândula mamária, essa é uma estrutura complexa formada por parênquima e estroma e inicia seu desenvolvimento a partir do 10º dia gestacional em roedores (RUSSO *et al.*, 1982; POLANCO *et al.*, 2010). O botão mamário proeminente, rodeado por mesênquima mamária, se estende ao longo do tecido gorduroso primitivo por volta do 17º dia gestacional (BERRYHILL *et al.*, 2016). O desenvolvimento da glândula é essencialmente inativo do nascimento até a puberdade, à medida que o epitélio continua a crescer isometricamente, ou seja, cresce correspondente ao tamanho geral do animal. Durante a primeira semana de vida pós-natal, a glândula mamária é constituída por uma única glândula primária que se ramifica em 3 a 5 ductos secundários. Esses ductos primários se ramificam em brotos terminais finais (TEBs), sendo estruturas especializadas em forma de clava localizadas na ponta dos ductos. A densidade dos TEBs se torna progressiva, atingindo seu máximo entre 21 e 28 dias pós-natal (DPN) (RUSSO *et al.*, 1982). Este período de desenvolvimento é denominado “estágio ductal”. No início da função ovariana, na puberdade, e durante a maturidade sexual, o alongamento ductal é iniciado e os TEBs ramificam-se ao longo do estroma fibroso até encontrarem os limites da camada de gordura, ponto em que os botões terminais regredem. A diferenciação contínua forma os ductos terminais (TD) ou os brotos alveolares (ABs), iniciando o “estágio de broto alveolar” (STANKO; KISSLING, 2016).

A atividade ovariana marca outro passo na diferenciação mamária e alguns ABs podem se diferenciar em um aglomerado de 10 a 12 alvéolos, formando uma estrutura lobular primitiva (RUSSO *et al.*, 1982). O desenvolvimento lobular se dá como “pequenas explosões” de alvéolos a cada ciclo estral. A formação do lóbulo 1 sinaliza o início do “estágio lobular” que progride até alcançar estruturas lobulares mais complexas (lóbulos do tipo 2 e tipo 3) (CARDIFF *et al.* 2000). Normalmente, o mini remodelamento mamário a cada ciclo menstrual não regride totalmente ao final do ciclo. Assim, o desenvolvimento epitelial continua gradualmente durante a adolescência até a vida adulta (RUSSO; RUSSO, 2004). Os lóbulos mais complexos são alcançados apenas na gestação e a lactação e sinaliza uma glândula mamária totalmente diferenciada, sofrendo involução posteriormente (RUSSO; RUSSO, 2004 ; BERRYHILL *et al.*, 2016).

A diferenciação entre o número de TEBs em relação aos ABs é observada até o DPN 56, com diminuição dos TEBs e aumento dos ABs. Após o DPN 84, ocorre a estabilidade entre TEB, AB e lóbulos, sendo que a mama começa a sofrer involução após o 14º (RUSSO *et al.*, 1982). A figura 2 representa o desenvolvimento da glândula mamária. A figura 2 representa o desenvolvimento mamário.

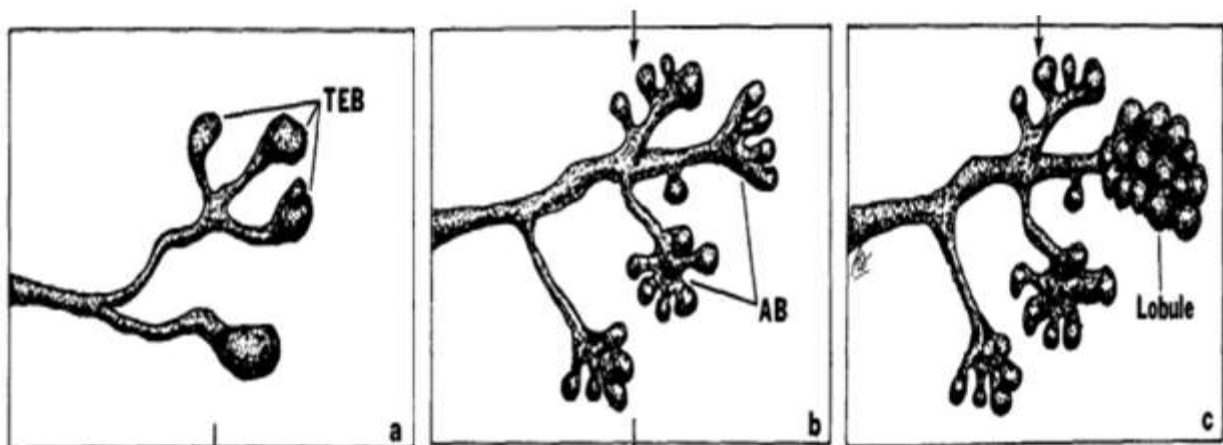


Figura 2. Desenvolvimento mamário. a) Extremidades dos ductos evoluindo em botões terminais (TEBS); b) Na puberdade, os TEBs se diferenciam em brotos alveolares (ABs); c) Durante a gestação, os ABs diferenciam-se em conjuntos de alvéolos formando os lóbulos mais complexos. Fonte: Russo *et al.* 1982.

No rato, encontramos seis pares de glândulas mamárias, sendo uma cervical, duas torácicas, uma abdominal e duas inguinais. Cada coxim adiposo é hospedeiro de um linfonodo que, por ser uma estrutura facilmente identificável, pode ser usado como ponto de referência para analisar a árvore mamária (figura 3). Comumente, a quinta glândula é a mais diferenciada e a primeira glândula torácica é a menos diferenciada, destacando um gradiente de desenvolvimento (MCNALLY; STAIN, 2017).

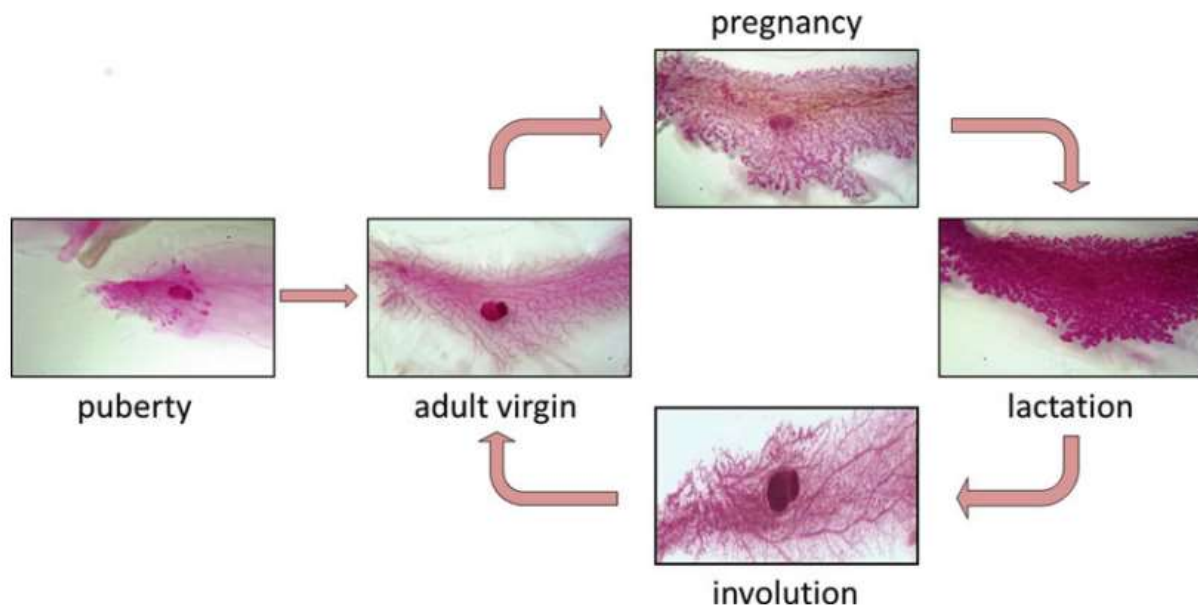


Figura 3. Árvore mamária. Montagens inteiras da glândula mamária de camundongo coradas com Carmin. As figuras evidenciam as alterações no ducto mamário durante a puberdade, adulta virgem, gravidez, lactação e involução. Note a presença dos linfonodos. Fonte: McNally & Stain, 2017.

Modelos experimentais: ratos predispostos geneticamente ao consumo voluntário de etanol (UChB)

Estudos em humanos são limitados por questões éticas, sendo a solução parcial a utilização de modelos experimentais como ratos, camundongos, primatas não humanos, entre outros que permitam a inferência e a extrapolação dos resultados às condições da sociedade. Os ratos Wistar da variedade UCh (Universidad de Chile), reproduzidos no Chile desde a década de 40, são bebedores voluntários de etanol e expuseram o conceito da herdabilidade e da predisposição genética ao consumo alcoólico (MARDONES; SEQUOIA-RIQUELME, 1953). Os ratos UChB ingerem alta quantidade de etanol (MARDONES; SEQUOIARIQUELME, 1983) e são considerados modelo experimental adequado, pois fornecem conhecimento sobre os efeitos do consumo alcoólico voluntário, semelhante ao observado na sociedade (GAPP *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2011, AMORIM *et al.*, 2011). Embora as alterações decorrentes do consumo alcoólico sejam observadas em humanos e em modelos experimentais, os resultados devem ser interpretados com cautela devido a notável resposta dos modelos frente aos insultos oferecidos nos métodos empregados (GABRIELSEN; TANRIKUT, 2015).

Justificativa

A literatura especializada sustenta a conclusão de que a influência paterna e materna sobre os descendentes se inicia antes da concepção, sendo o histórico de vida parental como a dieta, o

estresse e a exposição a compostos tóxicos, como o etanol, decisivo nas alterações fenotípicas, no desenvolvimento fetal e pós-natal e na gênese de doenças na prole (LANE *et al.*, 2014; ASIMES *et al.*, 2018). Nosso grupo relatou que a exposição alcoólica parental precoce prejudicou os parâmetros de desenvolvimento e reprodução da prole feminina e masculina não exposta, porém os mecanismos de ação não foram evidenciados nas fêmeas (FIORAVANTE *et al.*, 2020). Com o crescente consumo alcoólico entre os jovens (MONTESINOS *et al.* 2016), é relevante investigar se o uso de altas quantidade de etanol pós-púbere por mães, pais ou ambos prejudicam o desenvolvimento, induz inflamação e estresse oxidativo e altera o perfil de expressão de proteínas e de genes na mama e no ovário da prole feminina não exposta. Os impactos da exposição alcoólica fetal são estabelecidos em humanos e modelos experimentais (SILVA *et al.*, 1981; CANTACORPS *et al.*, 2017; LAMONT *et al.*, 2020), no entanto, a relação do consumo parental pós-púbere sobre os parâmetros reprodutivos da prole feminina permanecem inconclusivos. Nosso trabalho contribuirá na conscientização das consequências do uso do etanol precoce para as futuras gerações. Verificamos a contribuição de ambos os pais e a individual, materna e paterna, e as alterações na prole feminina, auxiliando, em cunho translacional, para o estabelecimento de métodos e cuidados preventivos.

Hipóteses

O consumo de alta quantidade de etanol parental pós-púbere afeta o desenvolvimento físico da prole, bem como altera os mediadores pró-inflamatórios, o equilíbrio das enzimas antioxidantes, os receptores e os hormônios relacionados a fisiologia do ovário e da mama da prole feminina não exposta, com contribuição dependente da exposição alcoólica materna, paterna ou de ambos.

Objetivos

Geral

Investigamos se o consumo de alta quantidade de etanol pós-púbere parental interfere no desenvolvimento da prole, no perfil inflamatório e hormonal, no balanço oxidativo e nos parâmetros do ovário e da mama. Também verificamos se alterações na prole feminina não exposta são dependentes da contribuição materna, paterna ou de ambos.

Específicos

- Mensurar os parâmetros biométricos da prole feminina ao longo da vida (consumo alimentar, crescimento corpóreo e desenvolvimento físico);
- Verificar o desenvolvimento ovariano e mamário na prole feminina por análises morfológicas e morfométricas;
- Verificar se há alterações ovariana e mamária na prole feminina por análise dos receptores de estradiol, progesterona, fator de crescimento, proliferação e apoptose;
- Avaliar o perfil inflamatório e o estresse oxidativo ovariano e mamário na prole feminina;
- Mensurar os hormônios reprodutivos progesterona e estradiol da prole.

Material e Métodos

Delineamento experimental

Comissão de ética

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA nº 3632210121).

Animais

Rattus norvegicus albinus, da variedade UChB, ratos predispostos geneticamente ao consumo voluntário de alta quantidade de etanol, provenientes do Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP) constituíram os grupos.

Quarenta machos e quarenta fêmeas foram utilizados e mantidos em caixas de polietileno (43×30×15 cm) com fundos sólidos, forradas com substrato de maravalha, sob condições controladas (23 ± 1 °C, umidade 55 ± 5% e luz das 6h às 18h) e nutridos com água filtrada e ração comercial para roedores *ad libitum*. Aos 65 dias de idade, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle (C), alimentados apenas com ração e água; etanol (E), alimentados com ração, água e acesso livre ao etanol por machos e fêmeas; mães expostas ao etanol (ME), alimentados com ração e água, sendo o acesso ao etanol exclusivo das fêmeas, e pais expostos ao etanol (PE), alimentados com ração e água, sendo o acesso ao etanol exclusivo dos machos. As fêmeas do grupo ME, os machos PE e as fêmeas e machos E foram expostos ao etanol por 15 dias consecutivos, portanto, foi fornecido acesso livre a solução de etanol a 10% do DPN 65 - 80, fase correspondente à pós-puberdade (PICUT, *et al.* 2014). O etanol foi retirado após este período e o consumo calculado por: (etanol consumido (ml) / 15 × 100) / peso corporal (g). Apenas animais com ingestão > 2 g / kg / dia foram selecionados para continuar no experimento

(MARDONES; SEGOVIA-RIQUELMI, 1983). Cada grupo (C, E, ME e PE) foi constituído por 10 fêmeas e 10 machos, sendo que o acasalamento ocorreu entre o DPN 100 – 110, maduros sexualmente. Uma fêmea foi alocada na caixa de um macho durante a fase de proestro, mantendo-os juntos durante todo o período noturno. De manhã, foi realizado o lavado vaginal para constatação da prenhez pela presença de espermatozoides. Após constatado a prenhez, os parâmetros maternos foram acompanhados durante o período gestacional e lactacional. No nascimento a prole foi reduzida a oito filhotes por mãe (4 fêmeas / 4 machos) para manter disponibilidade igualitária de nutrientes. A prole feminina foi monitorada do nascimento à idade adulta. Após o desmame no DPN 21, a prole feminina (n = 40 / grupo) dos grupos C, E, ME e PE foi distribuída aleatoriamente para eutanásia nas fases: juvenil (DPN 30), púbere (DPN 50), adulta (DPN 150) e adulta tardia (DPN 300), totalizando dez fêmeas por grupo em cada fase. As fases consistiram em analisar e comparar o desenvolvimento inicial e final do ovário e da mama, sendo que na fase infantil e tardia o ovário e a mama estão em desenvolvimento, na fase púbere o eixo HHG está ativo, com estabelecimento de resposta hormonal, e a partir da fase adulta ocorre a maturidade, mantendo avaliação até o início da senescência reprodutiva para verificar o processo de involução, possíveis alterações e indução de processo inflamatório. A partir da fase púbere, as ratas foram eutanasiadas em estro. A figura 4 esquematiza o delineamento experimental.

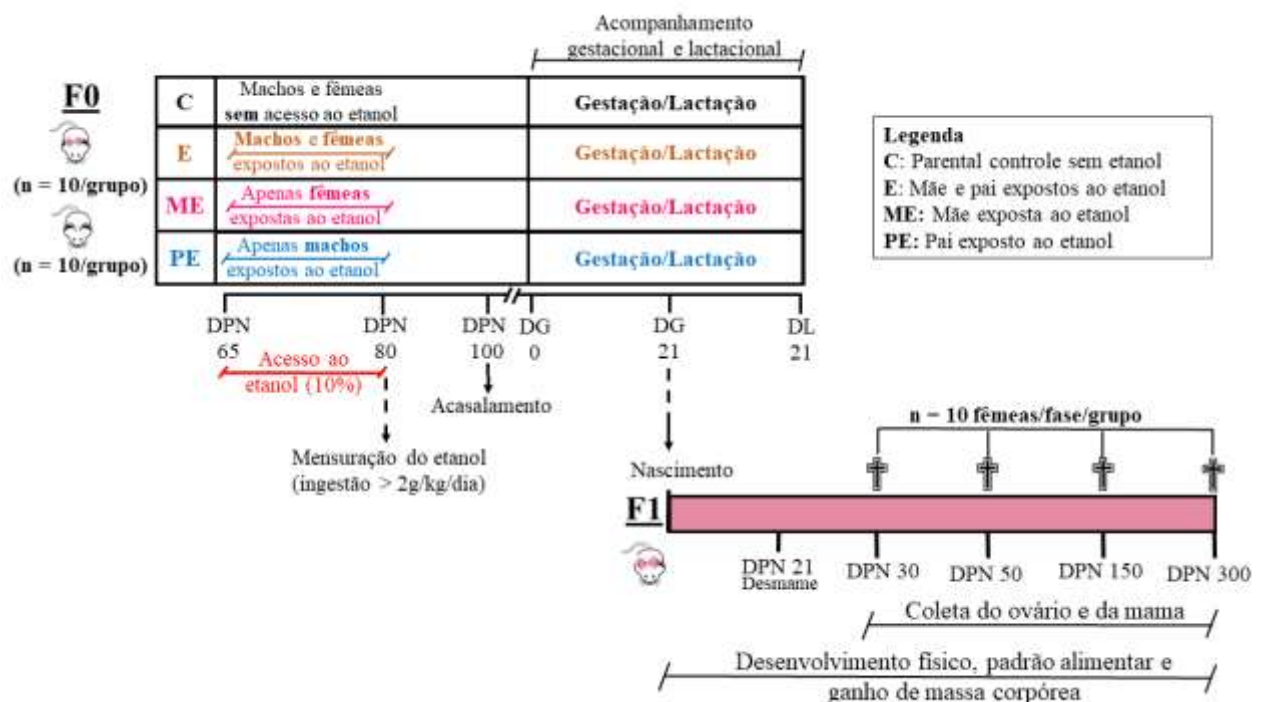


Figura 4. Delineamento experimental. As fêmeas do grupo mães expostas ao etanol (ME), os machos do grupo pais expostos ao etanol (PE) e as fêmeas e machos do grupo etanol (E) tiveram acesso livre ao etanol a 10% do dia pós-natal (DPN) 65 ao 80, sendo abstidos após esse período. Os animais acasalaram no DPN 100 e após constatado a prenhez, dada como dia gestacional (DG) 0, os parâmetros maternos foram acompanhados até o dia lactacional (DL) 21, data referente ao desmame da prole. A prole feminina teve sua dieta e ganho de massa corpórea acompanhada após o DPN 21, sendo coletado o tecido ovariano e mamário e realizado as análises nas fases juvenil (DPN 30), púbere (DPN 50), adulta (DPN 150) e adulta tardia (DPN 300).

Características do desenvolvimento físico

Os parâmetros relacionados ao desenvolvimento físico (descolamento das orelhas, surgimento de pelos, abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos) foram avaliados diariamente, desde o nascimento, na prole feminina.

Peso corpóreo, distância anogenital e comprimento nasoanal

A distância anogenital (DAG), correspondente a distância do ânus ao tubérculo genital, e o comprimento nasoanal (CNA), correspondente a distância do ânus à narina, foram validadas por paquímetro digital no DPN 1, 7, 14 e 21, fases neonatal, infantil e juvenil (PICUT *et al.*, 2015). A DAG relativa foi por: $\left(\frac{DAG}{\sqrt[3]{peso}}\right)$, conforme proposto por GALLAVAN *et al.* (1999) e o CNA relativo por: $\left(\frac{peso}{CNA\ (cm)}\right)$. O peso corpóreo da prole foi medido semanalmente por balança analítica do nascimento ao DPN 203.

Análises da glândula mamária

Coleta da mama

As proles femininas dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) foram eutanasiadas por inalação de dióxido de carbono seguido de decapitação para coleta do sangue cervical nas fases juvenil (DPN 30), púbere (DPN 50), adulta (DPN 150) e adulta tardia (DPN 300), totalizando dez fêmeas por grupo em cada fase. A partir da fase púbere, foi realizado lavado vaginal para constatação do estro.

A quinta glândula mamária abdominal direita e esquerda foi coletada e dissecada. Os lados direitos da mama (n = 10) foram alocados em lâminas de vidro (10 cm por 7,5 cm), secos ao ar por 10 minutos e fixados em solução de formaldeído a 10% em tampão PBS (pH 7.4) por 48 horas para análises histológicas (estrutura e morfometria). Após fixação, as lâminas de mama foram lavadas em água corrente por 5 vezes e alocadas em álcool 70% para posterior utilização (montagem total e cortes histológicos). Os lados esquerdos da mama (n = 10) foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para análises moleculares.

Montagem total da mama

Para analisar o desenvolvimento da glândula mamária, o protocolo de Russo e Russo (2004) foi seguido. As lâminas contendo as mamas direitas (n= 5/ fase / grupo) foram colocadas em recipiente com *Carmine Alum Stain* (C1022, Sigma-Aldrich ®) e mantidas imersas por 2-4 dias. Para preparação do corante, 1 g de carmim e 2,5g de alumínio potássio sulfato (237086,

Sigma-Aldrich ®) foram dissolvidos em 500 ml de água destilada, fervidos por 20 minutos e o volume final ajustado para 500 ml de água. Depois de coradas, as lâminas foram lavadas em bateria crescente de etanol (70%, 90% e etanol absoluto), permanecendo uma hora em cada solução. Após, as lâminas foram colocadas em xilol, permanecendo até o tecido adiposo da glândula mamária apresentar transparência, e, posteriormente, seguiram para montagem com lamínula de resina sintética Permout (Fisher, EUA).

Para a análise morfométrica da glândula mamária, foi obtida uma imagem de cada montagem total seguida para análise pelo software Image J® (versão 1.48, Rasband, W.S., *Image J*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014). A área, o perímetro e os diâmetros longitudinais e laterais foram medidos tomando como referência o linfonodo presente na árvore mamária. O crescimento longitudinal foi definido como a distância do linfonodo até o ducto terminal mais distal e o lateral como a distância entre os dois pontos laterais mais distantes. A fração da área coberta pelo epitélio mamário foi circulada para medição da área e perímetro (MACON *et al.*, 2011). Em relação aos brotos terminais (TEBs), esses foram contabilizados em toda extensão da extremidade mamária pelo fotomicroscópio Olympus, BX 41 – 2, modelo SIS- SC30. Os TEBS são estruturas bulbosas, densamente manchadas, localizadas na extremidade dos ductos mamários, sendo duas vezes mais largo que os ductos (RUSSO; RUSSO, 2004; DAVIS; FENTON, 2013). Alterações significativas nos parâmetros avaliados podem indicar alterações no desenvolvimento. As figuras 1 e 2 representam a montagem total da glândula mamária.

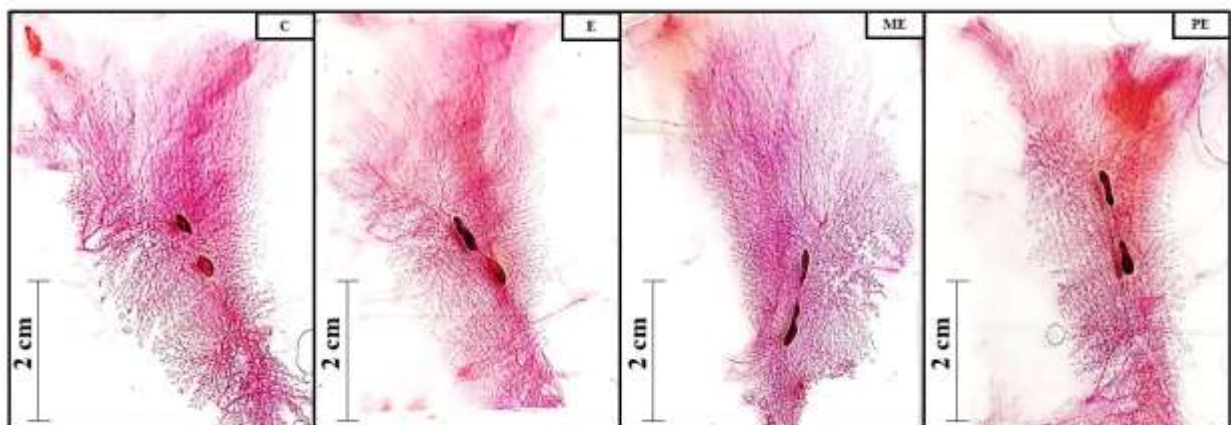


Figura 1. Montagem total da árvore mamária. Lâminas mamárias fotografadas por câmera digital e utilizadas para análises dos parâmetros de crescimento mamário. As figuras representam a idade de 150 dias para os grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE). As medidas foram feitas com base no linfonodo mais distal.

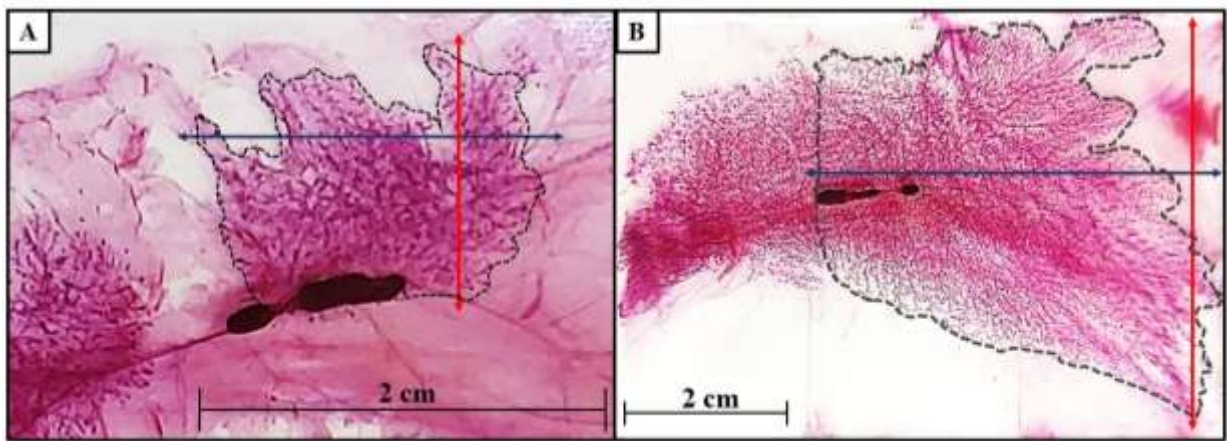


Figura 25. Medição da árvore mamária. As lâminas com montagem total da mama foram avaliadas. A esquerda (A) representa idade de 30 dias e B representa a idade de 300 dias. A região da árvore mamária foi tracejada para destacar a área.

Apoptose mamária

A glândula mamária direita (n=5/ fase/ grupo), previamente alocada em álcool 70%, foi desidratada em concentrações crescente de álcool (etanol e butílico), incluídos em paraplástico e cortados a 4 μ m de espessura para obtenção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (POLANCO *et al.*, 2010). As lâminas foram fotografadas e analisadas pelo fotomicroscópio Olympus, BX 41 – 2, modelo SIS- SC30.

A apoptose foi avaliada pelas lâminas coradas com HE, sendo feita a quantificação de núcleos picnóticos em 15 campos selecionados aleatoriamente ao longo do tecido mamário. A porcentagem do número de núcleos picnóticos em relação a número de núcleos normais foi realizada.

Imunohistoquímica

Após montado as lâminas silanizadas, a atividade proliferativa do tecido mamário (n = 4/ fase/ grupo) foi analisada. Após a desparafinização das lâminas (1 hora de estufa a 60°C), o epítipo foi recuperado em pressão por 45 minutos, realizado o bloqueio da peroxidase por 15 minutos e bloqueio proteico para inespecífico (leite em pó desnatado Molico e PBS) por 40 minutos. O anticorpo primário anti-PCNA (Sigma, diluição 1:100) foi adicionado e incubado *overnight*. Após a lavagem com PBS, foi realizado a incubação do secundário (diluição 1:100) por 1 hora e seguido para o Método Avidina/Biotina (Complexo ABC) com 45 minutos de incubação. A revelação foi feita com DAB e corado com hematoxilina. A avaliação foi feita em 15 campos selecionados aleatoriamente ao longo do tecido mamário, realizando a porcentagem de células marcadas e não marcadas.

Exatracão de proteínas e Western blot

As porções de tecidos mamários esquerdos (n = 5) previamente congelados foram homogeneizados em tampão de extração contendo Triton-x-1%, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM Hepes, pH 7,6, 0,2 mM PMSF e 10 µL/mL de coquetel inibidor de protease. Os extratos das amostras foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford. Os 60 µg correspondentes de proteína foram aplicados ao gel de SDS-poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose, bloqueadas com a albumina bovina sérica (BSA) 3 % diluído em TBS-T por uma 1h30m e incubadas overnight com os anticorpos primários ER-α (06935 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%), PR (SAB4502184 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%), TGF-β1 (sc-130348, Santa Cruz, 1:1000 diluído em BSA 1%) e NF-kB p65 (SAB4502610 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 1h30m com os anticorpos secundários correspondente, anti-IgG peroxidase de coelho, anticorpo produzido em cabras (A0545 - Sigma®, diluição 1:160.000 em molico 1%) ou anti-IgG peroxidase de camundongo, anticorpo produzido em cabras (A9044 - Sigma®, diluição 1:80.000 em BSA 1%). Após uma nova série de lavagens com TBS-T, as bandas foram desenvolvidas com substrato quimioluminescente Amersham ECL *Prime Western Blot Detection Reagent* (RPN2236 - Amersham®) no equipamento G-BOX. A B-actina foi usada como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nos diferentes alvos foi determinada por densitometria pela contagem de pixels utilizando o software Image J® (versão 1.48, Rasband, W.S., *Image J*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

Determinação do estresse oxidativo

A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Reduzida (GSH), Catalase e a da peroxidação lipídica pelo Malonaldeído (MDA) foram determinadas. Porções do tecido mamário previamente congelados (n = 5 / grupo/ fase) foram diluídas com tampão RIPA (para a SOD, GSH e Catalase) ou KCl 1,15% (para o MDA), extraídas com agitador mecânico, centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm a 4 °C e quantificadas por Bradford. Para determinação da SOD, o sobrenadante obtido após centrifugação foi diluído em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) na proporção de 1:20 (p/v). Em 100 µL do homogeneizado, foram adicionados 150 µL de coquetel contendo hipoxantina, xantina oxidase e nitrobluetetrazólio na proporção 1:1:1. Na placa de 96 poços, a absorbância foi lida a cada minuto durante 10 min a 37°C e 560 nm. A integral foi dividida pela quantificação da proteína (Bradford) e os resultados foram expressos

como U/mg da proteína (WINTERBOURN *et al.*, 1975). Para a GSH, 100µL do sobrenadante (diluído em PB 0,1M, pH 7,4, 1:10 p/v) e 100µL de tampão tris/EDTA foram adicionados na placa de 96 poços e lidos a 412 nm. Após a primeira leitura, foram adicionados 20 µL de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e a placa foi lida novamente a 412 nm por 15 min. A concentração foi dividida pela quantificação proteica (Bradford) e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína (Faure & Lafond, 1995). Para a Catalase, o sobrenadante foi diluído em tampão [KH₂PO₄ 25mM (di-hidrogenofosfato de potássio), pH 7,5; EDTA 1mM; 1% BSA] na proporção de 1:250 (p/v). 2 poços da placa contendo catalase foram utilizados como controle positivo. Em seguida, 20 µL do homogeneizado foram colocados em uma placa de 96 poços com 100 µL de tampão de ensaio (KH₂PO₄ 250 mM, pH 7,0), 30 µL de metanol e 20 µL de peróxido de hidrogênio (35,3 mM). A placa foi incubada durante 20 min à temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, 30 µL de hidróxido de potássio (10 mM) e 45 µL de Purpald® foram adicionados e a placa foi incubada por mais 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, 15 µL de periodato de potássio (65,2 mM) foram adicionados a placa incubada por mais 5 min em temperatura ambiente. Ao final, a absorbância foi determinada utilizando espectrofotômetro a 540 nm. A concentração foi dividida pela quantificação proteica (Bradford) e os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Aebi, 1984). Para o MDA, a peroxidação lipídica foi determinada pelo método de OHKAWA *et al.* (1979), medindo-se a reação de substâncias do ácido tiobarbitúrico com amostras plasmáticas. A reação colorimétrica foi feita em tubos de ensaio contendo 400 µL de água destilada, 200 µL de lauril 8,1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400 µL de amostra. As amostras foram incubadas a 95 °C por 1 h em banho-maria e posteriormente 1 ml de cada amostra foi pipetado em microtubo, centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm em 25 °C e pipetado 200 µL do sobrenadante na placa de 96 poços. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm e os resultados expressos em nmols de MDA/g de proteína.

Análises do ovário

Sinais externos da instalação da puberdade

Para verificar os sinais da instalação da puberdade, a prole feminina foi monitorada diariamente a partir do DPN 35. Após a abertura vaginal completa, o fluido vaginal foi aspirado com uma pipeta contendo 10 µl de solução salina (0,9%) introduzida delicadamente no entorno do orifício vaginal. O fluido foi depositado em lâmina e analisado sob microscópio de luz para estabelecer o primeiro estro (BORGES *et al.*, 2017).

Coleta do ovário

As proles femininas dos grupos C, E, ME e PE foram eutanasiadas por inalação de dióxido de carbono seguida de decapitação para coleta do sangue cervical nas fases juvenil (DPN 30), púbere (DPN 50), adulta (DPN 150) e adulta tardia (DPN 300), totalizando dez fêmeas por grupo em cada fase. A partir da fase púbere, foi realizado lavado vaginal para constatação do estro para posterior eutanásia.

O ovário direito (n= 10) foi fixado em solução de formaldeído a 10% em tampão PBS (pH 7.4) para montagem das lâminas e análises histológicas (estrutura e morfometria). Após fixação de 24 horas, os ovários foram lavados em água corrente por 48 horas e alocados em álcool 70% para posterior utilização. O ovário esquerdo (n = 10) foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análises moleculares. O peso absoluto das gorduras visceral, retroperitoneal e ovárica também foram aferidos e o índice de adiposidade verificado pela fórmula: $[(\text{peso das gorduras visceral} + \text{retroperitoneal} + \text{ovárica}) / (\text{peso corpóreo final})] * 100$.

Contagem de folículos ovarianos

Os ovários direitos previamente alocados em álcool 70% foram desidratados em concentrações crescente de álcool (etanol e butílico), incluídos em paraplástico e cortados a 4 µm de espessura para obtenção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram fotografadas e analisadas pelo fotomicroscópio Olympus, BX 41 – 2, modelo SIS- SC30.

Os corpos lúteos, folículos ovarianos e atresícos foram contabilizados por microscopia de luz em lâminas coradas com HE (n = 5 / fase / grupo). Os folículos foram classificados segundo estágio de maturação de acordo com Picut *et al.* (2015), sendo divididos em primordiais, primários, secundários e terciários. Os folículos primordiais e primários foram contabilizados juntos. O número de folículos foi expresso em porcentagem segundo o total observado (BORGES *et al.*, 2017). A contagem dos folículos foi feita em três cortes histológicos diferentes da mesma amostra ovariana e a média realizada.

Imunohistoquímica

Após montado as lâminas silanizadas, a atividade proliferativa dos tecidos ovarianos (n = 5) foi analisada. A proliferação celular foi avaliada por Ki-67, sendo contabilizado os folículos (primordial/primário, secundário e terciário) marcados e não marcados e feito a porcentagem. Após a desparafinização das lâminas (1 hora de estufa a 60 °C), o epítipo foi recuperado em pressão por 45 minutos, realizado o bloqueio da peroxidase por 15 minutos e bloqueio proteico para inespecífico (leite em pó desnatado Molico e PBS) por 40 minutos. O anticorpo primário anti Ki-67 (Novocastra, diluição 1:100) foi adicionado e incubado *overnight*. Após a lavagem com

PBS, foi realizado a incubação do secundário (diluição 1:100) por 1 h e seguido para o Método Avidina/Biotina (Complexo ABC) com 45 minutos de incubação. A revelação foi feita com DAB e corado com hematoxilina.

Extração de proteínas e Western blot

As porções de tecidos ovarianos (n = 5) previamente congelados foram homogeneizados em tampão de extração contendo Triton-x-1%, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM Hepes, pH 7,6, 0,2 mM PMSF e 10 µL/mL de coquetel inibidor de protease. Os extratos das amostras foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford. Os 60 µg correspondentes de proteína foram aplicados ao gel de SDS-poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose, bloqueadas com a albumina bovina sérica (BSA) 3 % diluído em TBS-T por uma 1h30m e incubadas overnight com os anticorpos primários ER- α (06935 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%), PR (SAB4502184 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%), TGF- β 1 (sc -130348 - Santa Cruz, 1:1000 diluído em BSA 1%) e NFkB-p65 (SAB4502610 - Sigma®, 1:1000 diluído em molico 1%). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 1h30m com os anticorpos secundários correspondente, anti-IgG peroxidase de coelho, anticorpo produzido em cabras (A0545 - Sigma®, diluição 1:160.000 em molico 1%) ou anti-IgG peroxidase de camundongo, anticorpo produzido em cabras (A9044 - Sigma®, diluição 1:80.000 em BSA 1%). Após uma nova série de lavagens com TBS-T, as bandas foram desenvolvidas com substrato quimioluminescente *Amersham ECL Prime Western Blot Detection Reagent* (RPN2236 - Amersham®) no equipamento G-BOX. A B-actina foi usada como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nos diferentes alvos foi determinada por densitometria pela contagem de pixels utilizando o software *Image J*® (versão 1.48, Rasband, W.S., *Image J*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

Dosagem das citocinas pró-inflamatórias plasmática

O Kit de ensaio Imunológico Multiplex (Milliplex®, cat# RECYMATAG-65K 4060105) foi utilizado para verificar a concentração plasmática da interleucina 6 (IL-6), do fator de necrose tumoral (TNF- α) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Foram utilizadas amostras plasmáticas previamente congeladas (n = 5 / grupo / fase) e diluídas em *Assay Buffer* (1:2). O experimento foi realizado segundo o protocolo experimental presente no Kit de ensaio Imunológico Multiplex. As repetições foram feitas em unicatas e a fluorescência detectada pela tecnologia xMAP® na plataforma MAGPIX (Luminex®).

Análise Hormonal

A concentração plasmática dos hormônios reprodutivos, estradiol e progesterona, foram dosadas. O plasma cervical foi coletado, armazenado em tubos EDTA e alocados a -4 °C. Os níveis plasmáticos de 17 β -estradiol e progesterona foram determinados pelo Kit de ensaio Multiplex (Milliplex® *Multi-species Hormone Magnetic Bead Panel*, cat# MSHMAG-21K). Foram utilizadas amostras plasmáticas previamente congeladas (n = 5 / grupo / fase) e diluídas em *Assay Buffer* (1:2). O experimento foi realizado segundo o protocolo experimental presente no Kit, as repetições foram feitas em unicatas e a fluorescência detectada pela tecnologia xMAP® na plataforma MAGPIX (Luminex®).

Determinação do estresse oxidativo

A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Reduzida (GSH), Catalase e a da peroxidação lipídica pelo Malonaldeído (MDA) foram determinadas. Porções dos ovários previamente congelados (n = 5 / grupo/ fase) foram diluídas com tampão RIPA (para a SOD, GSH e Catalase) ou KCl 1,15% (para o MDA), extraídas com agitador mecânico, centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm a 4 °C e quantificadas por Bradford. Para determinação da SOD, o sobrenadante obtido após centrifugação foi diluído em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) na proporção de 1:20 (p/v). Em 100 μ L do homogeneizado, foram adicionados 150 μ L de coquetel contendo hipoxantina, xantina oxidase e nitrobluetetrazólio na proporção 1:1:1. Na placa de 96 poços, a absorbância foi lida a cada minuto durante 10 min a 37°C e 560 nm. A integral foi dividida pela quantificação da proteína (Bradford) e os resultados foram expressos como U/mg da proteína (Winterbourn *et al.*, 1975). Para a GSH, 100 μ L do sobrenadante (diluído em PB 0,1M, pH 7,4, 1:10 p/v) e 100 μ L de tampão tris/EDTA foram adicionados na placa de 96 poços e lidos a 412 nm. Após a primeira leitura, foram adicionados 20 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e a placa foi lida novamente a 412 nm por 15 min. A concentração foi dividida pela quantificação proteica (Bradford) e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína (Faure & Lafond, 1995). Para a Catalase, o sobrenadante foi diluído em tampão [KH₂PO₄ 25mM (di-hidrogenofosfato de potássio), pH 7,5; EDTA 1mM; 1% BSA] na proporção de 1:60 (p/v). 2 poços da placa contendo catalase foram utilizados como controle positivo. Em seguida, 20 μ L do homogeneizado foram colocados em uma placa de 96 poços com 100 μ L de tampão de ensaio (KH₂PO₄ 250 mM, pH 7,0), 30 μ L de metanol e 20 μ L de peróxido de hidrogênio (35,3 mM). A placa foi incubada durante 20 min à temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, 30 μ L de hidróxido de potássio (10 mM) e 45 μ L de Purpald® foram adicionados e a placa foi incubada por mais 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, 15 μ L de periodato de potássio (65,2 mM)

foram adicionados a placa incubada por mais 5 min em temperatura ambiente. Ao final, a absorbância foi determinada utilizando espectrofotômetro a 540 nm. A concentração foi dividida pela quantificação proteica (Bradford) e os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Aebi, 1984). Para o MDA, a peroxidação lipídica foi determinada pelo método de OHKAWA *et al.* (1979), medindo-se a reação de substâncias do ácido tiobarbitúrico com amostras plasmáticas. A reação colorimétrica foi feita em tubos de ensaio contendo 400 µL de água destilada, 200 µL de lauril 8.1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400µL de amostra. As amostras foram incubadas a 95°C por 1 hora em banho-maria e posteriormente 1 Ml de cada amostra foi pipetado em microtubo, centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm em 25°C e pipetado 200 µL do sobrenadante na placa de 96 poços. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm e os resultados expressos em nmols de MDA/g de proteína.

Análises Estatísticas

Os dados foram analisados pelo *GraphPad Prism* (versão 8, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para verificar e retirar os outliers e depois ao teste de normalidade e variabilidade Shapiro-Wilk. As análises foram feitas por ANOVA de uma via com o pós-teste de comparação múltipla de Tukey, para paramétricos, e Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn, para os não-paramétricos. ANOVA de duas vias com o pós-teste de comparação múltipla de Dunnet foi empregada para dados temporais (tempo, tratamento e interação). Os resultados foram expressos em média $\pm$ D.P. e apresentados em figuras e tabelas, com $p < 0,05\%$. Todos os dados foram comparados em relação ao grupo Controle.

Os resultados foram divididos em dois capítulos, sendo o primeiro relacionada ao uso de etanol parental pós-púbere e os efeitos sobre o desenvolvimento físico e na mama da prole enquanto o segundo relatou sobre os efeitos no ovário.

Capítulo 2

Objetivos

Investigamos se o consumo de alta quantidade de etanol pós-púbere parental interfere no desenvolvimento físico, nos biomarcadores oxidativos e nos parâmetros da mama da prole feminina não exposta em diferentes idades. Também verificamos a contribuição materna, paterna ou de ambos os pais nos efeitos observados.

Resultados

O consumo de etanol por ambos os pais atrasou as características do desenvolvimento físico

Conforme mostra a tabela 1, a erupção dos dentes incisivos e a abertura dos olhos atrasou na prole E.

Tabela 1. Parâmetros de desenvolvimento físico na prole dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) (n = 30 / grupo).

Parâmetros (dias) / grupos	C	E	ME	PE
Descolamento das orelhas	2,97 ± 0,05	3,10 ± 0,48	3,11 ± 0,42	2,97 ± 0,05
Surgimento de pelos	6,01 ± 0,03	6,20 ± 0,4	6,10 ± 0,47	6,33 ± 0,47
Erupção dos dentes incisivos	11,41 ± 0,51	12,03 ± 0,45 ^a	11,27 ± 0,46	11,32 ± 0,70
Abertura dos olhos	13,75 ± 0,56	14,64 ± 0,38 ^a	13,94 ± 0,55	13,98 ± 0,53

Valores expressos como média ± D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. p < 0,05 por One-way ANOVA com pós-teste de *Dunnet*.

O consumo de etanol parental altera o comprimento e a distância a anogenital

Em relação ao DAG, verificamos diminuição em ME e aumento em E, ambos no DPN 21 (figura 1A). Embora observemos menor CNA absoluto (figura 1B) no DPN 7 e 14, em todos os

grupos, e no DPN 21, em E, o CNA relativo se manteve menor apenas em E no DPN 7 (Figura 1C).

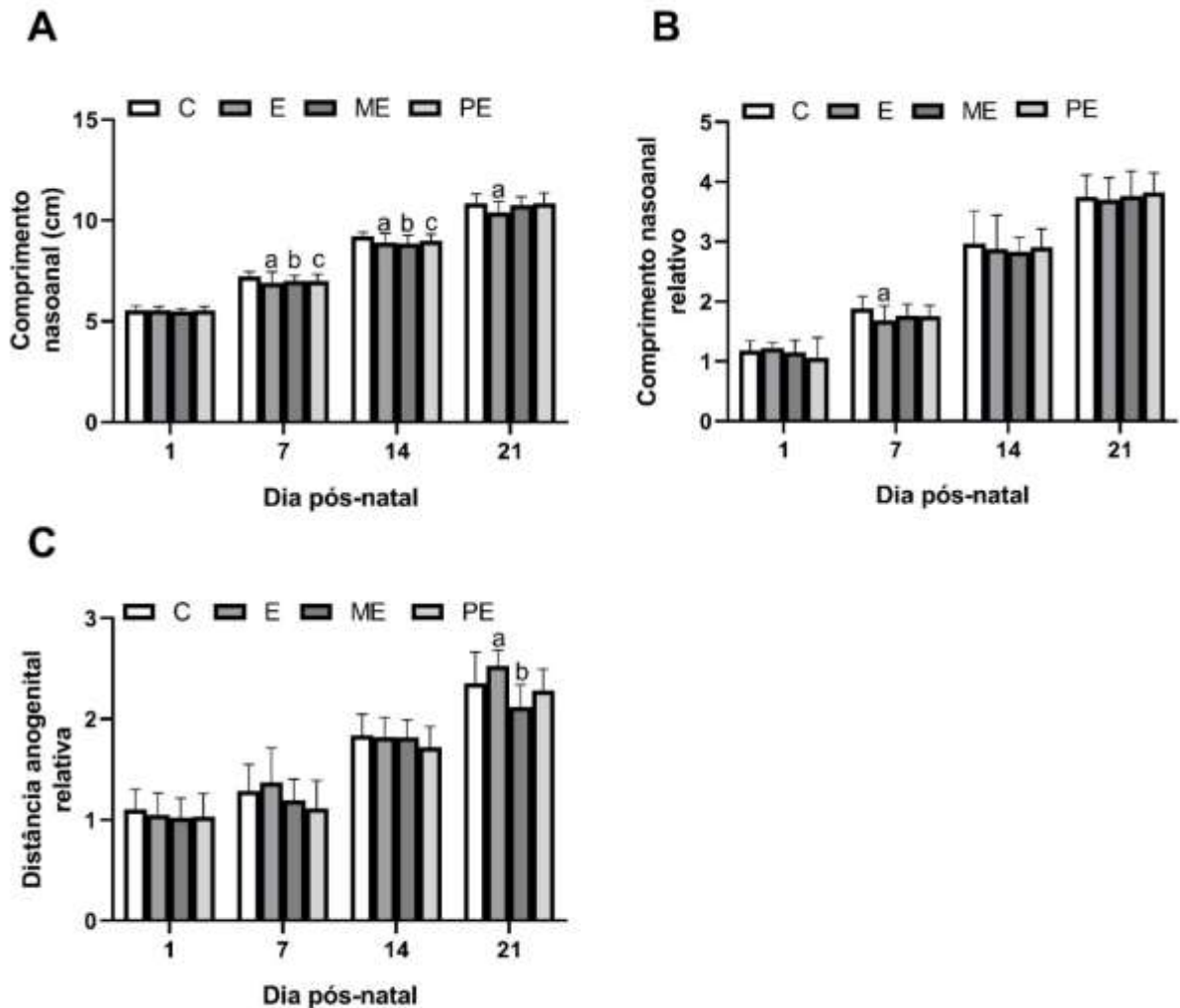


Figura 1. Parâmetros de desenvolvimento da prole. O comprimento nasoanal absoluto (A), o comprimento nasoanal relativo (B) e a distância anogenital relativa (C), foram calculados na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) durante o pré-desmame. $n = 20 - 25$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por *two-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnett*. A: PInteração 0,0001, PTempo <0,0001, PGrupos <0,0001; B: PInteração 0,0014, PTempo <0,0001, PGrupos <0,0001; C: A: PInteração 0,0014, PTempo 0,4794, PGrupos 0,5001.

O consumo de etanol parental interfere no peso corpóreo da prole e no consumo alimentar

Quanto ao peso corpóreo, observamos menor peso no DPN 7 e 14, em todos os grupos tratados, e, entre os DPN 168 – 182 o grupo PE apresentou maior peso, contudo, foi normalizado posteriormente (Figura 2). Quanto ao consumo de ração e água, observamos picos de maior e menor ingestão ao longo da vida, em todos os grupos (Figura 3).

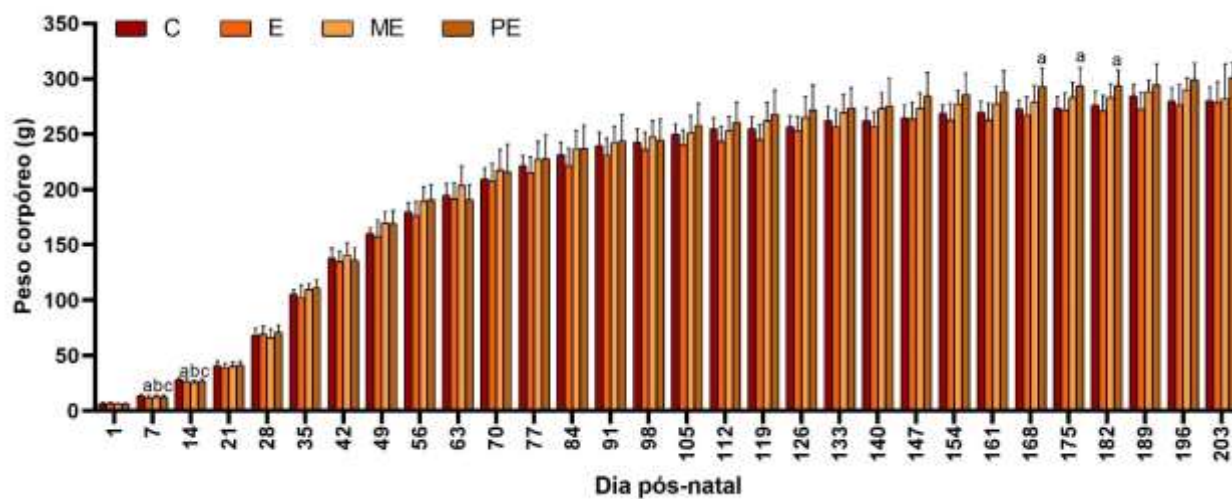
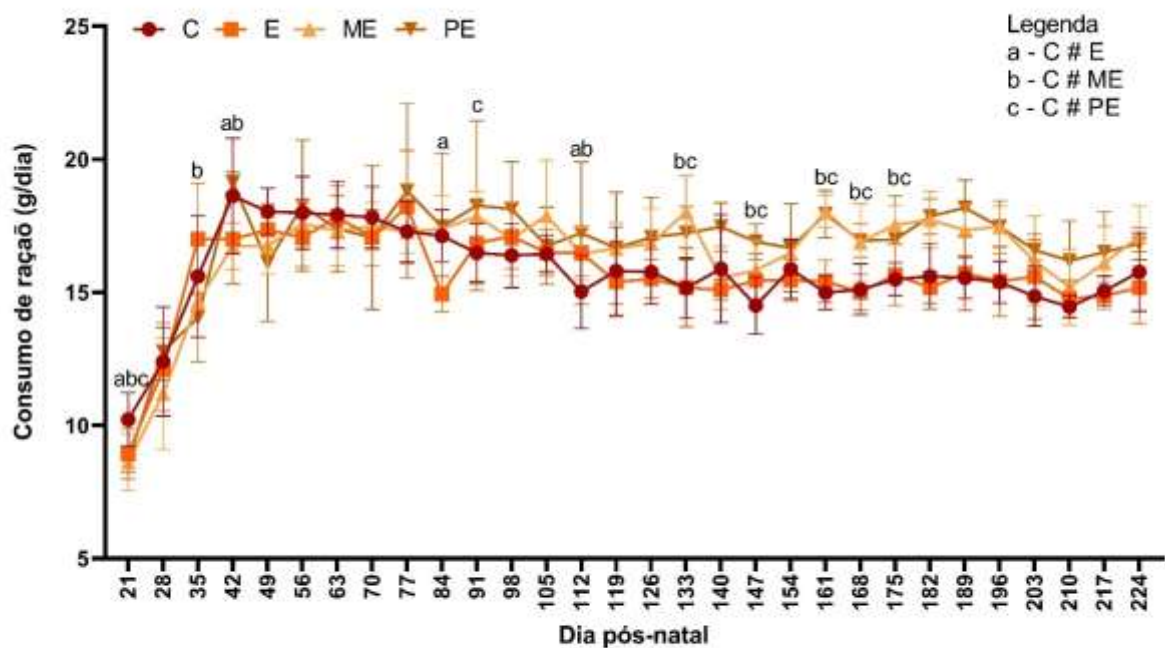


Figura 2. Peso corpóreo. O peso corpóreo foi medido semanalmente na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) do nascimento até o dia pós-natal 203. $n = 10$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por *two-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnet*. $P_{\text{Interação}} < 0,0001$, $P_{\text{Tempo}} < 0,0001$, $P_{\text{Grupos}} < 0,0001$.

A



B

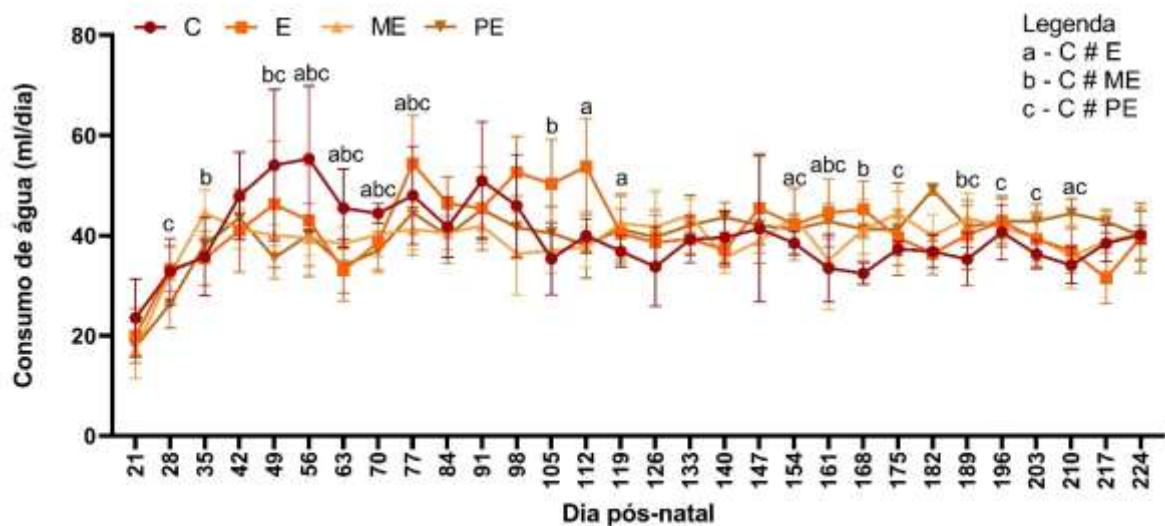


Figura 3. Consumo alimentar. Ingestão de ração (A) e água (B) medidos semanalmente na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) do nascimento até o dia pós-natal 224. $n = 10$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. A: $P_{Interação} < 0,0001$, $P_{Tempo} < 0,0001$, $P_{Grupos} < 0,0001$. B: $P_{Interação} < 0,0001$, $P_{Tempo} < 0,0001$, $P_{Grupos} < 0,0001$.

O consumo de etanol paterno ou por ambos os pais altera os parâmetros de crescimento mamário e a contagem de brotos terminais, mas não afeta a taxa apoptótica e proliferativa

Conforme a figura 4, o perímetro da árvore mamária foi menor em PE e E, no DPN 30 e 150, respectivamente, e houve menor contagem de brotos terminais em PE no DPN30.

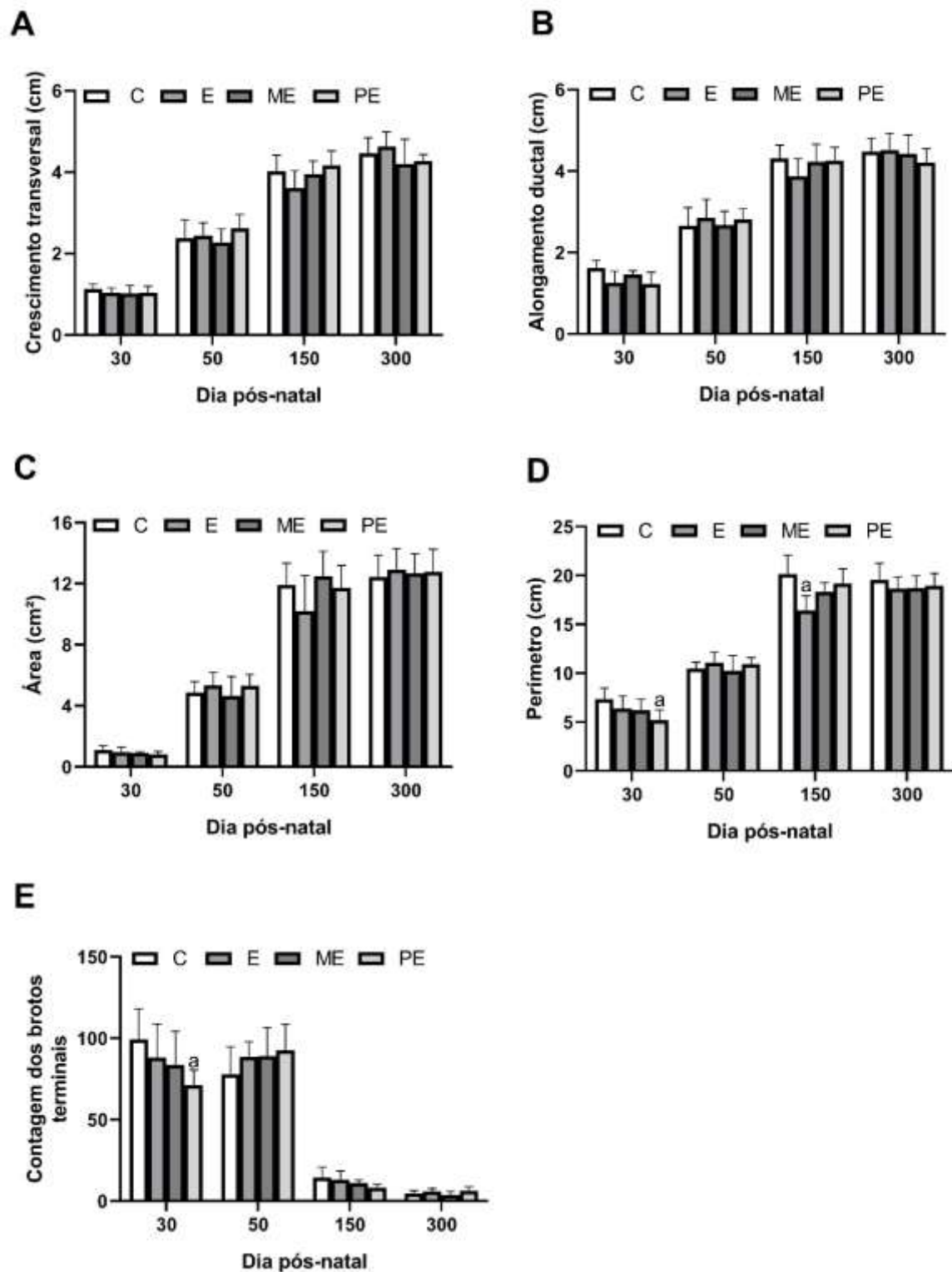


Figura 4. Parâmetros da árvore mamária. O crescimento transversal (A), o alongamento ductal (B), a área (C), o perímetro (D) e o número de brotos terminais mamário (E) foram realizados em lâminas com montagem total da árvore mamária na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE). $n = 5$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. A: PInteração 0,3003, PTempo $<0,0001$, PGrupos 0,1985; B: PInteração 0,2269, PTempo 0,4406, PGrupos $<0,0001$; C: PInteração 0,0858, PTempo $<0,0001$, PGrupos 0,9931; D: PInteração 0,0124, PTempo $<0,0001$, PGrupos 0,0173; E: PInteração 0,0306, PTempo $<0,0001$, PGrupos 0,5066.

calcular a área e o perímetro da árvore mamária. O crescimento transversal (seta em vermelho) e alongamento do ducto (seta em azul) também foram medidos.

A porcentagem de núcleos picnóticos (figura 5) e da proliferação não foi alterada em nenhuma idade analisada (Figura 6).

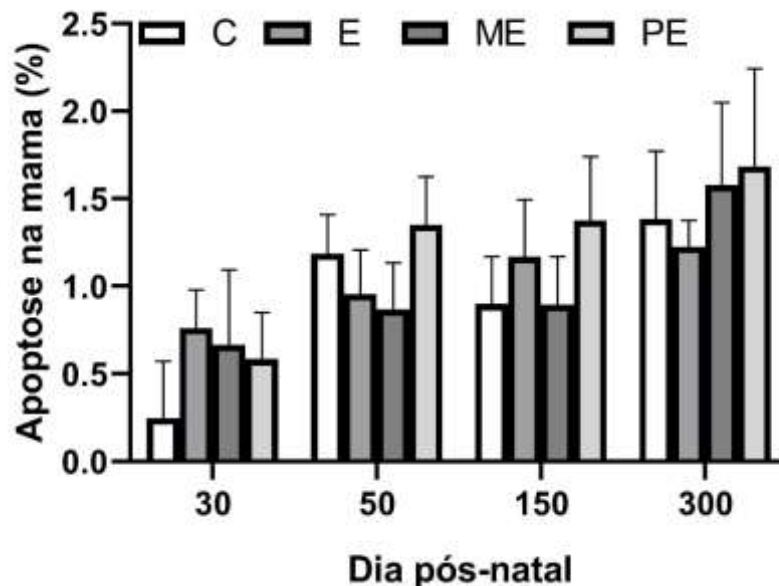


Figura 5. Porcentagem de apoptose na glândula mamária. A contagem de núcleos picnóticos foi realizada em lâminas coradas com HE na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE). $n = 5$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. PInteração 0,1485, PTempo 0,0002, PGrupos 0,1485.

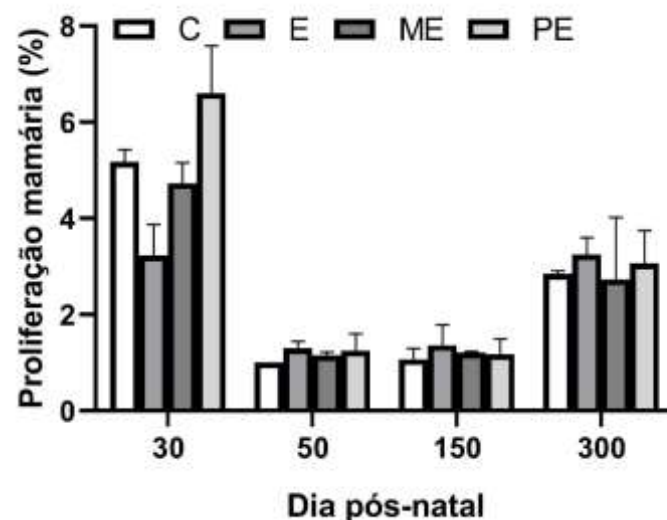


Figura 6. Porcentagem de proliferação na glândula mamária. A contagem foi feita pela marcação por PCNA na prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE). $n = 4$ / grupo / fase. Valores

expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por *two-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnet*. PInteração 0,0085, PTempo $< 0,0001$, PGrupos 0,0064.

O consumo de etanol parental altera a expressão de ER- α , PR e do TGF- $\beta 1$, mas não interfere na atividade das enzimas antioxidantes

A expressão de receptores relacionado ao desenvolvimento da mama foram alterados em todos os grupos, em diferentes idades (Figuras 7 e 8). Houve aumento na expressão ER- α em PE, no DPN 300, da PR em ME, no DPN 150 e do TGF- $\beta 1$ em E, no DPN 30. Não observamos diferenças em relação ao estresse oxidativo (Figura 9).

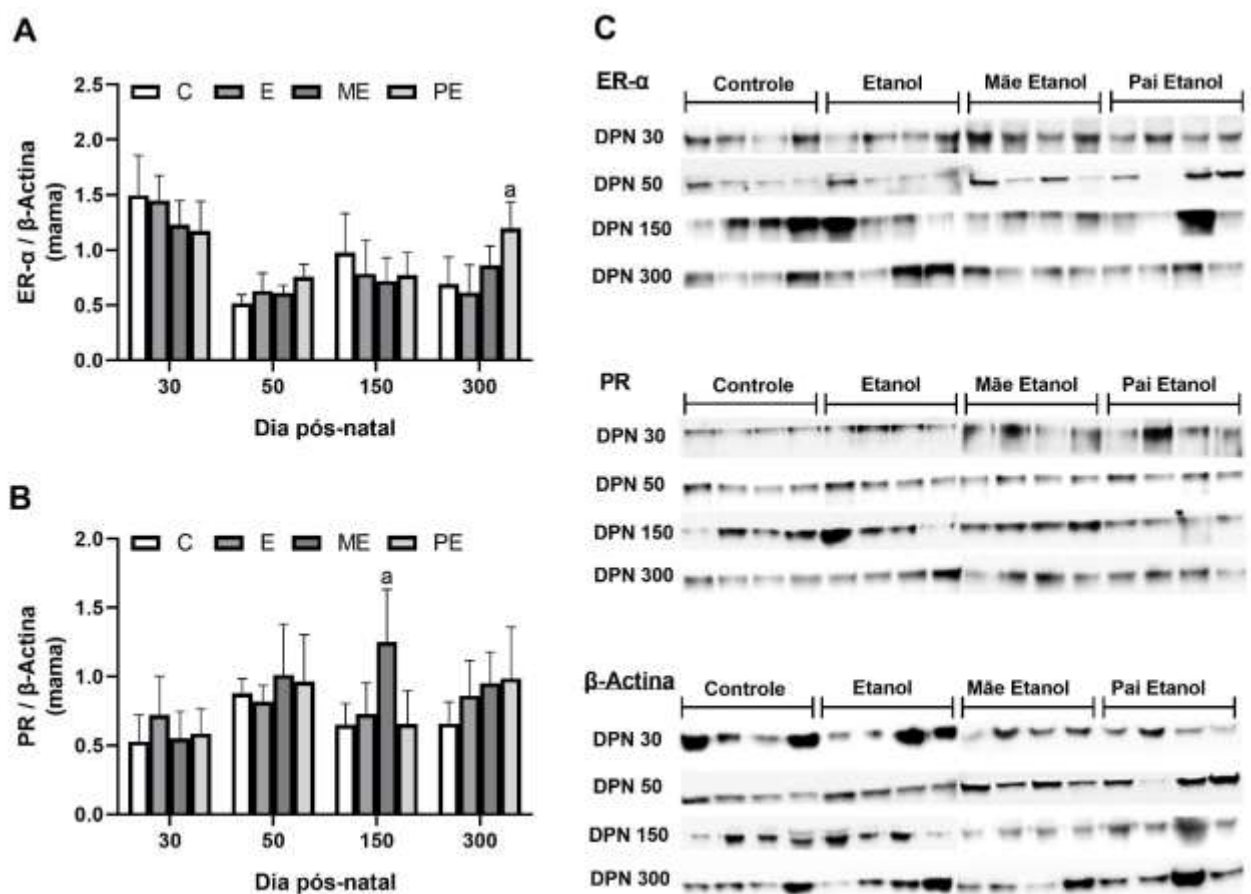


Figura 7. Western Blotting. A expressão de receptores de estrógeno alfa (A) e progesterona (B) foram avaliados na mama da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 4$ / grupo / idade. As marcações estão representadas em C, sendo a β -actina utilizada como controle endógeno. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnet*. Figuras A: PInteração 0,0096, PTempo 0,0269, PGrupos 0,1432; B: PInteração 0,3876, PTime $< 0,0001$, PGrupos 0,0301.

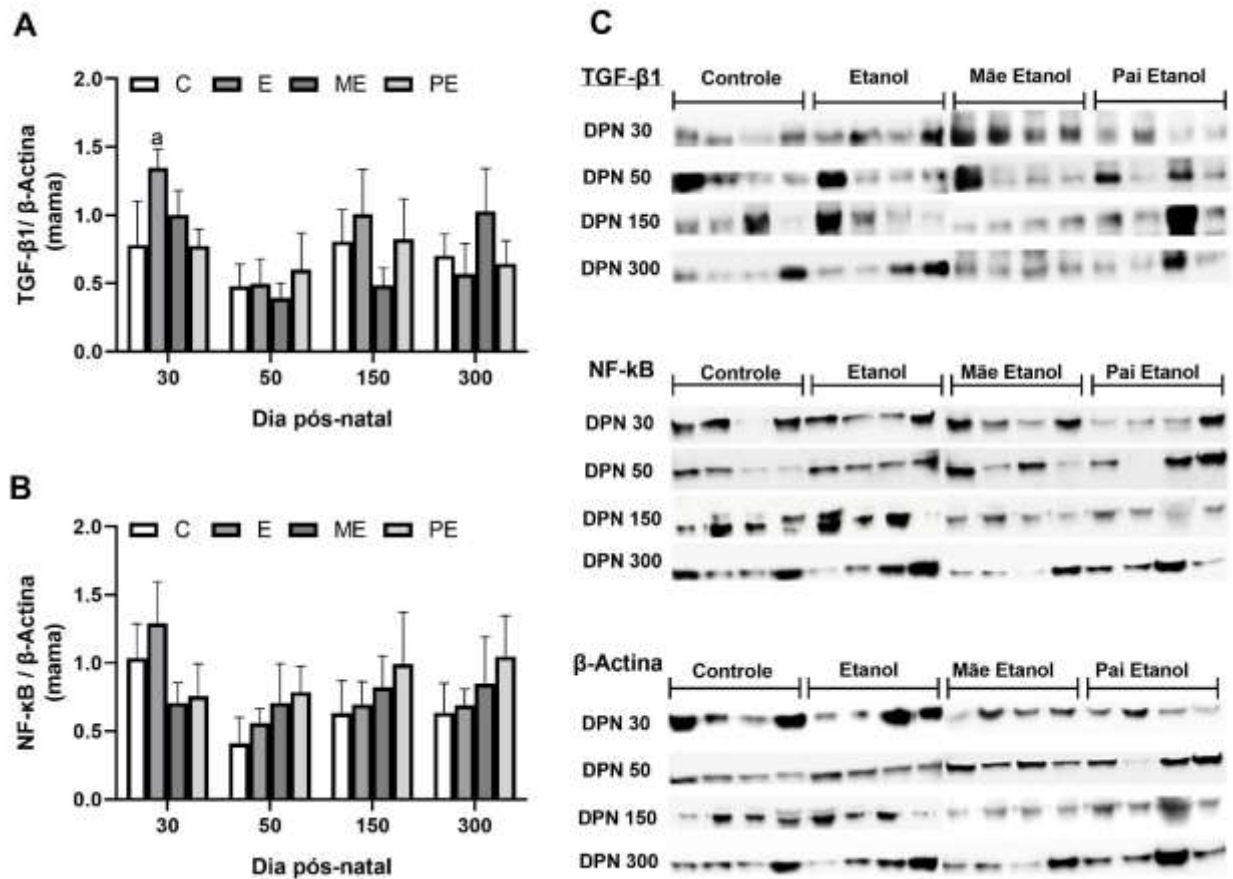


Figura 8. Western Blotting. A expressão de receptores de fator de crescimento transformador beta 1 (A) e do fator nuclear kB (B) foram avaliados na mama da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 4$ / grupo / idade. As marcações estão representadas em C, sendo aa beta-actina utilizada como controle endógeno. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. Figuras A: PInteração 0,0062, PTime $<0,0001$, PGrupos 0,3715; B: PInteração 0,0040, PTempo 0,0051, PGrupos 0,0353.

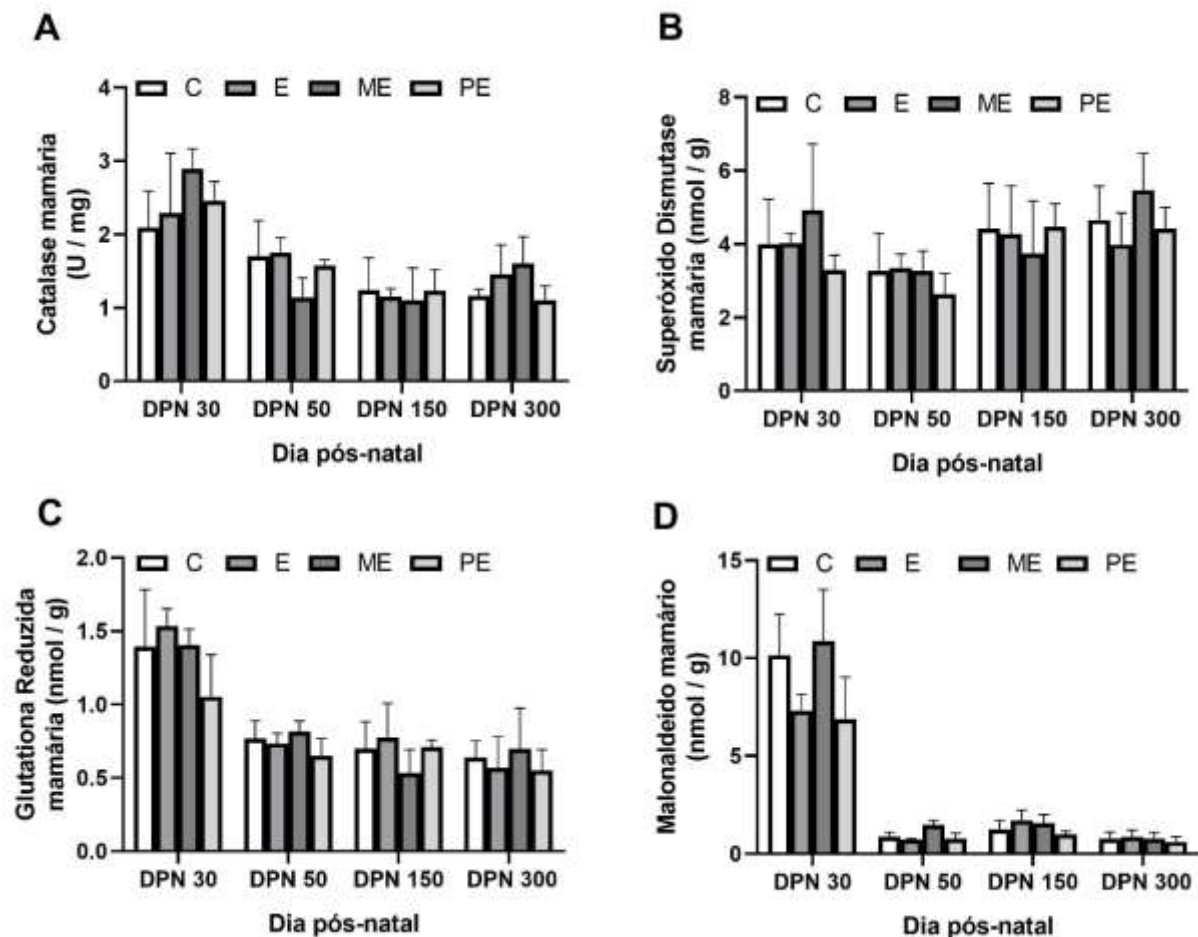


Figura 9. Estresse oxidativo. A atividade da Catalase (A), Superóxido Dismutase (B), Glutathiona Reduzida (C) e do Malonaldeído (D) foram verificadas na mama da prole feminina Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 5$ / grupo / idade. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnet*. Figuras A: PInteração 0,0756, PTempo 0,40017, PGrupos 0,4072; B: PInteração 0,4133, PTempo 0,3057, PGrupos 0,0007; C: PInteração 0,0146, PTempo $<0,0001$, PGrupos 0,8337; D: PInteração 0,0012, PTempo $<0,0001$, PGrupos $<0,0093$.

Discussão

Estabelecidos os prejuízos do consumo alcoólico gestacional, a relação do consumo alcoólico parental pré-concepcional sobre o desenvolvimento da prole e suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças tardias necessitam de atenção. Nós demonstramos que o consumo de etanol parental, restrito ao período pós-púbere, afeta os parâmetros de desenvolvimento inicial da prole, e, embora observado a contribuição individual, materna ou paterna, o consumo por ambos os pais implica fortemente sobre os marcos do desenvolvimento físico. Em relação a glândula mamária, tecido hormônio-dependente e suscetível às mudanças, as principais observações foram relacionadas a expressão de receptores envolvidos na sua regulação e nos parâmetros de crescimento. Aparentemente, o consumo de etanol exclusivamente paterno impacta a glândula mamária mais significativamente, ressaltando à importância do cuidado paterno na concepção (CHANG *et al.*, 2017).

Nós observamos menor peso corpóreo nas proles etanol (E), mãe etanol (ME) e pai etanol (PE) nos dias pós-natal (DPN) 7 e 14, correspondente a idade infantil em ratos, sendo estabilizado após o desmame. O baixo peso corporal ao nascer pode indicar um ambiente fetal adverso (RANDO; SIMMONS 2015) e estar relacionado à programação fetal (HANSON; GLUCKMAN 2008). O período gestacional é crucial para o desenvolvimento fetal, sendo a saúde e nutrição materna essencial para o crescimento normal da prole. O consumo de etanol materno pré-concepcional pode alterar a homeostase da glicose e aumentar a resposta inflamatória, comprometendo a interface materno-fetal como o atraso no crescimento (LEE *et al.*, 2020). Além disso, o uso de álcool na adolescência pode levar a efeitos de longo prazo na idade adulta (PRZYBYCIEN-SZYMANSKA *et al.*, 2011), como o comprometimento do sistema endócrino materno (ZHANG *et al.*, 2005). Nessa perspectiva, estudos do nosso laboratório observaram menor ingestão de ração materna e ganho de peso corpóreo gestacional em mães expostas ao etanol na pós-puberdade (FIORAVANTE *et al.*, 2022). Assim, sugerimos distúrbios metabólicos maternos com redução da qualidade nutritiva do leite à prole durante o período lactacional.

Associado ao peso corpóreo, verificamos alteração na distância anogenital e no comprimento nasoanal absoluto e relativo. Esses parâmetros relacionam-se o com desenvolvimento fetal e são usados como indicador da interface mãe-feto. Lunde e colaboradores (2007) ressaltam a relação entre o tamanho ao nascer e o estado nutricional e endócrino materno, podendo alterar o metabolismo do feto e a predisposição ao desenvolvimento de doenças na idade adulta. Os fatores genéticos, materno e fetais, também podem explicar as variações no peso e no comprimento dos filhos (LUNDE *et al.*, 2007). Embora a maior parte das investigações foquem na mãe, também verificamos menor peso corpóreo e comprimento nasoanal absoluto pelo uso de etanol exclusivamente paterno. Assim, ressalta-se que as experiências paternas são de grande importância para a prole (LANE *et al.*, 2014; BEDI *et al.*, 2019). O consumo de etanol pós-púbere aumenta a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente anormais na idade adulta, podendo impactar a prole (FIORAVANTE *et al.*, 2022) e levar a restrição do seu crescimento (CHANG *et al.*, 2017). Os metabólitos do etanol são capazes de alterar a expressão gênica por meio de assinaturas epigenéticas paternas, reprogramando o epigenoma espermático e alterando o fenótipo da próxima geração (ZAKHARI, 2013; SHARMA, 2017; KUSUYAMA *et al.*, 2020). Alterações moleculares espermáticas, induzidas pelo estilo de vida, podem levar a incorreta alocação das células embrionárias, nortear o fornecimento dos recursos maternos, reduzir o peso do saco gestacional e eficiência placentária, visto que o desenvolvimento placentário é impulsionado, principalmente, pelo genoma paterno e epigenoma (BARTON *et al.*, 1984; RANDO & SIMMONS, 2015; CHANG *et al.*, 2017; KLAstrup *et al.*, 2018; BODDEN *ET AL.*, 2019; CRUZ *et al.* 2020).

Em relação a DAG, essa é um biomarcador que reflete as condições endócrinas e hormonais no ambiente intrauterino (XIA *et al.*, 2018) correlacionada ao eixo endócrino da prole (FISCHER 2020). Seu crescimento perineal é dependente de di-hidrotestosterona, sendo sugerido uma possível plasticidade ao longo da vida (WAINSTOCK *et al.*, 2017). Estudos demonstram que a exposição intrauterina aos andrógenos resulta em aumento da DAG, enquanto a exposição ao estrogênio reduz (SWAN *et al.*, 2015). Observamos menor DAG em ME e maior em E. Em mulheres em idade reprodutiva, a menor DAG tem sido associada à suscetibilidade em desenvolver endometriose (MENDIOLA *et al.* 2016; SÁNCHEZ-FERRER *et al.* 2019; CRESTANI *et al.* 2020). Em contrapartida, seu aumento é correlacionado com a desfeminização, anovulação e aumento de folículos ovulatórios (WOLF, *et al.*, 2002; MENDIOLA *et al.*, 2012). Assim, sugerimos desequilíbrio na sinalização hormonal materna-fetal ocasionado pelo consumo alcoólico pós-púbere (SARKOLA *et al.* 2000; BALDDIN 2018), uma vez que a desequilíbrio nos níveis dos esteroides pode ser mantida mesmo após a abstinência alcoólica (FORQUER *et al.*, 2011), afetando o ambiente fetal. Como a DAG foi alterada tanto pelo consumo de ambos os pais como exclusivamente materno, hipotetizamos maior influência das mães sobre esse parâmetro, sendo interessante a dosagem hormonal materna para corroborar.

Finalizando os parâmetros de desenvolvimento físico, apenas o consumo do etanol materno e paterno foi capaz de atrasar a abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos na prole. Durante o desenvolvimento embrionário, alguns fatores são essenciais para a diferenciação, desenvolvimento e regulação da atividade de tecidos epiteliais (CALAMANDREI & ALLEVA 1998; SMART, *et al.* 1989). O fator de crescimento semelhante à insulina é importante para o desenvolvimento fetal e pós-natal e sua deficiência implica nas vias de sinalização e crescimento normal do corpo (KANAKA-GANTENBEIN, *et al.* 2003). Além disso, citocinas e fatores de crescimento epidérmico e transformador também atuam nesse processo regulatório (CALAMANDREI & ALLEVA 1998; SMART, *et al.* 1989; SURI *et al.*, 2004). O atraso na erupção dos dentes pode ser associado a deficiência nutricional bem como a distúrbios endócrinos, metabólicos ou genéticos (SURI *et al.*, 2004). Há também relação com o peso ao nascer (SEOW, 1996), podendo atribuir, parcialmente, o menor peso corpóreo e comprimento ao atraso no desenvolvimento físico. O cuidado materno também pode impactar nesses parâmetros. Bart *et al.* 2005 verificaram atraso na abertura dos olhos e aumentada resposta ao estresse na idade adulta na prole privada do cuidado materno, sendo já constatado inadequado cuidado pela exposição materna ao etanol (AMORIM *et al.*, 2011). Em conjunto, a baixa expressão de fatores essenciais para o desenvolvimento físico, o cuidado materno, além de possível programação endócrina e metabólica na prole acentuada pela ingestão de etanol parental, podem ter sido contribuintes para os efeitos observados.

Curiosamente, a hipótese da programação metabólica induzida pelo consumo pré-concepcional é acentuada pelo consumo de ração e água da prole. Após o desmame até período pós-púbere, observamos picos de menor ingestão de ração e água entre os grupos, contudo, esse consumo aumentou posteriormente. O padrão de alimentação da prole pode estar correlacionado, parcialmente, com a aprendizagem modificada devido à exposição dos pais a agentes tóxicos (KNEE *et al.* 2004). Associado aos nossos resultados, Knezovich e Ramsay (2012) verificaram baixa metilação de dois *loci* espermático paterno e no DNA somático da prole devido ao consumo alcoólico pré-concepcional, conduzindo ao baixo peso corpóreo após o desmame. Essas alterações podem indicar atraso mental em estabelecer a alimentação independente (KNEZOVICH & RAMSAY, 2012). Além disso, o reestabelecimento do peso corpóreo após o desmame associado ao maior consumo de ração na idade adulta pode ser uma tentativa de recuperação no crescimento após um período de desenvolvimento mais lento (OZANNE & HALES 2007). Sabe-se que o menor peso corporal durante o início da vida pode levar à ativação do *catch-up growth*, mecanismo de crescimento compensatório (OZANNE & HALES 2007), conforme observado em nossos resultados.

São crescentes os estudos que relacionam o histórico de exposição parental com alterações fenotípicas da prole e na predisposição multi e transgeracional de desenvolver doenças, como câncer de mama e distúrbios metabólicos (ZHOU *et al.* 2021; LEE *et al.*, 2020; CRUZ *et al.* 2020). Em nosso estudo, as alterações nos parâmetros desenvolvimento no início da vida apresentaram ter contribuição tanto individual quanto de ambos os pais. Também observamos impacto na glândula mamária, tecido responsivo as alterações hormonais. O desenvolvimento mamário compreende o intervalo do nascimento à maturidade reprodutiva, sendo vários mecanismos, como status hormonal, genótipo, fatores de crescimento e citocinas necessários para manter o desenvolvimento puberal (DANIEL *et al.* 1996). A glândula mamária compreende três períodos críticos de crescimento e diferenciação, a vida embrionária, a puberdade e a gravidez. Impactos nessas fases, como inadequada sinalização endócrina, pode afetar a síntese de hormônios e a atividade dos receptores hormonais no tecido mamário, interferindo na sua funcionalidade (KAM *et al.*, 2021). Em relação a prole provinda de consumo alcoólico por ambos os pais, houve aumento na expressão de TGF- β 1, no DPN 30. A família dos TGF-beta é importante em todas as fases do desenvolvimento, desde a regulação da ramificação ductal à diferenciação funcional dos botões alveolares durante a gravidez (SERRA & CROWLEY, 2003). Alterações genéticas nos padrões de expressão podem conduzir a mudanças fenotípicas no desenvolvimento mamário, sendo sugerido que o TGF- β 1 atua como um regulador da ramificação mamária, limitando a proliferação epitelial e estimulando a produção de matriz extracelular (SERRA & CROWLEY 2003; DAVIS 2013). O TGF- β realça sua atividade reguladora do crescimento, sendo observado

normalização na regressão dos TEBs com a sua super expressão (SILBERSTEIN; DANIEL 1989). Além disso, sugere-se dois papéis opostos para esse receptor, por um lado ele inibe o crescimento das células epiteliais e por outro, estimula o desenvolvimento ductal (INGMAN & ROBERTSON 2009). Embora estudos ressaltem que sua super expressão na puberdade pode reduzir a taxa de crescimento ductal da árvore mamária (DANIEL 1996), nós não observamos impactos no crescimento nessa idade. Contudo, encontramos menor perímetro mamário no DPN 150 associado a tendência em menor área e crescimento, indicando possível involução da ramificação. Possivelmente, as alterações no TEBs na idade adulta tardia não foram observadas devido a sua diferenciação em alvéolos ou ductos terminais, mas, interferências na idade juvenil podem refletir, mesmo que em baixo grau, sobre o desenvolvimento posterior da glândula mamária.

Na mesma perspectiva, para manter o desenvolvimento mamário, é necessária uma complexa rede de interação, incluindo a resposta aos hormônios ovarianos, fatores de crescimento e citocinas (BERRYHILL *et al.*, 2015). O ER- α é necessário para o alongamento ductal na puberdade e o desenvolvimento completo da glândula mamária na maturidade, enquanto a progesterona medeia o desenvolvimento lobuloalveolar completo. Em conjunto, eles regulam o crescimento epitelial e a morfogênese mamária na maturidade sexual (MUELLER *et al.*, 2002). Nós encontramos menor perímetro mamário e número de botões terminais no DPN 30 e maior expressão de ER- α no DPN 300 pelo consumo alcoólico exclusivamente paterno. O crescimento inicial da glândula mamária ocorre pelo alongamento ductal linear promovido pelos TEBs, que atingem seu máximo no DPN 21 – 28 (RUSSO *et al.*, 1982). Zapaterini *et al.* (2022) encontraram aumento de ER- α associado ao menor número de TEBs, perímetro e área mamária na prole juvenil provinda de restrição proteica materna, ressaltando a suscetibilidade aumentada de mudanças morfológicas em fases iniciais de desenvolvimento. A diminuição na quantidade de TEBs, como observado em nossos resultados, e na densidade de ramificação, podem ser indícios de maturação tardia e impactar na glândula na idade adulta (DAVIS & FENTON, 2013). Em relação a expressão de ER- α na idade adulta tardia, seu aumento em idade mais avançada pode predispor ao desenvolvimento do câncer quando associado a outros fatores de alteração (FURTH *et al.*, 2023). Embora esse hormônio seja essencial para o desenvolvimento normal da glândula, sua super expressão, na senilidade, está associada a uma assinatura no risco proliferativo e à geração de adenocarcinomas (FURTH *et al.*, 2023). Quanto a prole provinda de uso exclusivamente materno, observamos aumento na expressão de PR no DPN 150. A sinalização desregulada da progesterona pode contribuir para a fisiopatologia mamária (AUPPERLEE *et al.*, 2005; DÍAZ-CRUZ *et al.* 2011). Joshi e colaboradores (2010), verificaram que a progesterona ativa a expansão de células-tronco mamárias multipotentes no adulto, sendo essas alvo na transformação celular. A progesterona também foi correlacionada ao aumento da expressão de enzima mutadora de DNA

durante o câncer de mama, sugerindo seu papel no acúmulo de mutações em células-tronco e progenitoras mamárias de longa vida (COELINGH & BENNINK *et al.*, 2023). Apesar de não observamos desequilíbrio oxidativo, inflamação ou alterações apoptóticas ou proliferativas, mudanças pontuais na glândula mamária da idade juvenil à adulta tardia podem suscetibilizá-la a doenças. Contudo, são necessários análises minuciosas que realcem a real significância dessas alterações na vida pós-natal.

Conclusão

Em resumo, o consumo de etanol materno, paterno e por ambos os pais se correlaciona com alterações na prole feminina não exposta, ressaltando a contribuição individual ou em conjunto dos pais. Apesar do menor peso corpóreo da prole, em todos os grupos, durante o início da vida, o consumo por ambos os pais acentua seu impacto sobre os parâmetros de desenvolvimento físico. O alterado consumo alimentar também se refere a possíveis alterações metabólicas que foram moduladas ao longo da vida para atender as necessidades fisiológicas do organismo. Diferentes fatores, como a relação materno-fetal, desequilíbrio hormonal, alterações na expressão de fatores de crescimento e citocinas, além de mecanismos epigenéticos podem colaborar para os efeitos observados.

O consumo materno e por ambos os pais acentua as alterações nos receptores mamários na idade juvenil e adulta, respectivamente, com normalização após esse período. Em contrapartida, o consumo de etanol paterno afetou mais significativamente a mama, com possível atraso na maturação mamária e aumento ER- α na idade adulta tardia.

Sugerimos que o consumo paterno tem maior influência sobre o tecido mamário da prole. Já na presença do etanol por ambos os pais, além da influência sobre os receptores mamários, também há prejuízos nos marcos de desenvolvimento físico. Nosso estudo ressalta como o consumo alcoólico pós-púbere pode modular a prole não exposta, sendo necessário maior cuidado pré-concepcional por ambos os pais.

Capítulo 3

Objetivos

Investigar se o consumo de alta quantidade de etanol pós-púbere parental altera os hormônios reprodutivos, citocinas pró-inflamatórias, as enzimas antioxidantes e os parâmetros do ovário da prole feminina não exposta, em diferentes idades. Também verificamos a contribuição materna, paterna e de ambos os pais nos efeitos observados.

Resultados

O consumo de etanol por ambos os pais atrasa a instalação da puberdade da prole

Quanto aos sinais externos de instalação da puberdade, apenas a prole E atrasou a abertura vaginal e o primeiro estro, enquanto não houve alterações nos outros grupos (Figura 1).

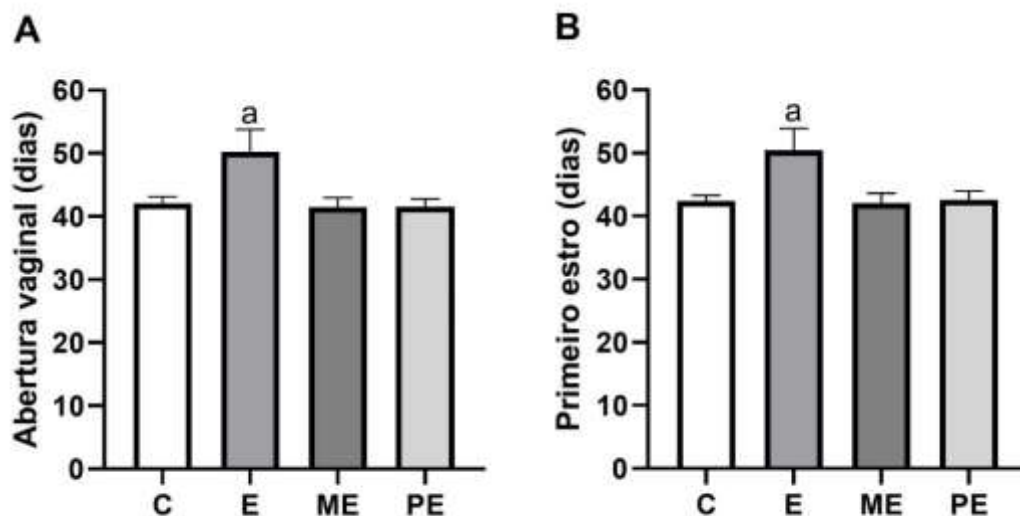


Figura 1. Sinais externos de instalação da puberdade. A prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) foi observada diariamente a partir do dia pós-natal 35 para constatação da abertura vaginal (A) e primeiro estro (B). $n = 20$ / grupo / fase. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ pelo Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn.

O consumo de etanol por ambos os pais altera o peso ovariano e uterino da prole

Conforme mostra a tabela 1, o peso relativo do ovário foi menor na fase púbere e adulta, enquanto do útero apenas na fase púbere, na prole E.

1182 Tabela 1. Peso relativo do ovário (direito e esquerdo) e útero e índice de adiposidade nos dias pós-natal 30, 50, 150 e
 1183 300 nas proles Controle, Etanol, Mãe Etanol e Pai Etanol.

Parâmetros/ Grupos	Controle	Etanol	Mãe Etanol	Pai Etanol
<i>Dia pós-natal 30 (juvenil)</i>				
Peso corpóreo (g)	83,33 ± 7,31	80,16 ± 7,82	80,00 ± 5,73	73,63 ± 5,35
Peso do ovário	0,58 ± 0,11	0,65 ± 0,09	0,61 ± 0,08	0,60 ± 0,00
Peso do útero	0,79 ± 0,23	0,85 ± 0,23	0,92 ± 0,31	0,89 ± 0,11
Índice de adiposidade	0,66 ± 0,13	0,81 ± 0,21	0,67 ± 0,25	0,59 ± 0,13
<i>Dia pós-natal 50 (púbere)</i>				
Peso corpóreo (g)	175,63 ± 13,06	170,60 ± 9,45	171,00 ± 0,15	175,45 ± 10,24
Peso do ovário	0,73 ± 0,11	0,65 ± 0,08 ^a	0,78 ± 0,07	0,76 ± 0,10
Peso do útero	2,33 ± 0,32	1,83 ± 0,43 ^a	2,27 ± 0,53	2,03 ± 0,62
Índice de adiposidade	1,44 ± 0,27	1,39 ± 0,22	1,25 ± 0,02	1,21 ± 0,21
<i>Dia pós-natal 150 (adulta)</i>				
Peso corpóreo (g)	263,50 ± 9,65	292,00 ± 18,20	272,80 ± 16,97	275,92 ± 15,71
Peso do ovário	0,73 ± 0,11	0,58 ± 0,77 ^a	0,66 ± 0,10	0,70 ± 0,93
Peso do útero	2,33 ± 0,32	2,32 ± 0,29	2,29 ± 0,44	2,68 ± 0,46
Índice de adiposidade	3,80 ± 0,59	4,09 ± 0,82	3,70 ± 1,05	3,29 ± 0,51
<i>Dia pós-natal 300 (adulta tardia)</i>				
Peso corpóreo (g)	294,84 ± 18,59	292 ± 19,07	295,09 ± 0,15	304,22 ± 18,23
Peso do ovário	0,55 ± 0,11	0,62 ± 0,12	0,58 ± 0,11	0,50 ± 0,12
Peso do útero	3,31 ± 0,99	2,94 ± 0,53	2,35 ± 0,59	2,57 ± 0,70
Índice de adiposidade	4,34 ± 0,94	4,91 ± 0,83	4,09 ± 0,93	4,80 ± 1,03

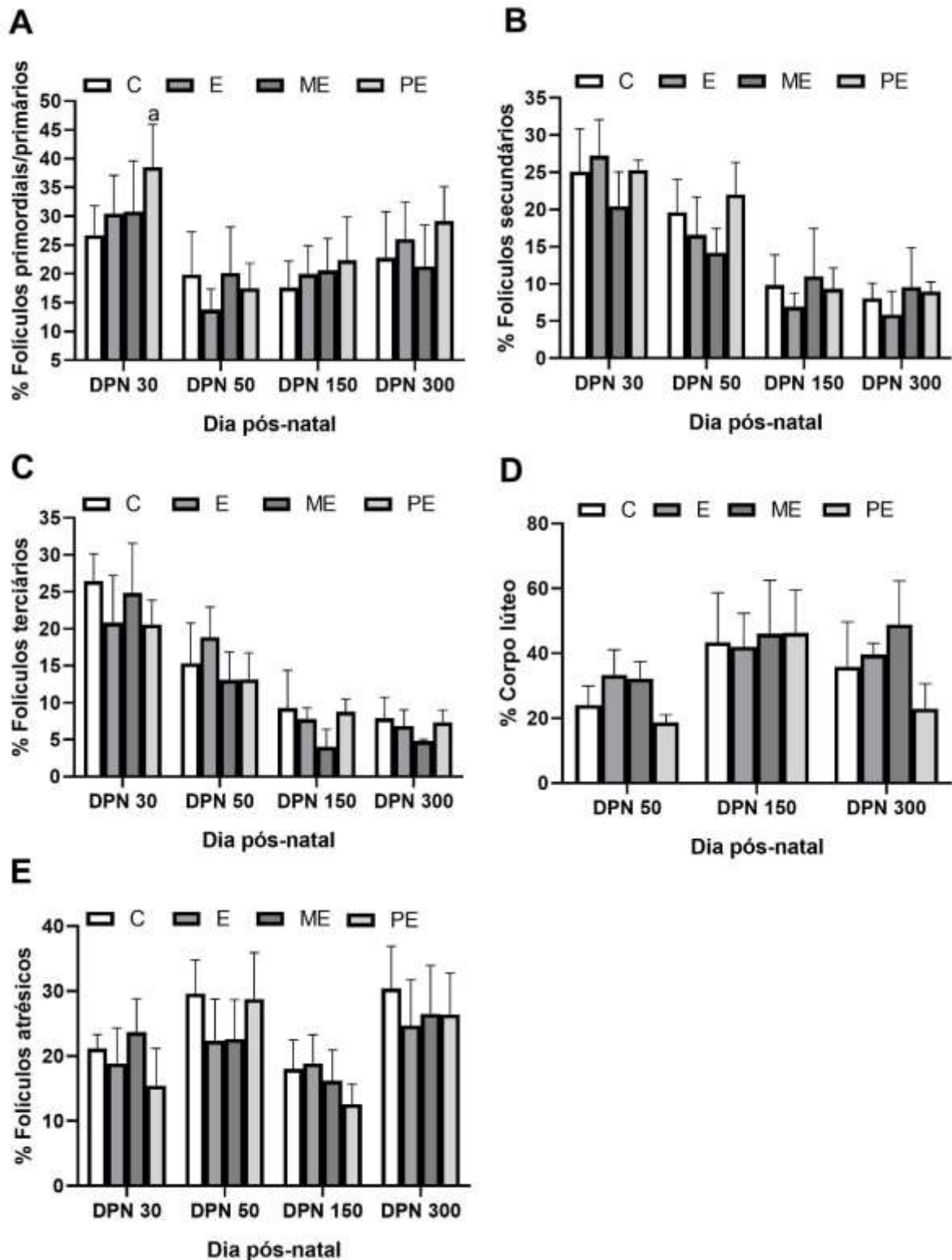
1184 Valores expressos como média ± D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. p < 0,05 pelo two-
 1185 way ANOVA com pós-teste de Dunnet. Peso: PInteração 0,0230, PTempo <0,0001, PGrupos 0,0240; Ovário:
 1186 PInteração <0,0001, PTempo <0,0001, PGrupos 0,1081; Útero: PInteração 0,0156, PTime < 0,0001, PGrupos 0,0676;
 1187 Adiposidade: PInteração 0,1796, PTime <0,0001, PGrupos 0,4258. n = 10 / fase / grupo

1188

1189 *O consumo de etanol paterno altera a porcentagem de folículos ovarianos na fase juvenil*

1190

1191 Encontramos maior porcentagem de folículos primordiais/primários (figura 2A) na
 1192 idade juvenil na prole PE, porém esse foi estabilizado após esse período.



1193
 1194 **Figura 2.** Contagem de folículos ovarianos. Os folículos primordiais/primários (A), secundários (B), terciários (C),
 1195 corpo lúteo (D) e atresícos (E) foram contabilizados em lâminas de ovário corado com hematoxilina-eosina na prole
 1196 dos grupos prole feminina Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150
 1197 e 300. n = 5 / grupo / idade. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como
 1198 média $\pm$ D.P. p < 0,05 pelo two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,2153, PTempo
 1199 <0,0001, PGrupos 0,0707; B: PInteração 0,0183, PTime < 0,0001, PGrupos 0,1606; C: PInteração 0,0230, PTempo

<0,0001, PGrupos 0,0240; D: PInteração < 0,1113, PTime 0,0002, PGrupos 0,0052; E: PInteração 0,0714, PTime < 0,0001, PGrupos 0,0102.

O consumo paterno ou materno de etanol diminui a proliferação celular de folículos ovarianos

Encontramos menor porcentagem de células da granulosa em proliferação nos folículos primordiais/primários em ME e PE (figura 3A), e nos secundários e terciários em ME, todos na idade adulta tardia (figura 3B - C).

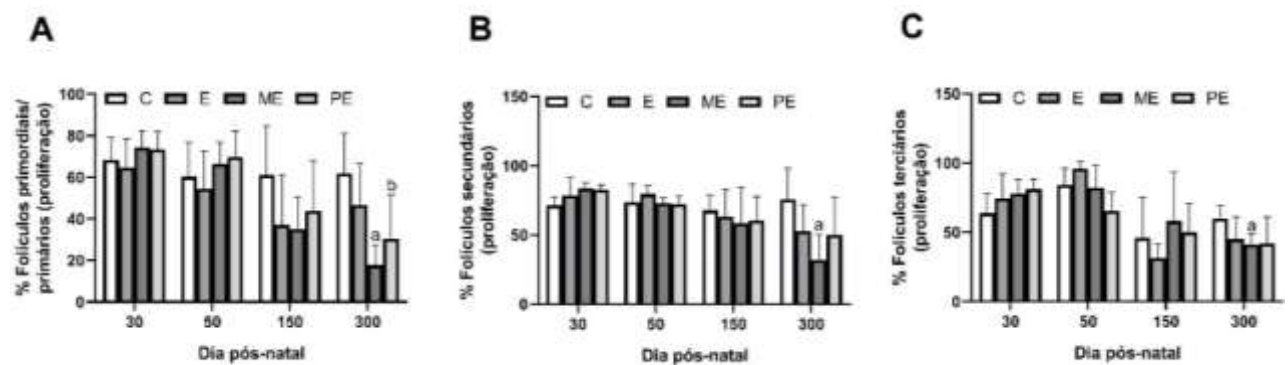


Figura 3. Proliferação celular da granulosa nos folículos ovarianos. Porcentagem dos folículos ovarianos marcados com anti Ki-67 para análise de proliferação celular nos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. n = 5/ grupo / idade. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. p < 0,05 pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,0051, PTempo <0,0001, PGrupos 0,0055; B: PInteração 0,0265, PTime < 0,001, PGrupos 0,1955; C: PInteração 0,7848, PTime < 0,0001, PGrupos 0,0088.

O consumo de etanol por ambos os pais materno alterou a concentração plasmática dos hormônios reprodutivos

Observamos menores níveis plasmáticos de 17 beta-estradiol em E na fase juvenil (figura 4).

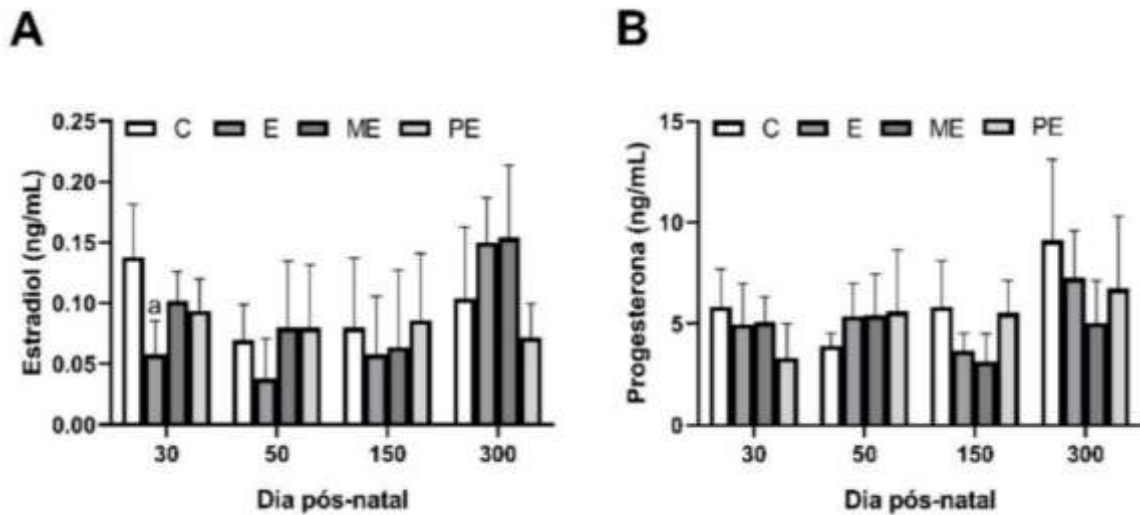


Figura 4. Hormônios reprodutivos. Concentração plasmática do estradiol (A) e progesterona (B) da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 5$ / grupo / idade. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,0402, PTempo 0,0029, PGrupos 0,2802; B: PInteração 0,1161, PTime 0,0062, PGrupos 0,2010; C: PInteração $< 0,0001$, PTime $< 0,0017$, PGrupos 0,0248.

O consumo de etanol parental interferiu na expressão dos receptores ovarianos da prole

A expressão do ER- α e PR foi menor no DPN 30 em todos os grupos (Figura 5). Em relação ao TFG- β 1, houve menor expressão no DPN 30 e 50 e aumento de NF-kB no DPN 300, ambos na prole E (Figura 6).

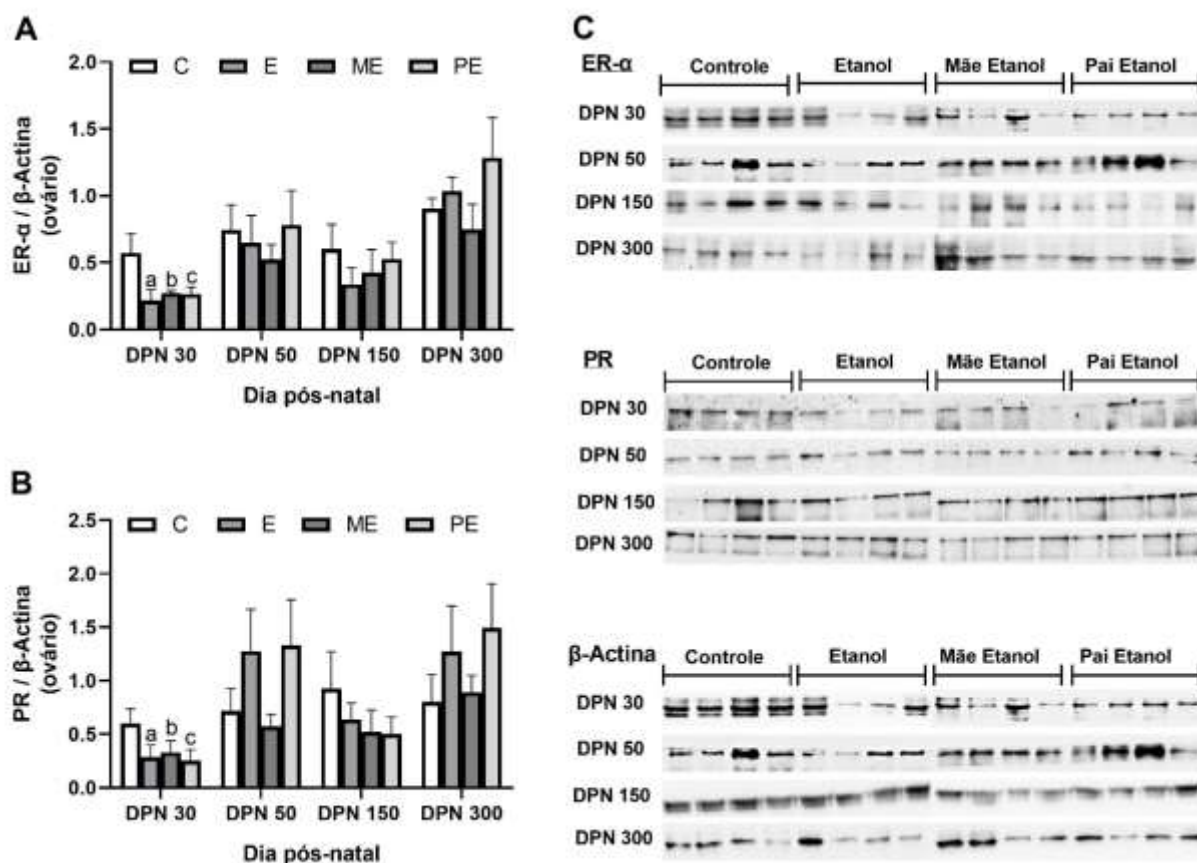


Figura 5. Western Blotting. A expressão de receptores de estrogênio alfa (A) e progesterona (B) foram avaliados no ovário da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 4$ / grupo / idade. As marcações estão representadas em C, sendo a beta-actina utilizada como controle endógeno. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,0091, PTempo $< 0,001$, PGrupos 0,0004; B: PInteração $< 0,0001$, PTime $< 0,0001$, PGrupos 0,0301.

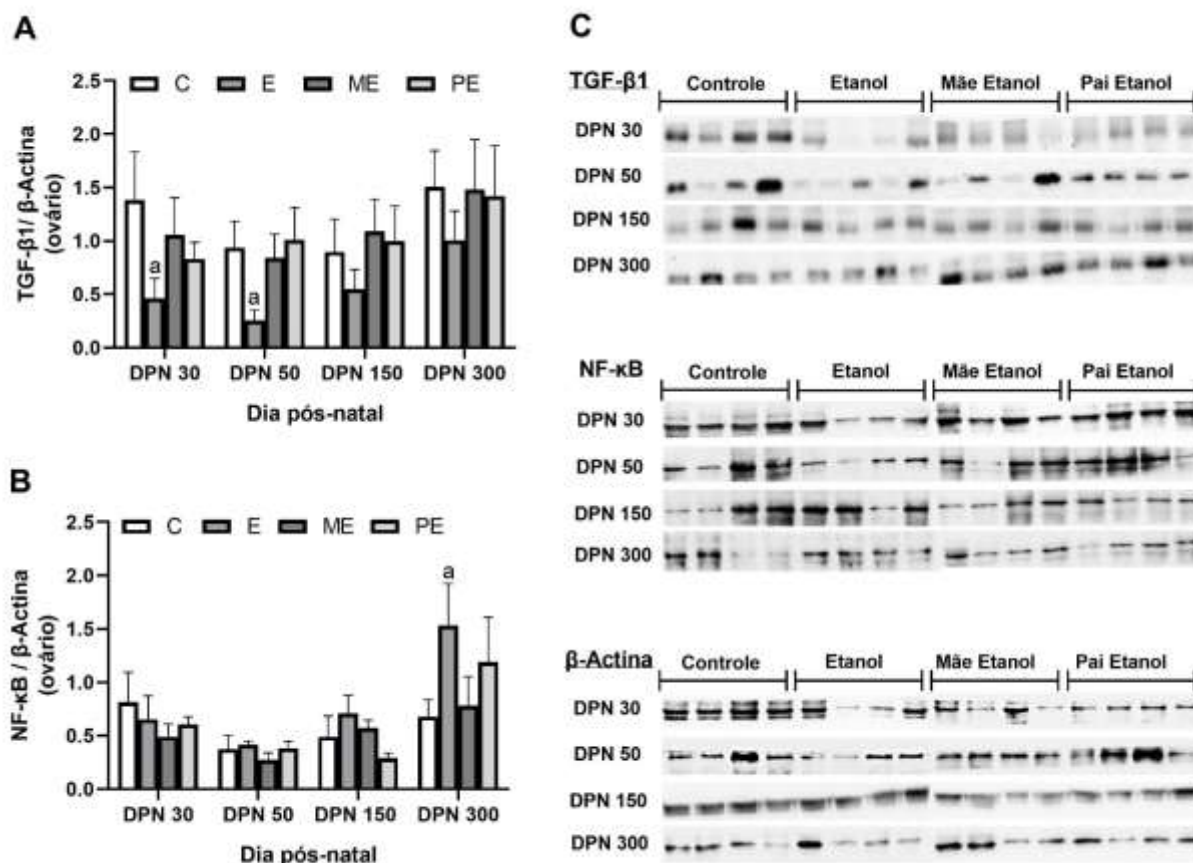


Figura 6. Western Blotting. A expressão de receptores de fator de crescimento transformador beta 1 (A) e do fator nuclear kB (B) foram avaliados no ovário da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 4$ / grupo / idade. As marcações estão representadas em C, sendo aa beta-actina utilizada como controle endógeno. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,3498, PTime $<0,0001$, PGrupos 0,0040; B: PInteração $<0,0001$, PTempo $<0,0001$ PGrupos 0,0020.

O consumo de etanol parental altera a concentração de citocinas plasmática da prole

Os níveis plasmáticos de VEGF, em PE, IL-6, em E e ME, e TNF- α , em todos os grupos, aumentaram na idade adulta tardia, enquanto o VEGF foi menor na idade púber em E (Figura 7).

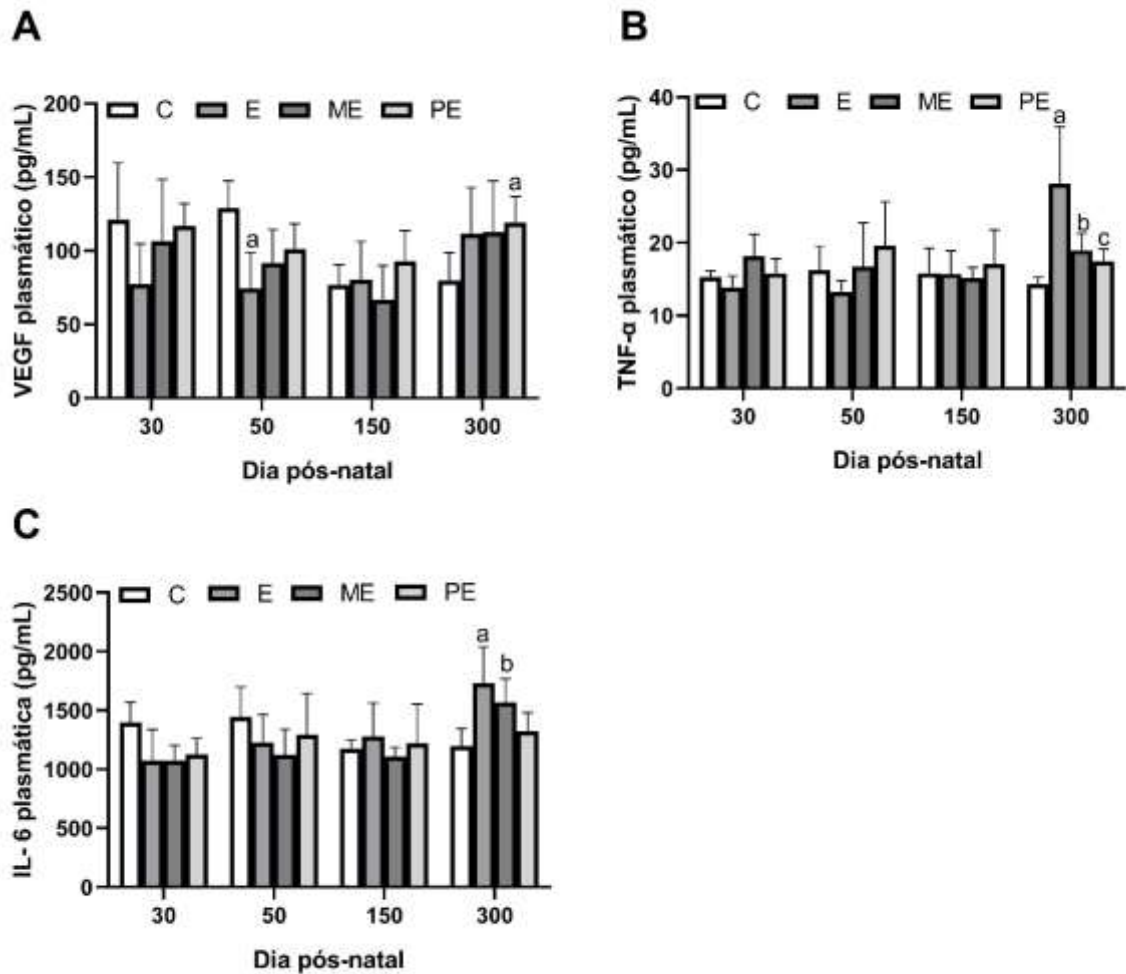


Figura 7. Dosagem de citocinas no plasma. A interleucina 6 (A), o fator de necrose tumoral alfa (B) e o fator de crescimento endotelial vascular (C) foram dosados no plasma da prole feminina Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 4 - 5$ /grupo / idade. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ pelo two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. Figuras A: PInteração 0,0078, PTempo 0,0018, PGrupos 0,4326; B: PInteração $<0,0001$, PTempo 0,0073, PGrupos 0,1873; C: PInteração 0,0168, PTime 0,0095, PGrupos 0,0567.

O consumo de etanol por ambos os pais altera as enzimas antioxidantes ovarianas da prole

Encontramos aumento da enzima antioxidante Superóxido Dismutase no ovário da prole E apenas na idade adulta tardia (Figura 8). Não houve alteração na concentração de Malonaldeído.

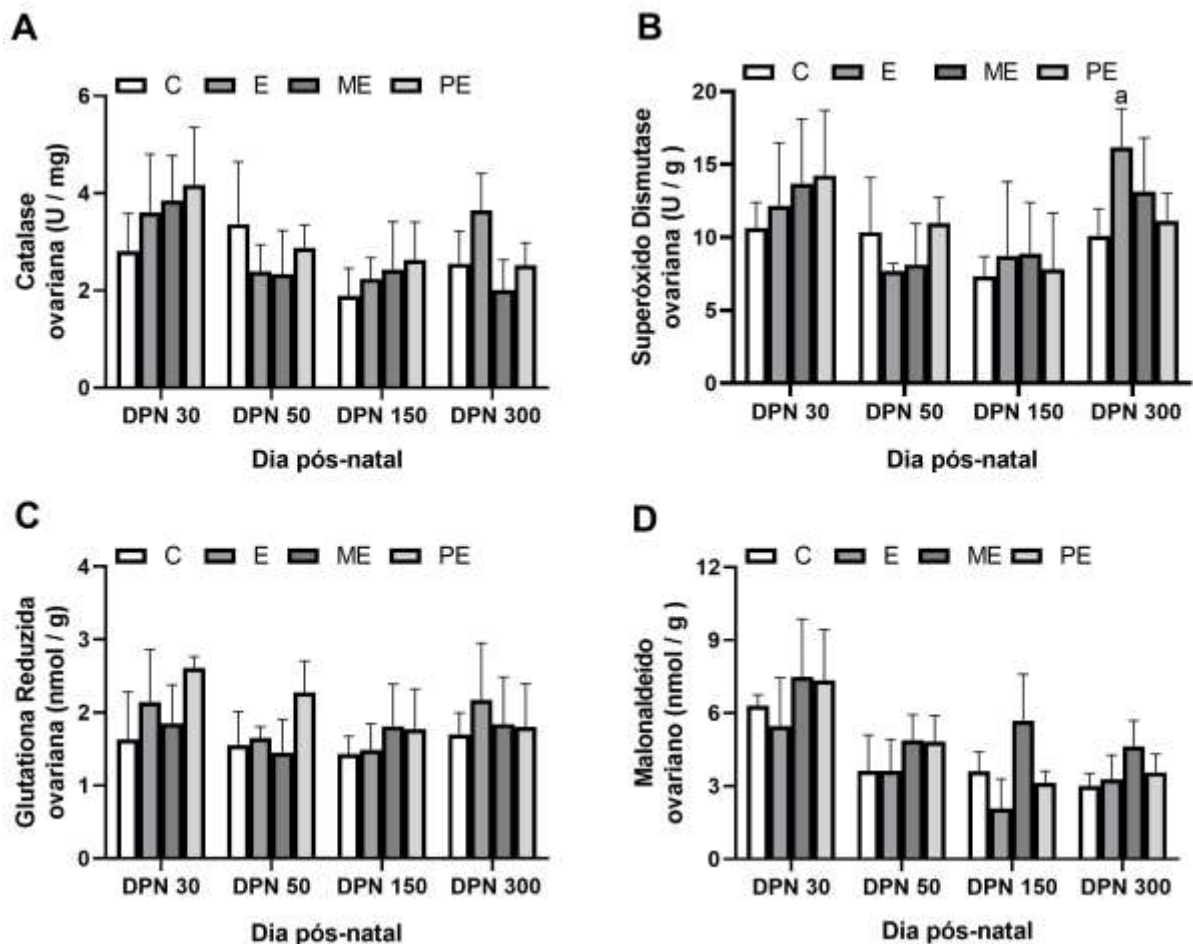


Figura 8. Estresse oxidativo. A atividade das enzimas antioxidantes Catalase (A), Superóxido Dismutase (B) e Glutathiona Reduzida (C) e do oxidante Malonaldeído (D) foram verificadas no ovário da prole feminina Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 5$ / grupo / idade. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ pelo two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. Figuras A: PInteração 0,0756, PTempo 0,40017, PGrupos 0,4072; B: PInteração 0,2357, PTempo 0,0006, PGrupos 0,4956; C: PInteração 0,4633, PTempo 0,0493, PGrupos 0,14221; D: PInteração 0,4512, PTempo 0,0009, PGrupos $< 0,0001$.

Discussão

Nosso estudo ressalta como o estilo de vida parental na pós-adolescência, como o consumo de etanol, pode influenciar negativamente os parâmetros reprodutivos das futuras gerações. Nós verificamos que o consumo parental influencia o funcionamento e desenvolvimento ovariano e conduz a um ambiente inflamatório e oxidativo da prole feminina não exposta ao etanol, com contribuição individual, materna ou paterna, e em conjunto, ambos os pais. O uso afeta a prole ao longo da vida, sendo o consumo materno ou paterno capaz de alterar a expressão de receptores ovarianos e citocinas pró-inflamatórias, com menor contagem de folículos pelo consumo paterno e taxa proliferativa pelo materno. Enquanto o consumo por ambos os pais também interferiu no

desenvolvimento físico, na puberdade, no estradiol e susceptibilizou a um ambiente pró-inflamatório na idade adulta tardia.

Estudos recentes apoiam que a saúde, o estilo de vida e o estado nutricional nos períodos pré-concepcionais são essenciais para o normal desenvolvimento do feto (BEDI *ET AL.*, 2019; ÖZTÜRK *et al.* 2021). Assim, tantos os mecanismos epigenéticos, ocasionados pelas exposições ambientais anteriores à concepção, como a programação fetal, dada pela plasticidade do desenvolvimento do feto para manter a homeostase em condições inadequadas, exercem um impacto significativo na saúde e no desenvolvimento da prole (CHANG *et al.*, 2017; MARCINIAK *et al.*, 2017). Recentemente, verificamos prejuízos no desenvolvimento físico na prole pelo uso de etanol parental, porém não correlacionamos a contribuição individual dos pais (FIORAVANTE *et al.*, 2021). Aqui, nós observamos que apenas o consumo alcoólico por ambos os pais foi capaz de atrasar os sinais externos da instalação da puberdade e a concentração plasmática de estradiol. A abertura vaginal e o primeiro estro são utilizados para avaliar indiretamente o desenvolvimento puberal e o estado de maturação ovariana, visto que a puberdade é marcada por alterações morfológicas e funcionais em diferentes níveis do eixo HHG (OJEDA *et al.*, 2014). A informação final sobre o estado de maturação ovariana só pode ser obtida pela primeira ovulação, ou seja, pela a presença de corpos lúteos (GAYTAN *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, não observamos alteração na quantidade de folículos ou corpo lúteo no grupo E em nenhuma idade analisada, seja anterior a ovulação, pré-púbere, ou posterior, pós-púbere. Contudo, menores níveis de estradiol plasmático associado a menor expressão do ER- α ovariano, ambos no DPN 30, podem ter acentuado o atraso da instalação da puberdade posteriormente. Além disso, foi constatado prolongamento das fases estro e proestro na prole provinda de consumo alcoólico parental (FIORAVANTE *et al.*, 2021), indicando possível desequilíbrio no eixo HHG. Associado a esses parâmetros, a prole E também apresentou menores peso ovariano e uterino, no DPN 50 e 150, e expressão do TGF- β 1, no DPN 30 e 50, reforçando a influência do consumo por ambos os pais. A família dos TGF-betas tem papel chave para regular a proliferação celular, a produção de hormônios esteroides e o sistema imunológico, bem como o desenvolvimento e função folicular (VANDERHYDEN *et al.* 2003; KUBICZKOVA *et al.*, 2012). Ingman e Robsertson (2009) verificaram que a deficiência de TGF- β 1 na puberdade atrasou o início da maturidade sexual, prolongou o ciclo estral e alterou os níveis de LH plasmático, enquanto sua baixa expressão em idades mais avançadas foi associada a alteração no desenvolvimento folicular e qualidade de oócitos (HAN *et al.*, 2011). Baixa concentração plasmática de VEGF no DPN 50, observada em E, também pode se correlacionar ao TGF- β 1. O VEGF atua na regulação da angiogênese ovariana, processo essencial para o crescimento e desenvolvimento normal dos tecidos, formação de novos vasos sanguíneos, entrega de oxigênio e nutrientes e na distribuição de hormônios para as células-

alvo (KACZMAREK *et al.*, 2005; APTE *et al.*, 2019). A inibição da expressão de VEGF pode resultar na diminuição da angiogênese folicular e no de desenvolvimento de folículos antrais maduros (KACZMAREK *et al.*, 2005). Sua associação com o TGF- β 1 é intrinsicamente íntima, incluindo a secreção desses fatores nas células da granulosa (KUO *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2020). Guo e colaboradores (2022) verificam que o VEGF participa da via regulatória do TGF- β 1, que então influencia o desenvolvimento folicular. Apesar da expressão do VEGF no fluido folicular ter maiores concentrações em relação ao plasma (LEE *et al.*, 1997), sugerimos que a baixa expressão de TGF- β 1 ovariana seja um dos fatores associado as menores concentrações de VEGF plasmática. Mesmo não observando impactos significativos no desenvolvimento folicular, verificamos maior suscetibilidade do ovário em responder as mudanças na fase juvenil e púbere em E. Em contrapartida, a prole provinda de consumo alcoólico exclusivamente paterno apresentou menor porcentagem de folículos primordiais/primários no DPN 30, podendo indicar atraso na maturação até atingir a oocitação, contudo, não houve alteração na porcentagem de corpos lúteos nas demais idades.

Em adição, encontramos menor expressão de ER- α e PR no DPN 30 em todos os grupos, sendo esses necessários para a função ovariana e controle do ciclo reprodutivo. Durante a fase juvenil, ondas pulsáteis de LH são estimuladas pelo estrógeno juntamente com influência de neurotransmissores excitatórios, Kisspeptina, fatores de crescimento, prolactina, entre outros, sendo o pico de liberação na puberdade dependente da maturação do eixo HHG (PICUT, 2015). Tanto o estradiol quanto a progesterona são necessárias para estimular a liberação de GnRH e LH e manter o eixo HHG estável (MOHR *et al.*, 2022). Assim, anormalidades nesta sinalização resultam na desregulação dos níveis hormonais que afetam vários sistemas de órgãos e hormônios (MOHR *et al.*, 2022). O receptor de estrogênio desempenha um papel importante no desenvolvimento do folículo além do estágio antral (CHAKRAVARTHI *et al.* 2021). Esses impactos durante a fase juvenil podem influenciar, posteriormente, a regulação do eixo HHG. Nosso estudo vai de encontro à Dupont *et al.* (2000), que observaram normal desenvolvimento folicular até o estágio antral, mesmo na ausência de ER- α (SINKEVICIUS *et al.*, 2009). Contudo, hipoplasia uterina, maior quantidade de folículos antrais e atresicos e aumento de LH com consequente estímulo da Cyp17 a sintetizar androstenediona, afetando o ambiente hormonal, também foram observados (DUPONT *et al.*, 2000; COUSE *et al.*, 2003). Portanto, a falta de feedback negativo do estradiol na hipófise aumenta a produção de gonadotrofinas e a sinalização nas células foliculares (JAMNONGJIT *et al.*, 2006). Já a progesterona, responsável pela maturação dos ovócitos e estimulada pelo LH (WOODWORTH 2020), quando aumentada, pode acelerar a puberdade e diminuir a expressão dos receptores hipotalâmicos (SÁ FILHO *et al.* 2010), sendo o inverso passível de ocorrer. Em geral, esses estudos acentuam nossa hipótese

1360 inicial, indicando que as alterações na fase juvenil, idade de preparo fisiológico para a puberdade,
1361 podem afetar sistematicamente o organismo, incluindo a sinalização neuroendócrina e fatores
1362 envolvidos na coordenação do ciclo reprodutivo. Além disso, comprometimento na função dos
1363 receptores de estrógeno, relacionam-se às doenças endócrinas e reprodutivas (TANG *et al.*, 2019).

1364 Também observamos redução na taxa proliferativa das células da granulosa em ME e PE,
1365 ambos na idade adulta tardia. O desenvolvimento de um oócito requer uma série de vias de
1366 sinalização parácrinas e endócrinas que direcionam o crescimento e a maturação do oócito desde
1367 a montagem do folículo primordial até a oocitação (VOROTINA *et al.*, 2006). Assim, o
1368 desenvolvimento folicular ovariano é um processo de remodelação cíclica caracterizado por altas
1369 taxas de proliferação e atresia (VOROTINA *et al.*, 2006). Estudos indicam que as células da
1370 granulosa de folículos maiores apresentam menor taxa proliferativa e maior diferenciação, com
1371 maior expressão de marcadores de maturação das células da granulosa (COSTERMANS *et al.*,
1372 2019). Embora a apoptose seja mecanismo subjacente à atresia folicular e fundamental para o
1373 crescimento cíclico e a regressão dos folículos (DAS *et al.*, 2008), não observamos alteração na
1374 porcentagem de folículos atrésicos. Alterações na taxa proliferativa podem indicar uma resposta
1375 inadequada à sinalização hormonal. Além disso, também observamos mudanças pontuais como
1376 menor expressão ER- α , no DPN 30, o que pode ter colaborado para os efeitos observados
1377 posteriormente.

1378 Em relação ao ambiente inflamatório e oxidativo, encontramos prejuízos apenas na idade
1379 adulta tardia. Observamos aumento no IL-6, em E e ME, e TNF- α , sendo essas citocinas pró-
1380 inflamatórias (KHAN *et al.*, 2018). A inflamação é caracterizada por um estado pró-inflamatório
1381 sistêmico crônico, e, conforme ocorre envelhecimento, há aumento progressivo da inflamação pelo
1382 desequilíbrio das citocinas, predispondo ao surgimento de doenças (XIA *et al.* 2016). As células
1383 senescentes secretam fatores de crescimento, proteases, quimiocinas e citocinas como IL-6, sendo
1384 que citocinas como o TNF- α induzem a senescência celular pela ativação de espécies reativas de
1385 oxigênio e mediadores pró-inflamatórios (SASAKI *et al.*, 2008). Em conjunto, verificamos que
1386 todos os grupos apresentaram aumento do TNF- α na idade adulta tardia, mas apenas E e ME foram
1387 responsivos aumentando a IL-6, indicador do status inflamatório. Já a prole PE aumentou as
1388 concentrações no VEGF nessa idade, sendo a angiogênese contribuinte para o crescimento,
1389 migração e sobrevivência das células endoteliais a partir da vasculatura pré-existente, contudo, seu
1390 aumento pode suscetibilizar a formação de carcinomas (RAGHUNATHACHAR *et al.*, 2017).

1391 Associado, a prole provinda de consumo por ambos os pais também aumentou a expressão
1392 de NF- κ B e do antioxidante SOD, no DPN 300. O NF- κ B é elemento-chave para regular a
1393 inflamação devido a resposta ao estresse fisiológico ou oxidativo. Os dímeros mais comuns são o
1394 p50 e p65, que se mantém ligados ao inibidor I κ B quando em repouso. Sob estímulos de moléculas,

como o TNF- α , se ligam a determinados receptores, dissociam-se do I κ B, translocando-se para o núcleo e transcrevem o gene alvo (HOESEL; SCHMID, 2013). Portanto, o aumento da expressão da subunidade p65, observado em nosso estudo, pode refletir a atividade do NF- κ B (HOESEL; SCHMID, 2013). Sabe-se que o NF- κ B atua na função fisiológica normal durante a foliculogênese (LUO *et al.*, 2022), mas, seu aumento está correlacionado à processos patológicos com a expressão elevada de p65 e p50 em mais de 90% de câncer de ovário (HARRINGTON *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015). Apesar disso, não se pode utilizá-los como marcadores prognóstico isoladamente (WANG *et al.*, 2015), apesar de nossos dados indicarem status inflamatório ovariano em E. Nossa hipótese é apoiada pelo aumento do antioxidante SOD. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ou na utilização de antioxidantes pode conduzir ao desequilíbrio nas reações redox e levar ao estresse oxidativo (VATNER *et al.* 2020). O acentuado ambiente pró-inflamatório em E pode ter contribuído para ativação da SOD, visto que os antioxidantes previnem a ativação excessiva de NF- κ B (GRIMBLE 2013). Desequilíbrio entre o estresse oxidativo no microambiente ovariano pode resultar em patologias, como parada meiótica dos oócitos, apoptose de células da granulosa e disfunção do corpo lúteo, acelerando o processo de envelhecimento ovariano (YAN *et al.*, 2022).

Conclusão

Concluimos que o alto consumo de etanol parental, mesmo que restrito ao período pós-púbere, altera os parâmetros reprodutivos, em diferentes fases, e induz citocinas pró-inflamatórias na descendência feminina não exposta ao etanol. Possivelmente, mecanismos epigenéticos estão relacionadas a esses impactos. Também sugerimos alterações metabólicas e no eixo HHG. A idade adulta tardia também foi afetada, sendo as respostas observadas na prole dependentes da contribuição individual ou de ambos os pais. Os efeitos são acentuados na prole provinda de consumo alcoólico materno e paterno, visto o atraso na instalação da puberdade, baixo peso ovariano e uterino, alteração na expressão de receptores ovarianos e menor nível de estradiol plasmático. O consumo exclusivamente paterno ou materno também apresentou sua influência, como a menor porcentagem de proliferação folicular, ascendendo a importância dos cuidados pré-concepcionais tanto materno quanto paterno. Em geral, o desenvolvimento do folículo não foi afetado, mas, o ambiente pró-inflamatório observado na idade adulta tardia pode indicar sinais de envelhecimento e maior suscetibilidade no desenvolvimento de doenças. Nossos achados ressaltam a importância da seleção dos hábitos cotidianos para manter o bem-estar futuro, principalmente, sobre a fertilidade e funcionalidade reprodutiva das futuras gerações.

Conclusões gerais

Concluimos que o consumo alcoólico parental pós-púbere impacta os parâmetros de desenvolvimento físico bem como nos órgãos hormônio-dependentes, ovário e mama, na prole feminina não exposta. Além disso, verificamos que há contribuição materna, paterna e de ambos os pais, sendo que o consumo alcoólico por ambos os pais acentua os efeitos observados na prole, principalmente sobre as características de desenvolvimento físico, puberdade e nível hormonal. O ovário mostrou-se mais suscetível do que a glândula mamária, contudo, as alterações nos receptores ovarianos não interferiram significativamente para progressão folicular após a puberdade. Curiosamente, encontramos aumento de citocinas pró-inflamatórias na idade adulta tardia, sendo o ovário da prole provinda de consumo por ambos mais responsiva ao aumentar a SOD, enzima antioxidante, e o receptor NF-kB. Quanto a glândula mamária, encontramos alterações em receptores envolvidos na regulação do seu crescimento, mas, as alterações foram pontuais e não interferiram no seu desenvolvimento em geral. Interessante notar que apenas o consumo por ambos os pais ou exclusivamente paterno ocasionaram alteração no perímetro mamário e contagem de brotos terminais.

De acordo com os parâmetros analisados, podemos associar que o consumo por ambos os pais afeta mais a prole, seguido pelo consumo exclusivamente paterno e depois pelo consumo exclusivamente materno. Assim, já conhecido a importância das experiências maternas além da relação materno-fetal para a saúde do feto e vida pós-natal, políticas preventivas devem também ressaltar a influência do estilo de vida paterno no desenvolvimento da prole.

Perspectivas futuras

Como o consumo alcoólico parental afetou a prole durante o desenvolvimento inicial assim como o padrão alimentar, seria relevante verificar a expressão de fatores que regulem o controle e o desenvolvimento, a saciedade e o metabolismo da prole. Além disso, as alterações encontradas na mama em diferentes idades demonstram suscetibilidade pelo consumo alcoólico parental. Possivelmente, insultos ambientais, como a exposição ao consumo alcoólico pela prole, poderiam afetar a mama de forma relevante e irreversível, além de predispor a doenças. Apesar das mudanças pontuais observadas na glândula mamária, é relevante verificar seu funcionamento durante o período lactacional, fase de máxima diferenciação, tanto na produção de leite quanto na sua qualidade nutritiva.

Para maior precisão, análise dos hormônios e fatores neuroendócrinos envolvidos no eixo HHG também são necessárias. Possivelmente, fatores de crescimento e sinalização androgênica podem estar envolvidos. Verificar a qualidade dos oócitos e mecanismos envolvidos na reprodução e fertilização podem contribuir para avaliar os danos reprodutivos. Além disso, a dosagem de citocinas pró-inflamatórias localmente poderiam acentuar nossa hipótese de envelhecimento precoce e o aumento da suscetibilidade a patologias após a idade senil.

Referências

- 1490
- 1491
- 1492 AMORIM, J. P., CHUFFA, L. G., TEIXEIRA, G. R., MENDES, L. O., FIORUCI, B. A., MARTINS, O. A.,
- 1493 MARTINEZ, F. E. Variations in maternal care alter corticosterone and 17beta-estradiol levels, estrous cycle and
- 1494 folliculogenesis and stimulate the expression of estrogen receptors alpha and beta in the ovaries of UCh rats.
- 1495 **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 160. 2011.
- 1496 APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development.
- 1497 **Cell**, v. 176, n. 6, p.1248-1264, 2019.
- 1498 ASIMES, A.; KIM, C. K.; CUARENTA, A.; AUGER, A. P.; PAK, T. R. Binge Drinking and Intergenerational
- 1499 Implications: Parental Preconception Alcohol Impacts Offspring Development in Rats. **Journal of the Endocrine**
- 1500 **Society**, v. 2, n. 7, p. 672–686, 2018.
- 1501 ASIMES, A.; TORCASO, A.; PINCETI, E.; KIM, C. K.; ZELEZNIK-LE, N. J.; PAK, T. R. Adolescent binge-pattern
- 1502 alcohol exposure alters genome-wide DNA methylation patterns in the hypothalamus of alcohol-naïve male offspring.
- 1503 **Alcohol**, v. 60, p. 179–189, 2017.
- 1504 AUPPERLEE, M.; KARIAGINA, A.; OSUCH, J.; HASLAM, S.Z. Progestins and breast cancer. **Breast Disease**, v.
- 1505 24, p. 37-57, 2005.
- 1506 BADR, F. M.; BADR, R. S. Induction of dominant lethal mutation in male mice by ethyl alcohol. **Nature**, v. 253, p.
- 1507 134-136, 1975.
- 1508 BALDDIN, J.; BERGLUND, K. J.; BERGGREN, U.; WENNBORG, P.; FAHLKE, C. TAQ1A1 Allele of the DRD2
- 1509 Gene Region Contribute to Shorter Survival Time in Alcohol Dependent Individuals When Controlling for the
- 1510 Influence of Age and Gender. A Follow-up Study of 18 Years. **Alcohol and Alcoholism**, v.53, p. 216–220, 2018.
- 1511 BARAZANI, Y.; KATZ, B. F.; NAGLER, H. M.; STEMBER, D. S. Lifestyle, environment, and male reproductive
- 1512 health. **The Urologic clinics of North America**, v. 41, n. 1, p. 55–66, 2014.
- 1513 BART, A.; ELLENBROEK, N. D.; HI-JOON, P. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats.
- 1514 **Stress**, v. 8, p. 247-257, 2005. BARTON, S.C.; SURANI, M.A.; NORRIS, M.L. Role of paternal and maternal
- 1515 genomes in mouse development. **Nature**, v. 311, p. 374–376, 1984.
- 1516 BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, v. 301, p.1111, 1990.
- 1517 BIANCO-MIOTTO, T.; CRAIG, J. M.; GASSER, Y. P.; VAN DIJK, S. J.; OZANNE, S.E. Epigenetics and
- 1518 DOHaD: from basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, p. 513 -
- 1519 519, 2017.
- 1520 BEDI, Y.; CHANG, R.C.; GIBBS, R.; CLEMENT, T.M.; GOLDING, M.C. Alterations in sperm-inherited noncoding
- 1521 RNAs associate with late-term fetal growth restriction induced by preconception paternal alcohol use. **Reproductive**
- 1522 **Toxicology**, v. 87, p.11-20, 2019.
- 1523 BERRYHILL, G. E.; TROTT, J. F.; HOVEY, R. C. Mammary gland development--It's not just about
- 1524 estrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.1, p. 875-83, 2016.
- 1525 BORGES, C.S.; PACHECO, T.L.; GUERRA, M.T.; BARROS, A.L.; SILVA, P.V.; MISSASSI, G.; DA SILVA, K.P.;
- 1526 ANSELMO-FRANCI, J.A.; PUPO, A.S.; KEMPINAS, W.G. Reproductive disorders in female rats after prenatal
- 1527 exposure to betamethasone. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 1065-1072, 2017.
- 1528 BODDEN, C.; HANNAN, A. J.; REICHEL, A. C. Diet-Induced Modification of the Sperm Epigenome Programs
- 1529 Metabolism and Behavior. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 31, p. 131-149, 2019.
- 1530 BROMFIELD, J.J.; SCHJENKEN, J.E.; CHIN, P.Y.; CARE, A.S.; JASPER, M.J.; ROBERTSON, S.A. Maternal tract
- 1531 factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. **Proceedings of the National**
- 1532 **Academy of Sciences**, v. 111, p. 2200-2205, 2014.
- 1533 CALAMANDREI, G.; ALLEVA, E. Epidermal growth factor has both growth- promoting and growth-inhibiting
- 1534 effects on physical and neurobehavioral development of neonatal mice. **Brain Research**, v. 477, p.1-6, 1989.
- 1535 CARDIFF, R. D.; ANVER, M. R.; GUSTERSON, B. A.; HENNIGHAUSEN, L.; JENSEN, R. A.; MERINO, M. J.;
- 1536 REHM, S.; RUSSO, J.; TAVASSOLI, F. A.; WAKEFIELD, L. M.; WARD, J. M.; GREEN, J. E. The mammary
- 1537 pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting.
- 1538 **Oncogene**, v. 19, p. 968 – 988, 2000.
- 1539 CAROLAN-OLAH, C.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review: early nutrition and prenatal
- 1540 programming for adult disease. **Journal of Clinical Nursing**, v. 24, p. 3716-3729. 2015.
- 1541 CARTER, R. C.; JACOBSON, J. L.; DODGE, N. C., GRANGER, D. A.; JACOBSON, S. W. Effects of prenatal
- 1542 alcohol exposure on testosterone and pubertal development. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.
- 1543 38, n. 6, p.1671-1690, 2014.
- 1544 CHANG, R.C.; SKILES, W.N.; CHRONISTER, S.S.; WANG, H.; SUTTON, G.I.; BEDI, Y.S.; SNYDER M.; LONG,
- 1545 C.R.; GOLDING, M.C. DNA methylation-independent growth restriction and altered developmental programming
- 1546 in a mouse model of preconception male alcohol exposure. **Epigenetics**, v. 12, p.841-853, 2017.

- CHAKRAVARTHI, V.P.; RATRI, A.; MASUMI, S.; BOROSHA, S.; GHOSH, S.; CHRISTENSON, L.K.; ROBY, K.F.; WOLFE, M.W.; RUMI, M.A.K. Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage: the role of estrogen receptor β Mol. **Cell Endocrinology**, v. 528, 2021.
- CRUZ, R.S.; CHEN, E.; SMITH, M.; BATES, J.; DE ASSIS, S. Diet and Transgenerational Epigenetic Inheritance of Breast Cancer: The Role of the Paternal Germline. **Frontiers in Nutrition**, v.15, p. 93, 2020.
- CANTACORPS, L.; ALFONSO-LOECHES, S.; MOSCOSO-CASTRO, M.; CUITAVI, J.; GRACIA-RUBIO, I.; LÓPEZ-ARNAU, R.; ESCUBEDO, E.; GUERRI, C.; VALVERDE, O. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. **Neuropharmacology**, v. 123, p. 368-384, 2017.
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinical Liver Disease**, v. 16, p. 667-685, 2012.
- COELINGH, B. H.J.T., SCHULTZ, I.J., SCHMIDT, M. Progesterone from ovulatory menstrual cycles is an important cause of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 25, p. 60, 2023.
- COSTERMANS, N.G.J.; KEIJER, J.; VAN SCHOTHORST, E.M.; KEMP, B.; KESHTKAR, S.; BUNSCHOTEN, A.; SOEDE, N.M.; TEERDS, K.J. In ovaries with high or low variation in follicle size, granulosa cells of antral follicles exhibit distinct size-related processes. **Molecular Human Reproduction**, v. 28, p. 614-624, 2019.
- COUSE J.F.; YATES, M.M.; WALKER, V.R.; KORACH, K.S. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER α but not ER β . **Molecular Endocrinology**, v. 17, p.1039–1105, 2003.
- COLE-HARDING, S.; WILSON, J. R. Ethanol metabolism in men and women. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 48, n. 4, p. 380–387, 1987.
- DAS, M.; DJAHANBAKHCH, O.; HACIHANEFIOGLU, B.; SARIDOGAN, E.; IKRAM, M.; GHALI, L.; RAVEENDRAN, M.; STOREY, A. Granulosa Cell Survival and Proliferation Are Altered in Polycystic Ovary Syndrome, **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 881–887, 2008,
- CRESTANI, A.; ARFI, A.; PLOTEAU, S.; BREBAN, M.; BOUDY, A.S.; BENDIFALLAH, S.; FERRIER, C.; DARAI, E. Anogenital distance in adult women is a strong marker of endometriosis: results of a prospective study with laparoscopic and histological findings. **Human Reproduction Open**, v. 6, 2020.
- DANIEL, C.W.; ROBINSON, S.; SILBERSTEIN, G.B. The role of TGF- β in patterning and growth of the mammary ductal tree. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, p. 331–341, 1996.
- DAVIS, B. & FENTON, S. Mammary Gland. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, p. 2665–2694, 2013.
- DEPARTAMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (HHS). **Dietary Guidelines for Americans: Alcoholic Beverages**, 2005. Disponível em: <<https://health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/default.htm>>. Acesso em 09 de fevereiro de 2024.
- DÍAZ-CRUZ, E.S.; SUGIMOTO, Y.; GALLICANO, G.I.; BRUEGGEMEIER, R.W.; FURTH, P.A. Comparison of increased aromatase versus ER α in the generation of mammary hyperplasia and cancer. **Cancer Research**, v. 15, p. 5477-5487, 2011.
- DUPONT, S.; KRUST, A.; GANSMULLER, A.; DIERICH, A.; CHAMBON, P.; MARK, M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. **Development**, v. 127, n. 19, p. 4277–4291, 2020.
- EDENBERG, H. J.; GELERNTER, J.; AGRAWAL, A. Genetics of Alcoholism. **Current Psychiatry Reports**, 2019.
- EGGERT, J.; THEOBALD, H.; ENGFELDT, P. Effects of alcohol consumption on female fertility during an 18-year period. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 2, p. 379–383, 2004.
- FADDY, M. J.; GOSDEN, R. G. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. **Human Reproduction**, v. 10, p. 770 – 775, 1995.
- FAN, D.; LIU, L.; XIA, Q. Female alcohol consumption and fecundability: a systematic review and dose-response meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.
- FANG, L.; LI, Y.; WANG, S.; LI, Y.; CHANG, H.M.; YI, Y.; YAN, Y.; THAKUR, A.; LEUNG, P.C.K.; CHENG, J.C.; SUN, Y.P. TGF- β 1 induces VEGF expression in human granulosa-lutein cells: a potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 3, p. 450-460, 2020.
- FINELLI, R.; MOTTOLA, F.; AGARWAL, A. Impact of alcohol consumption on male fertility potential: a narrative review. **Environmental Health Research**, v. 19, p. 328, 2021
- FIORAVANTE, V. C.; GODOI, A. R.; CAMARGO, V. M. D. B.; PINHEIRO, P. F. F.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C. R.; MARTINEZ, F. E. Low and high postpubertal ethanol use: damage on adulthood reproduction and offspring. **Reproduction and Fertility**, v. 28, p.141 – 51, 2022.
- FIORAVANTE, V. C.; GODOI, A. R.; CAMARGO, V. M. B.; DO NASCIMENTO, R. S.; PINHEIRO, P. F. F.; MARTINEZ, F. E. Parents ethanol use impairs ethanol-naïve offspring development and reproduction. **Reproduction**, v. 161, p. 195-204. 2021.
- FISCHER, M.B.; LJUBICIC, M.L.; HAGEN, C.P.; THANKAMONY, A.; ONG, K.; HUGHES, I.; JENSEN, T.K.; MAIN, K.M.; PETERSEN, J.H.; BUSCH, A.S.; UPNERS, E.N.; SATHYANARAYANA, S.; SWAN, S.H.; JUUL, A. Anogenital Distance in Healthy Infants: Method-, Age- and Sex-related Reference Ranges. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 105, p. 2996–3004, 2020.

- FONTELLES, C.C.; CARNEY, E.; CLARKE, J.; NGUYEN, N.M.; YIN, C.; JIN, L.; CRUZ, M.I.; ONG, T.P.; HILAKIVI-CLARKE, L.; DE ASSIS, S. Paternal overweight is associated with increased breast cancer risk in daughters in a mouse model. **Scientific Reports**, v. 24, 2016.
- FORQUER, M.R.; HASHIMOTO, J.G.; ROBERTS, M.L.; WIREN, K.M. Elevated testosterone in females reveals a robust sex difference in altered androgen levels during chronic alcohol withdrawal. **Alcohol**, v. 45, p.161-71, 2011.
- FURTH, P.A.; WANG, W.; KANG, K.; ROONEY, B.L.; KEEGAN, G.; MURALIDARAN, V.; WONG, J.; SHEARER, C.; ZOU, X.; FLAWS, J.A. Overexpression of Estrogen Receptor α in Mammary Glands of Aging Mice Is Associated with a Proliferative Risk Signature and Generation of Estrogen Receptor α -Positive Mammary Adenocarcinomas. **The American Journal of Pathology**, v.193, p. 103-120, 2023.
- GABRIELSEN, J. S.; TANRIKUT, C. Chronic exposures and male fertility: the impacts of environment, diet, and drug use on spermatogenesis. **Andrology**, v. 4, n.4, p. 648–661, 2015.
- GALLAVAN, R.H.; HOLSON, J.F.; STUMP, D.G.; KNAPP, J.F.; REYNOLDS, V.L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weight. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 383-39, 1999.
- GANGISETTY, O.; CHAUDHARY, S.; PALAGANI, A., SARKAR, D. K. Transgenerational inheritance of fetal alcohol effects on proopiomelanocortin gene expression and methylation, cortisol response to stress, and anxiety-like behaviors in offspring for three generations in rats: Evidence for male germline transmission. **PLoS ONE**, v. 17, 2022.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASES (GBD). Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 392 1015-1035, 2018.
- GARDEBJER, E.M.; CUFFEE, J.S.M.; PANTALEON, M.; WLODEK, M.E.; MORITZ, K.M. Periconceptional alcohol consumption causes fetal growth restriction and increases glycogen accumulation in the late gestation rat placenta. **Placenta**, v. 35, p. 50-57, 2014.
- GAPP, K.; JAWAID, S.; SARKIES, P.; BOHACEK, J.; PELCZAR, P.; PRADOS, J.; FARINELLI, P.; MISKA, E.; MANSUY, I.M. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. **Nature Neuroscience**, v. 17, p. 667-669, 2014.
- GRIMBLE, F. Cytokines: Nutritional Aspects. Benjamin Caballero, Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition), Academic Press, p. 423-429. 2013.
- GAYTAN, F.; MORALES, C.; LEON, S. Development and validation of a method for precise dating of female puberty in laboratory rodents: The puberty ovarian maturation score (Pub-Score). **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- GUO, Y.; LIU, M.; MFOUNDOU, J.D.L.; WANG, X. Expression and distribution patterns of VEGF, TGF- β_1 and HIF-1 α in the ovarian follicles of Tibetan sheep. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, p. 2223-2229, 2022.
- GUTHERZ, O.R.; DEYSSENROTH, M., LI, Q.; HAO, K.; JACOBSON, J.L.; CHEN, J.; JACOBSON, S.W.; CARTER, R.C. Potential roles of imprinted genes in the teratogenic effects of alcohol on the placenta, somatic growth, and the developing brain. **Experimental Neurology**, 2022.
- HAO, X.; ANASTÁCIO, A.; LIU, K.; RODRIGUEZ-WALLBERG, K.A. Ovarian Follicle Depletion Induced by Chemotherapy and the Investigational Stages of Potential Fertility-Protective Treatments-A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 4720, 2019.
- HAN, M.; PARK, S.B.; PARK, B.J. Lower growth factor expression in follicular fluid undergone in-vitro fertilization. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 38, n. 4, p. 210-215, 2011.
- HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental Origins of Health and Disease: New Insights. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 90-93, 201, 2008.
- HARRINGTON, B.S.; ANNUNZIATA, C.M. NF- κ B Signaling in Ovarian Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 11, p.1182, 2019.
- HOCHBERG, Z.; FEIL, R.; CONSTANCIA, M.; FRAGA, M.; JUNIEN, C.; CAREL, J.C.; BOILEAU, P.; LE BOUC, Y.; DEAL, C.L.; LILLYCROP, K. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. **Endocrine Reviews**, v. 32, p. 159-224, 2011.
- HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, 2013.
- INGMAN, W. V.; ROBERTSON, S. A. The essential roles of TGFB1 in reproduction. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 20, n.3, p. 23- 239, 2009.
- JABBAR, S.; CHASTAIN, L.; GANGISETTY, O.; CABRERA, M.A.; SOCHACKI, K.; SARKAR, D.K. Preconception alcohol increases offspring vulnerability to stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 2782-2793, 2016
- JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S.R. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. **Cell Cycle**, v. 5, n. 11, p1178-83, 2006.
- JANA, K.; JANA, N.; KUMAR, D.; GUHA, S.H. Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of fas/fas-l, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. **Molecular Reproduction & Development**, v. 7, p. 820-833, 2010.
- JENSEN, T. K.; GOTTSCHAU, M.; MADSEN, J. O. B.; ANDERSSON, A. M.; LASSEN, T. H.; SKAKKEBAEK, N. E.; SWAN, S. H.; PRISKORN, L.; JUUL, A.; JORGENSEN, N. Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. **British Medical Journal Open**, 2014.

- JOSHI, P.A.; JACKSON, H.W.; BERISTAIN, A.G. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. **Nature**, v. 465, p. 803-807, 2010.
- KACZMAREK, M.M.; SCHAMS, D.; ZIECIK, A.J. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. **Reproductive Biology**, v 5, n. 2, p.111-36, 2005.
- KAM, R. L.; BERNHARDT, S. M.; INGMAN, W. V.; AMIR, L. H. Modern, exogenous exposures associated with altered mammary gland development: A systematic review. **Early Human Development**, v. 156, 2021.
- KAMINEN-AHOLA, N.; AHOLA, A., MAGA, M.; MALLITT, K. A.; FAHEY, P., COX, T. C.; WHITELA, W. E., CHONG, S. Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. **PLoS Genetic**, v. 15, n. 6, 2010.
- KANAKA-GANTENBEIN, C.; MASTORAKOS, G.; CHROUSOS, G.P. Endocrine-Related Causes and Consequences of Intrauterine Growth Retardation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, p. 150-157, 2003.
- KHAN, H. A.; KHAN, I.; LEE, Y. Chapter 15 - Role of immune factors in bioavailability and toxicity of carbon nanomaterials, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Fullerenes, Graphenes and Nanotubes, William Andrew Publishing, p. 601-630, 2018.
- KIND, K.L.; MOOR, E V.M.; DAVIES, M.J. Diet around conception and during pregnancy-effects on fetal and neonatal outcomes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, p. 532-541, 2006.
- KLAstrup, L.K.; BAK, S.T.; NIELSEN, A.L. The influence of paternal diet on sncRNA-mediated epigenetic inheritance. **Genomic & Molecular Genetics**, v. 294, p. 1-11, 2019.
- KNEE, D.S.; SATO, A.K.; UYEHARA, C.F.T.; CLAYBAUGH, J.R. Prenatal exposure to ethanol causes partial diabetes insipidus in adult rats. **American Journal of Physiology**, v. 287, p. 277-283, 2004.
- KNEZOVICH, J.G.; RAMSAY, M. The effect of preconception paternal alcohol exposure on epigenetic remodeling of the h19 and rasgrf1 imprinting control regions in mouse offspring. **Frontiers in Genetics**, v. 22, 2012.
- KONG, E. Q. Z.; SUBRAMANIYAN, V.; LUBAU, N. A. Uncovering the impact of alcohol on internal organs and reproductive health: Exploring TLR4/NF-kB and CYP2E1/ROS/Nrf2 pathways. **Animals models and experimental medicine**. 2024
- KUCHERIA, K.; SAXENA, R.; MOHAN, D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. **Andrologia**, v. 17, n.6, p.558-63, 1985.
- KUSUYAMA, J.; ALVES-WAGNER, A.B.; MAKAREWICZ, N.S.; GOODYEAR, L.J. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. **Nature Metabolism**, v. 2, p.858-872, 2020.
- KUO, S.W.; KE, F.C.; CHANG, G.D.; LEE, M.T.; HWANG, J.J. Potential role of follicle-stimulating hormone (FSH) and transforming growth factor (TGFbeta1) in the regulation of ovarian angiogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, p.1608-1619, 2011.
- LAMONT, M.G.; MCCALLUM, P.; HEAD, N. Binge drinking in male adolescent rats and its relationship to persistent behavioral impairments and elevated proinflammatory/proapoptotic proteins in the cerebellum. **Psychopharmacology**, v. 237, p. 1305-1315, 2020.
- LANE, M.; ROBKER, R.L.; ROBERTSON, S.A. Parenting from before conception. **Science**, v. 345, p. 756-760, 2014.
- LEE, Y. J.; KIM, J.Y.; LEE, D.Y. Alcohol consumption before pregnancy causes detrimental fetal development and maternal metabolic disorders. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.
- LEE, A.; CHRISTENSON; L.K.; STOUFFER, R.L.; BURRY, K.A.; PATTON, P.E. Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 68, p.305-311,1997.
- LILLYCROP K.A.; BURDGE, G.C. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals. **Epigenomics**, v. 6, p. 623-36, 2014.
- LIANG, F.; DIAO, L.; LIU, J.; JIANG N.; ZHANG, J.; WHANG, H.; ZHOU W.; HUANG G.; MA D. Paternal ethanol exposure and behavioral abnormalities in offspring: associated alterations in imprinted gene methylation. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 126-33, 2014.
- LIU, T., CUI, YQ., ZHAO, H. High levels of testosterone inhibit ovarian follicle development by repressing the FSH signaling pathwa. **Sci. Technol**, v. 35, p. 723-729, 2015.
- LUO, X.; XU, J.; ZHAO, R.; QIN, J.; WANG, X.; YAN, Y.; WANG, L.J.; WANG, G.; YANG, X. The Role of Inactivated NF-κB in Premature Ovarian Failure. **The American Journal of Pathology**, v. 192, n.3, p. 468-483, 2022.
- LUNDE, A.; MELVE, K.K.; GJESSING, H.K.; SKJAERVEN, R.; IRGENS, L.M. Genetic and Environmental Influences on Birth Weight, Birth Length, Head Circumference, and Gestational Age by Use of Population-based Parent-Offspring Data. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 7; p.734-741, 2007.
- MACON, M.B.; VILLANUEVA, L.R.; TATUM-GIBBS, K.; ZEHR, R.D.; STRYNAR, M.J.; STANKO, J.P.; White, S.S.; Helfant, L.; Fenton, S.E. Prenatal perfluorooctanoic acid exposure in CD-1 mice: low-dose developmental effects and internal dosimetry. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 1, p.134-45. 2011.
- MAHNKE, A.H.; MIRANDA, R.C.; HOMANICS, G.E. Epigenetic mediators and consequences of excessive alcohol consumption. **Alcohol**, v. 60, p. 1-6, 2017.
- MARCINIAK, A., PATRO-MALYSZA, J., KIMBER-TROJNAR, Ż., MARCINIAK, B., OLESZCZUK, J.; LESZCZYŃSKA-GORZELAK, B. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, p. 133-138. 2017.

- MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N.; HEDERRA, A. Heredity of experimental alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v.4, p. 1-2, 1953.
- MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELMI, N. Thirty-two years of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 5, p. 171-178, 1983.
- MASEMOLA, M. L.; MERWE, L. V.; LOMBARD, Z.; VILJOEN, D.; RAMSAY, M. Reduced DNA methylation at the PEG3 DMR and KvDMR1 loci in children exposed to alcohol in utero: a South African Fetal Alcohol Syndrome cohort study. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-12, 2015.
- MCNALLY, S.; STEIN, T. Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. **Methods Mol Biol**, v. 1501, p. 1-17, 2017.
- MENDES, L. O.; AMORIM, J. P. A.; TEIXEIRA, G. R.; CHUFFA, L. G. A.; FIORUCI, B. A.; PIMENTEL, T. A.; MELLO JR, W.; PADOVANI, C. R.; PEREIRA, S.; MARTINEZ, M.; PINHEIRO, P. F. F.; OLIANI, S. M.; MARTINEZ, F. E. Mast cells and ethanol consumption: interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB Rats, **American journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. 3, p.170-8, 2011.
- MENDIOLA, J.; ROCA, M.; MÍNGUEZ-ALARCÓN, L. Anogenital distance is related to ovarian follicular number in young Spanish women: a cross-sectional study. **Environment Health**, v. 11, p. 90, 2012.
- MENDIOLA, J.; SÁNCHEZ-FERRER, M.L.; JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, R.; CÁNOVAS-LÓPEZ, L.; HERNÁNDEZ-PEÑALVER, A.I.; CORBALÁN-BIYANG, S.; CARMONA-BARNOSI, A.; PRIETO-SÁNCHEZ, M.T.; NIETO, A.; TORRES-CANTERO, A.M. Endometriomas and deep infiltrating endometriosis in adulthood are strongly associated with anogenital distance, a biomarker for prenatal hormonal environment. **Human Reproduction**, v. 31, p. 2377–2383, 2016.
- MONTESINOS, J.; PASCUAL, M.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J.; GUERRI, C. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 53, p.159-171. 2016.
- MUELLER, S. M.; CLARK, J. A.; MYERS, P. H.; KORACH, H. S. Mammary Gland Development in Adult Mice Requires Epithelial and Stromal Estrogen Receptor α . **Endocrinology**, v.143, p. 2357–2365, 2002.
- MOHR, M.A.; KESHISHIAN, T.; FALCY, B.A.; LAHAM, B.J.; WONG, A.M.; MICEVYCH, P.E. Puberty enables oestradiol-induced progesterone synthesis in female mouse hypothalamic astrocytes. **Journal Neuroendocrinology**, v. 34, n. 6, 2022.
- MURILLO-FUENTES, L.; ARTILLO, R.; CARRERAS, O.; MURILLO, L. Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. **European Journal of Nutrition**, v. 40, n. 4, p. 147–154, 2001.
- MUTHUSAMI, K. R.; CHINNASWAMY, P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 4, p. 919-924, 2005.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH *et al.* National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Drinking Levels Defined. 2016.
- OJEDA, S. R. & LOMNICZI, A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. **Nature Review Endocrinology**, v. 10, p. 67–69, 2014.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1987.
- OREMOSU, A.; AKANG, E. Impact of Alcohol on Male Reproductive Hormones, Oxidative Stress and Semen Parameters in Sprague-Dawley Rats. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 11, 2015.
- OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**, v. 427, p. 411-412, 2004.
- ÖZTÜRK, H.N.O.; TÜRKER, P.F. Fetal programming: could intrauterine life affect health status in adulthood? **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 4, n. 6, p.473-483,2021.
- PAJARINEN, J. T.; KARHUNEN, P. J. Spermatogenic arrest and 'Sertoli cell-only' syndrome-common alcohol-induced disorders of the human testis. **Internacional Journal of Andrology**, v. 7, n.6, p. 292-299, 1994.
- PATRICK, M. E.; TERRY-MCELRAITH, Y. M.; BONAR, E. E. Patterns and predictors of high-intensity drinking and implications for intervention. **Psychology of Addictive Behaviors**, v. 36, p. 581–594, 2022.
- PFINDER, M.; LIEBG, S.; FELDMANN, R. Adolescents' Use of Alcohol, Tobacco and Illicit Drugs in Relation to Prenatal Alcohol Exposure: Modifications by Gender and Ethnicity. **Alcohol and Alcoholism**, v. 49, n. 2, p. 143–153, 2014.
- PICUT, C. A.; DIXON, D.; SIMONS, M.L.; STUMP, D.G.; PARKER, G.A.; REMICK, A.K. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 3, n. 3, p. 343-353, 2015.
- PIPREK, R.P. Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Springer: New York, v. 58, 2016.
- POLANCO, T.A; CRISMALE-GANN, C.; REUHL, K.R.; SARKAR, D.K.; COHICK, W.S. Fetal alcohol exposure increases mammary tumor susceptibility and alters tumor phenotype in rats. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, v. 4, n. 11, p.1879-1887, 2010.
- POPOVA, S.; CHARNESS, M.E.; BURD, L. Fetal alcohol spectrum disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 11, 2023.
- PRZYBYCIEN-SZYMANSKA, M. M.; MOTT, N. N.; PAUL, C. R.; GILLESPIE, R. A.; PAK, T. R. Binge-Pattern Alcohol Exposure during Puberty Induces Long-Term Changes in HPA Axis Reactivity. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011.

- 1798 RAGHUNATHACHAR SAHANA K.; AKILA, P.; PRASHANT, V.; SHARATH CHANDRA, B., NATARAJ
1799 SUMA, M. Quantitation of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 in Different Stages of Breast
1800 Cancer. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p.33-39, 2017.
- 1801 RANDO, O.J.; SIMMONS, R.A.I'm Eating for Two: Parental Dietary Effects on Offspring Metabolism. **Cell**, v. 161,
1802 p. 93-105, 2015.
- 1803 REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.;
1804 &PATRA, J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use
1805 disorders. **The Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2223–2233, 2009.
- 1806 ROBERTSON; A.S.Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Reserch**,
1807 v. 322, p. 43-52, 2005.
- 1808 ROBKER, R.L., AKISON, L.K., BENNETT, B.D., THRUPP, P.N., CHURA, L.R., RUSSELL, D.L. Obese Women
1809 Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight
1810 Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, p. 1533 - 1540, 2009.
- 1811 ROSSI, B. V.; BERRY, K. F.; HORNSTEIN, M. D.; CRAMER, D. W.; EHRLICH, S.; MISSMER, S. A.Effect of
1812 Alcohol Consumption on In Vitro Fertilization. **Obstetrics & Gynecology**, v. 117, n.1, p.136 - 142, 2011.
- 1813 RUSSO J. Significance of rat mammary tumors for human risk assessment. *Toxicol Pathol.* 2015
- 1814 RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Development of the human breast. *Maturitas*, v. 1, p. 2-15, 2004.
- 1815 Russo, J.; Tay, L.K.; Russo, I.H. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. **Breast**
1816 **Cancer Research Treatment**, v. 2, p. 5-73, 1982.
- 1817 SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L.U.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.;
1818 CASTRO, E.; PAULA, L.A.; SALES, J.N.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy
1819 of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction**
1820 **Science**, v. 118, p. 182-187, 2010.
- 1821 SAVANT, S. S.; SRIRAMKUMAR, S.; O'HAGAN, H.M. The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in
1822 the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. **Cancers**, v. 10, n. 8,
1823 p. 251. 2018.
- 1824 SMART, J.L.; DA SILVA, V.A.; MALHEIROS, L.R.; PAUMGARTTEN, F.J.; MASSEY, R.F. Epidermal growth
1825 factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **The Journal of Physiology**,
1826 v. 11, p. 153-158, 1989.
- 1827 SÁNCHEZ-FERRER, M.L.; JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, R.; MENDIOLA, J.; PRIETO-SÁNCHEZ, M.T.;
1828 CÁNOVAS-LÓPEZ, L.; CARMONA-BARNOSI, A.; CORBALÁN-BIYANG, S.; HERNÁNDEZ-PEÑALVER,
1829 A.I.; ADOAMNEI, E.; NIETO, A.; TORRES-CANTERO, A.M. Accuracy of anogenital distance and anti-Müllerian
1830 hormone in the diagnosis of endometriosis without surgery. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.
1831 144, p. 90-96, 2019.
- 1832 SANSONE, A.; DI DATO, C.; DE ANGELIS, C.; MENAFRA, D.; POZZA, C.; PIVONELLO, R.; ISIDORI,
1833 A.; GIANFRILLI, D. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. **Reproductive Biology and**
1834 **Endocrinology**, v. 16, n. 3, 2018.
- 1835 SARKOLA, T.; FUKUNAGA, T.; MÄKISALO, H. ACUTE EFFECT OF ALCOHOL ON ANDROGENS IN
1836 PREMENOPAUSAL WOMEN, **Alcohol and Alcoholism**, v. 35, p. 84–90, 2000.
- 1837 SASAKI, M.; IKEDA, H.; SATO, Y.; NAKANUMA, Y. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of
1838 biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study, **Free Radical**
1839 **Research**, v. 42, n. 7, p. 625–632, 2008.
- 1840 SEBASTIANI, G.; BORRÁS-NOVELL, C.; CASANOVA, M.A.; PASCUAL TUTUSAUS, M.; FERRERO
1841 MARTÍNEZ, S.; GÓMEZ ROIG, M.D.; GARCÍA-ALGAR, O. The Effects of Alcohol and Drugs of Abuse on
1842 Maternal Nutritional Profile during Pregnancy. **Nutrients**, v. 10, p. 1-17, 2018.
- 1843 SEOW, W.K. A study of the development of the permanent dentition in very low birthweight children. **Pediatric**
1844 **Dentistry Journal**, v. 18, p. 379-384, 1996.
- 1845 SENGUPTA, P.; DUTTA, S.; KRAJEWSKA-KULAK, E. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published
1846 Between 1980 and 2015. **American Journal of Men's Health**, v. 11, n. 4, p. 1279–1304, 2016.
- 1847 SERRA, R.; CROWLEY, M.R.; CLEVINGER, C. TGF-beta in mammary gland development and breast câncer.
1848 **Breast Disase**
1849 , v. 18, p. 61–73, 2003
- 1850 SHARLIP, I. D.; JAROW, J. P.; BELKER, A. M.; LIPSHULTZ, L. I.; SIGMAN, M.; THOMAS, A. J.; SCHLEGEL,
1851 P. N.; HOWARDS, S. S.; NEHRA, A.; DAMEWOOD, M.D.; OVERSTREET, J. W.; SADOVSKY, R. Best practice
1852 policies for male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 77, n.5, p. 873–882, 2002.
- 1853 SHARMA, U.; RANDO, O. J. Metabolic Inputs into the Epigenome. **Cell Metabolism**, v. 25, p. 544–558, 2017.
- 1854 SILBERSTEIN, G. B.; DANIEL, C. W. Reversible Inhibition of Mammary Gland Growth by Transforming Growth
1855 Factor-β. **Science**, v. 237, p 291-293, 1987.
- 1856 SILVA, A. V.; RONALDO LARANJEIRA, M.; DOLNIKOFF, H.; GRINFELD, J. M. Alcohol consumption during
1857 pregnancy and newborn outcome: A study in Brazil. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v. 3, n. 2, p.169-
1858 172, 1981.

- 1859 SINKEVICIUS, K.W.; WOLOSZYN, K.; LAINE, M.; JACKSON, K.S.; GREENE, G.L.; WOODRUFF, T.K.;
 1860 BURDETTE, J.E. Characterization of the ovarian and reproductive abnormalities in prepubertal and adult estrogen
 1861 non-responsive estrogen receptor alpha knock-in (ENERKI) mice. **Steroid**, v. 74, n.19, p. 913-919, 2009.
 1862 SRIVASTAVA, V. K.; HINEY, J. K.; DEES, W. L. Alcohol Delays the Onset of Puberty in the Female Rat by
 1863 Altering Key Hypothalamic Events. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 42, n. 7, p. 1166–1176,
 1864 2018.
 1865 STANKO, J. P.; KISSLING, G.E.; CHAPPELL, V.A.; FENTON, S.E. Differences in the Rate of in Situ Mammary
 1866 Gland Development and Other Developmental Endpoints in Three Strains of Female Rat Commonly Used in
 1867 Mammary Carcinogenesis Studies: Implications for Timing of Carcinogen Exposure. **Toxicologic Pathology**, v. 44,
 1868 n. 7, p. 1021-1033. 2016.
 1869 STEPHENS, S.B.; TOLSON, K.P.; ROUSE, M.L.; POLING, M.C.; HASHIMOTO-PARTYKA, M.K.; MELLON,
 1870 P.L. Absent Progesterone Signaling in Kisspeptin Neurons Disrupts the LH Surge and Impairs Fertility in Female
 1871 Mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 9, p.3091–3097, 2015.
 1872 SURI, L.; GAGARI, E.; VASTARDIS, H. Delayed tooth eruption: pathogenesis, diagnosis, and treatment. A literature
 1873 review. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 126, p. 432-445, 2004.
 1874 SWAN, S.H.; SATHYANARAYANA, S.; BARRETT, E.S.; JANSSEN, S.; LIU, F.; NGUYEN, R.H.; REDMON,
 1875 J.B. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. **Human Reproduction**, v. 30, p.963-972,
 1876 2015.
 1877 TANERI, P. E.; KIEFTE-DE JONG, J. C.; BRAMER, W. M.; DAAN, N. M. P.; FRANCO, O. H.; MUKA, T.
 1878 Association of alcohol consumption with the onset of natural menopause: a systematic review and meta-analysis.
 1879 **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 516–528, 2016.
 1880 TANG, Z.R.; ZHANG, R.; LIAN, Z.X.; DENG, S.L.; YU, K. Estrogen-Receptor Expression and Function in Female
 1881 Reproductive Disease. **Cells**, v. 8, n.101, p. 123, 2019.
 1882 TERASAKI, L.S.; SCHWARZ, J.M. Effects of Moderate Prenatal Alcohol Exposure during Early Gestation in Rats
 1883 on Inflammation across the Maternal-Fetal-Immune Interface and Later-Life Immune Function in the Offspring. **J**
 1884 **Neuroimmune Pharmacol**, v. 11, p. 680-692, 2016.
 1885 VAGLENOVA, J.; PETKOV, V. V. Fetal Alcohol Effects in Rats Exposed Pre- and Postnatally to a Low Dose of
 1886 Ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n.3, p. 691-103, 1998.
 1887 VANDERHYDEN, A.C.; MACDONALD, E.A.; NAGYOVA, E.; DHAWAN, A. Evaluation of members of the
 1888 TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis.
 1889 **Reproduction. Supplement**, v. 61, p. 55-70, 2003.
 1890 VARGHESE J, DAKHODE S. Effects of Alcohol Consumption on Various Systems of the Human Body: A
 1891 Systematic Review. **Cureus**, v. 8, 2022.
 1892 VATNER, S.F.; ZHANG, J.; OYDANICH, M.; BERKMAN, T.; NAFTALOVICH, R. VATNER, D.E. Healthful
 1893 aging mediated by inhibition of oxidative stress. **Ageing Research Reviews.**, v. 64, p.101-194, 2021.
 1894 VORONINA, E.; LOVASCO, L.A.; GYURIS, A.; BAUMGARTNER, R.A.; PARLOW, A.F.; FREIMAN, R.N.
 1895 Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit TAF4b.
 1896 **Developmental Biology**, v. 15, p. 715-26,2011.
 1897 WAINSTOCK, T.; SHOHAM-VARDI, I.; SHEINER, E.; WALFISCH, Fertility and anogenital distance in women.
 1898 **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 345–349, 2017.
 1899 WALKER, C.D.; DESCHAMPS, S.; PROULX, K.; TU, M.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B.; LUPIEN, S.;
 1900 GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness
 1901 to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29, p. 364-382, 2004.
 1902 WANG, L.; WANG, C.; JIN, S.; QU, D.; YING, H. Expression of NF-κB and PTEN in primary epithelial ovarian
 1903 carcinoma and the correlation with chemoresistance. **International Journal of Clinical and Experimental**
 1904 **Pathology**, v.8, n.9, 2015.
 1905 WILSNACK, S. C.; KLASSEN, A. D.; RICHARD, W. Drinking and Reproductive Dysfunction among Women in a
 1906 1981 National Survey. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 8, n. 5, p. 451- 458, 1984.
 1907 WOODWORTH, A. Contemporary Practice in Clinical Chemistry. **Laboratory testing in reproductive disorders**,
 1908 p. 759–774, 2020.
 1909 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World
 1910 Health Organization, p. 450, 2018.
 1911 YAN, F.; ZHAO, Q.; LI, Y. *et al.* The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. **J Ovarian Res**, v. 15, n.
 1912 100, 2022.
 1913 XIA, S.; ZHANG, X.; ZHENG, S.; KHANABDALI, R.; KALIONIS, B.; WU, J. An update on inflamm-aging:
 1914 mechanisms, prevention, and treatment. **Journal of Immunology Research**, 2016.
 1915 XIA, R.; JIN, L.; LI, D.; LIANG, H.; YANG, F.; CHEN, J.; YUAN, W.; MIAO, M. Association Between Paternal
 1916 Alcohol Consumption Before Conception and Anogenital Distance of Offspring. **Alcohol Clinical Experimental**
 1917 **Reserch**, v. 42, n. 4, p.735-742, 2018.
 1918 XIE, W.; SUN, H.; LI, X. *ET AL.* Ovarian cancer: epigenetics, drug resistance, and progression. **Cancer Cell Int**,
 1919 v. 21, p. 434. 2021.
 1920 ZAADSTRA, B. M.; LOOMAN, C. W. N.; TE VELDE, E. R.; HABBEMA, J. D. F.; KARBAAT, J. Moderate
 1921 drinking: no impact on female fecundity. **Fertility and Sterility**, v. 62, n.5, p. 948-954,1994.

- 1922 ZHAO, Y.; FENG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. V.; WANG, X.; LIU, D.; LIU, K. Current understandings of core
1923 pathways for the activation of mammalian primordial follicles. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1491, 2021.
- 1924 ZHANG, X.; SLIWOWSKA, J.H.; WEINBERG, J. Prenatal Alcohol Exposure and Fetal Programming: Effects on
1925 Neuroendocrine and Immune Function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 30, p. 376-388, 2005.
- 1926 ZHOU; Q.; SONG, L.; CHEN, J.; WANG, Q.; SHEN, H., ZHANG, S.; LI X. Association of Preconception Paternal
1927 Alcohol Consumption With Increased Fetal Birth Defect Risk. **JAMA Pediatr**, v. 175, n. 7, p. 742-743. 2021.
- 1928 ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res*, v. 35, p. 6-16, 2013.
- 1929 ZAPATERINI, J.R.; FONSECA, A.R.B.; BIDINOTTO L.T.; COLOMBELLI. K.T.; ROSSI, A.L.D.; KASS. L.;
1930 JUSTULIN, L.A.; BARBISAN, L.F. Maternal Low-Protein Diet Deregulates DNA Repair and DNA Replication
1931 Pathways in Female Offspring Mammary Gland Leading to Increased Chemically Induced Rat Carcinogenesis in
1932 Adulthood. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 1, 2022.
- 1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978

Apêndice

Parâmetros parentais

Avaliação da dieta e da massa corpórea antes do acasalamento

O consumo de ração e água e a massa corpórea foram mensurados semanalmente entre os DPN 65 – 100.

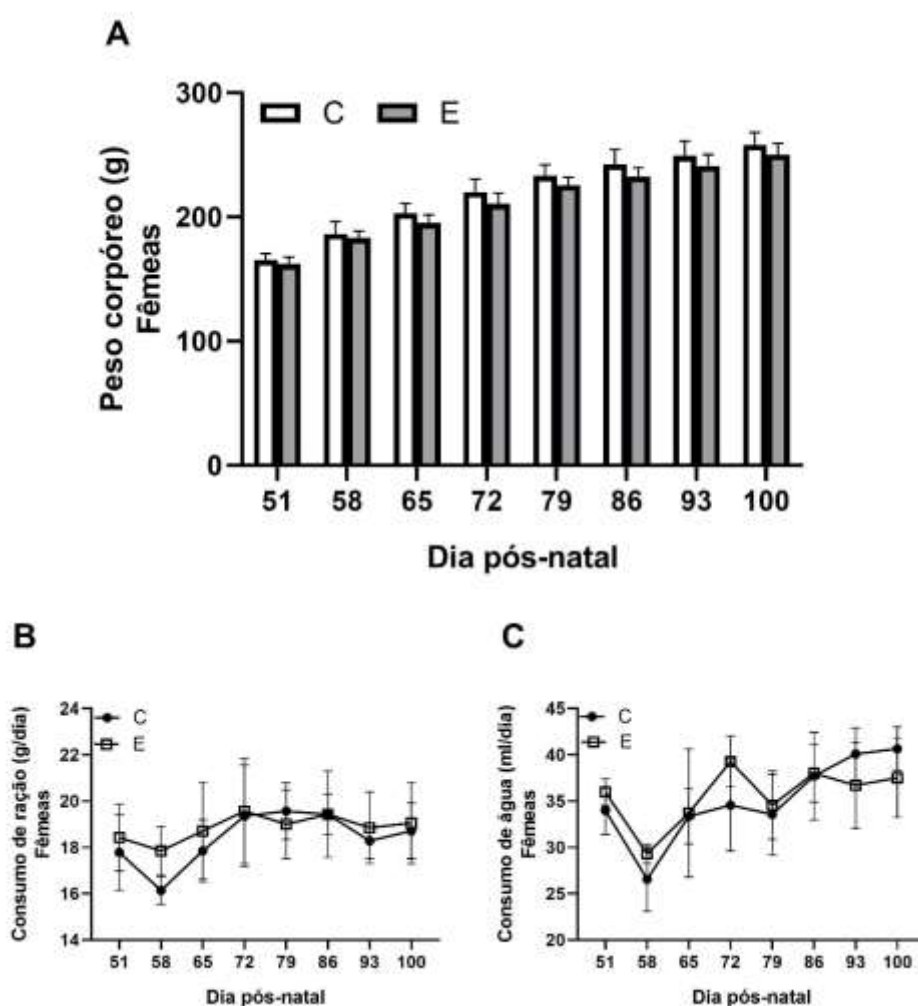


Figura 1. Peso corpóreo (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) antes do acasalamento das fêmeas que constituíram os grupos parentais.

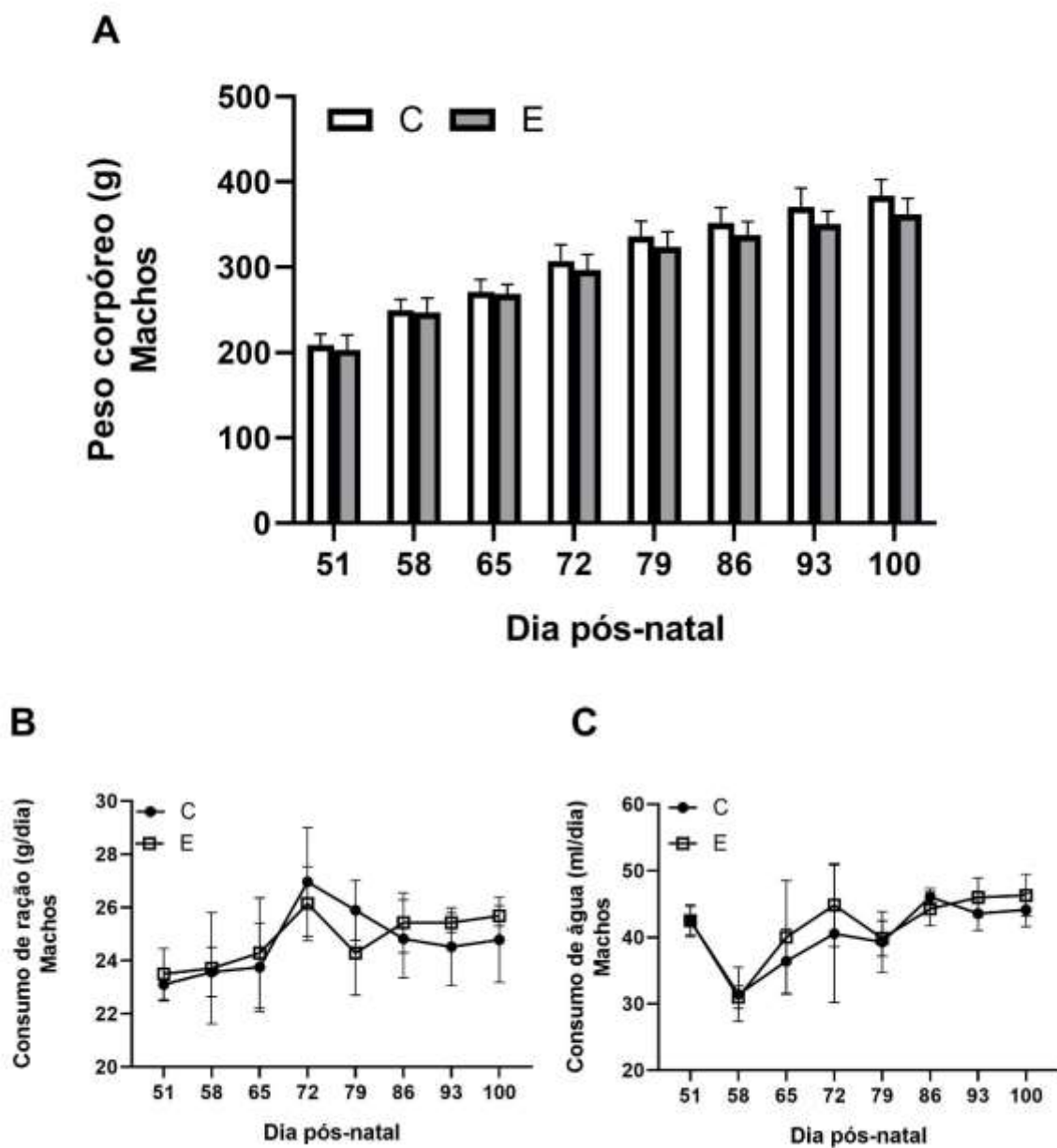


Figura 2. Peso corpóreo(A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) antes do acasalamento dos machos que constituíram os grupos parentais.

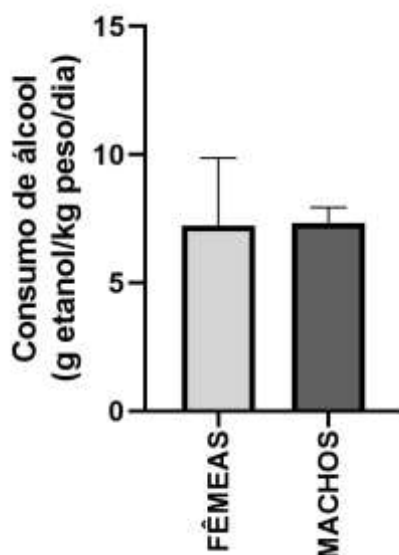


Figura 3. Média do consumo de etanol das fêmeas e machos do dia pós-natal 65 ao 80.

Consumo alimentar, eficiência alimentar (EA) e crescimento corpóreo gestacional e lactacional

O peso corpóreo e o consumo de ração e de água foram anotados semanalmente até o final da lactação. A eficiência alimentar foi validada pelo coeficiente de eficiência alimentar (CEA: $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Quantidade total de ração consumida}$) e ganho de peso para consumo calórico (GPPC: $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Quantidade total de quilocalorias consumida}$).

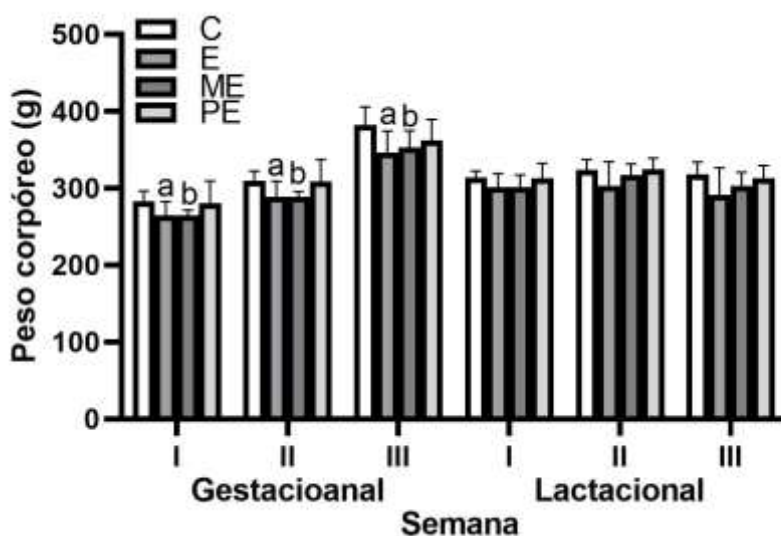


Figura 4. Peso corpóreo das mães dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) durante as semanas de gestação e lactação.

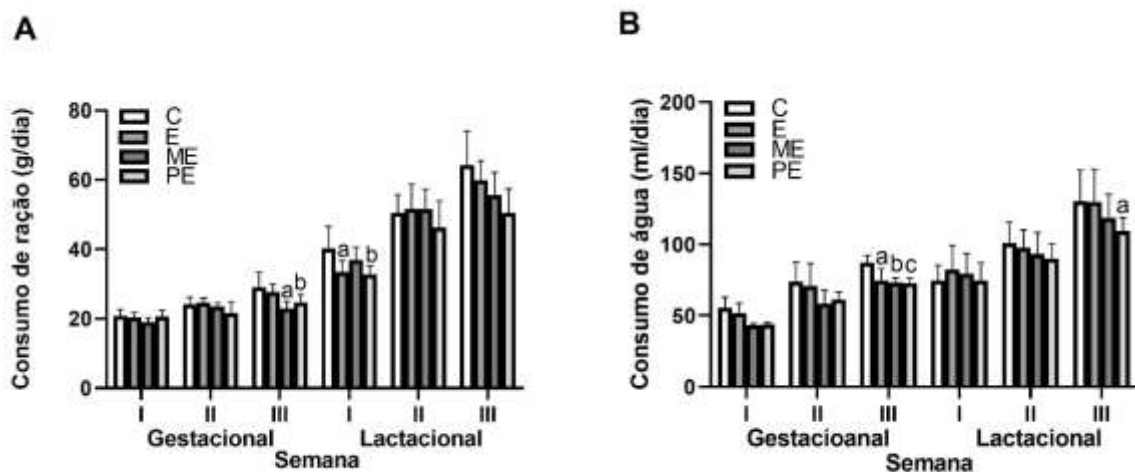


Figura 5. Consumo de ração (A) e água (B) das mães dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) durante a gestação e lactação.

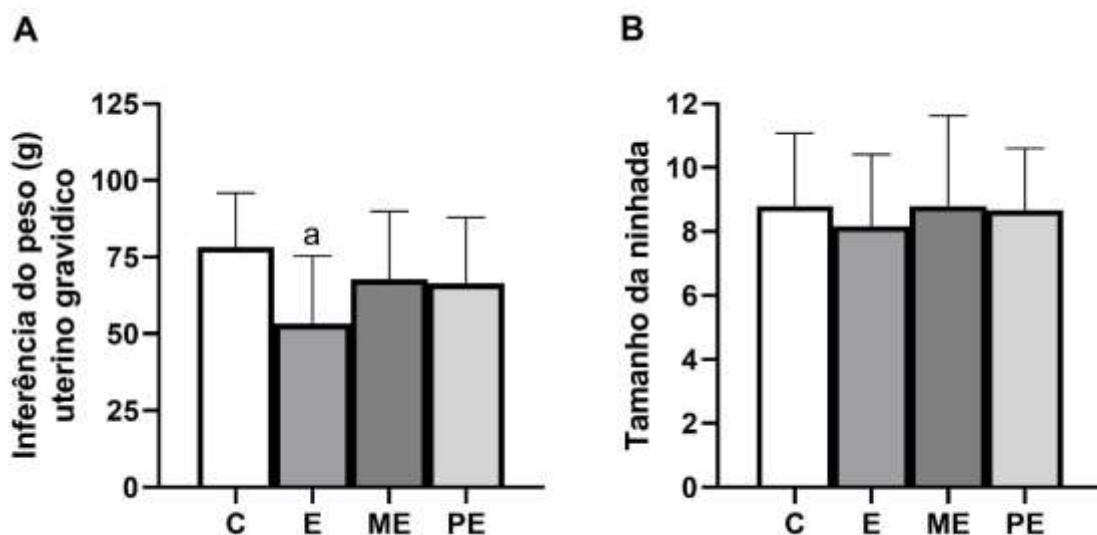


Figura 6. Inferência do útero gravídico dado pela subtração do peso no dia gestacional 21 e o peso no dia lactacional 1 (A) e tamanho da ninhada (B) das mães dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE).

Parâmetros da prole

Avaliação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms)

A idade de 300 dias, para o ovário, e 50 dias, para a glândula mamária, foram selecionadas para realização da proteômica. A extração de proteínas foi realizada em amostras previamente congeladas do ovário esquerdo (n = 5 / grupo) e mama esquerda (n = 5 / grupo). Para a extração de proteínas, 90 mg de tecido ovariano e 500 mg de tecido mamário foram diluídos em 300 µL e 1000 µL de tampão de lise A (7M Uréia, 2M Tiouréia e 40 mM de DTT), respectivamente, alocados em microtubos contendo *beads*, agitados em vórtex e homogeneizado no disruptor de células durante 30 s (dois ciclos de 15 s cada). Os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. Esse procedimento foi repetido durante 3 vezes. Após, o sobrenadante foi coletado em novos microtubos devidamente identificados e mantidos a -80° C. O precipitado (restos celulares) foi descartado. Para a quantificação proteica, os extratos de proteínas totais foram quantificados pela técnica de Bradford, utilizando como padrão a BSA, leitura de absorbância a 595 nm e duplicata para cada amostra (Bradford, 1976).

Para a análise proteômica, as amostras foram subdivididas em alíquotas de 50 µL, sendo adicionado o volume referente a 400 µg de proteínas e completado com AMBIC 50 mM para atingir 50 µL. Em seguida, a amostra foi transferida para um bloco aquecido (37°C) e incubada por 30 minutos. Após esse período, a amostra foi centrifugada (função pulso), adicionados DTT (ditiotreitól) na concentração de 5 mM na amostra (BioRad, cat# 161-0611) e agitado em vórtex. O tubo foi transferido para um bloco aquecido (37°C) e incubado por 40 min. Após esse período, a amostra permaneceu em temperatura ambiente por 2 min e foi centrifugado (função pulso). Iodoacetamida (IAA) na concentração de 10 mM (GE, cat# RPN 6302V) foi adicionada e agitado em vórtex. As amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, 40 µL de solução de tripsina (Promega, cat# V5280) em 50 mM AMBIC foi adicionado, procedendo-se para a digestão de proteínas a 37°C overnight de no mínimo 14 horas. Após, 10 µL de TFA 5% (Pierce, Part No. 53102, HPLC Grade, 10 x 1 mL) foi adicionado, agitado em vórtex e incubadas a 37 °C por 90 minutos. Os microtubos foram centrifugados em 14000 rpm a 6 °C por 30 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, dando início ao protocolo com as colunas Pierce C18Spin (Pierce, cat #89870). Após, a amostra foi seca, ressuspendida em acetonitrila 3% e ácido fórmico 0,1% e padrão e mantidas em -80 °C até iniciar a espectrometria de massas.

O espectrômetro de massas Xevo® G2 Q-TOF (G2 (Waters, Milford, MA) foi operado no modo de íon nano-eletro-spray positivo e os dados coletados usando o método MSE em energia elevada (19-45V), permitindo a aquisição dos dados dos íons precursores e fragmentos numa única injeção. As condições a fonte incluem tensão capilar, 2,8kV; cone de amostra, 40V; cone de

extração, 3.0 V e temperatura da fonte 100 °C. No entanto, as condições podem variar devido às configurações de tensão do detector e do *lock spray*. A aquisição dos dados ocorreu por 70 min com varredura na faixa de 50 - 1.500 Da. O *lockspray*, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi será operado com solução de [Glu1] fibrinopeptídeo (1 pmol / μ L), com fluxo de 0,5 μ L/min, como um íon de referência no modo positivo a uma relação m/z 785,8427. Todas as amostras foram injetadas em triplicata técnica.

A análise da interação proteína-proteína de proteínas específicas foi feita usando a Ferramenta de Pesquisa para Recuperação de Genes/Proteínas Interagindo (STRING), sendo as fontes de interação *Textmining*, *Experiments*, *Databases* e *Co-expression* selecionadas com confiança média (0.400) de interação.

A identificação das proteínas foi obtida pelo software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milford, MA) com algoritmo de contagem de íons incorporado ao software, utilizando a pesquisa no banco de dados da espécie *Rattus norvegicus* do catálogo UniProtKB (*Universal Protein Resource*) (<http://www.uniprot.org>). A diferença de expressão foi determinada pelo software com $p > 0,95$ para as proteínas supra reguladas. As comparações foram feitas em relação ao grupo Controle.

Diagrama de Venny

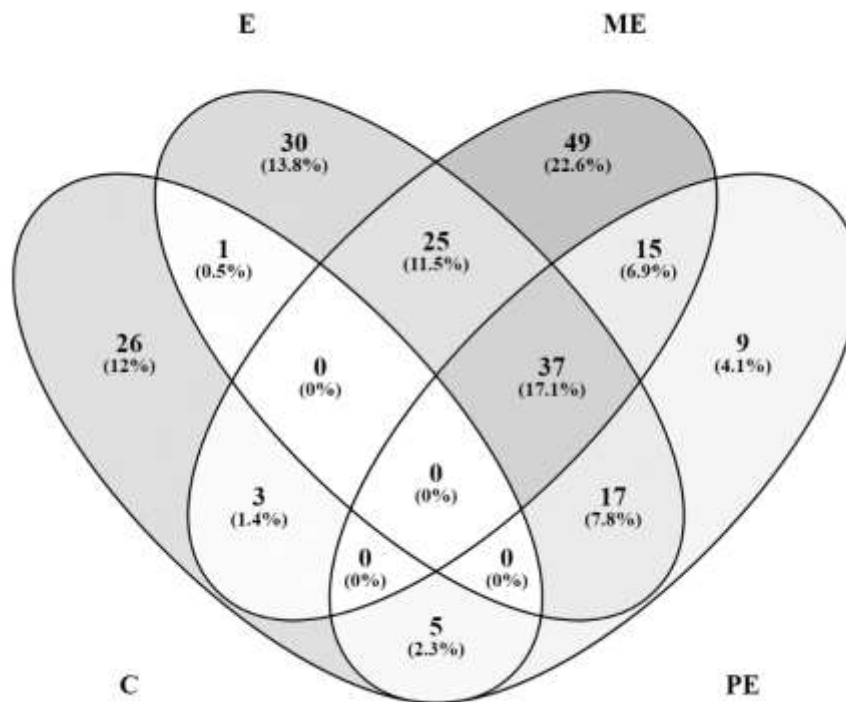


Figura 7. Diagrama de Venny das proteínas *up* reguladas, *down* reguladas e únicas do ovário da prole Controle (C), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 300.

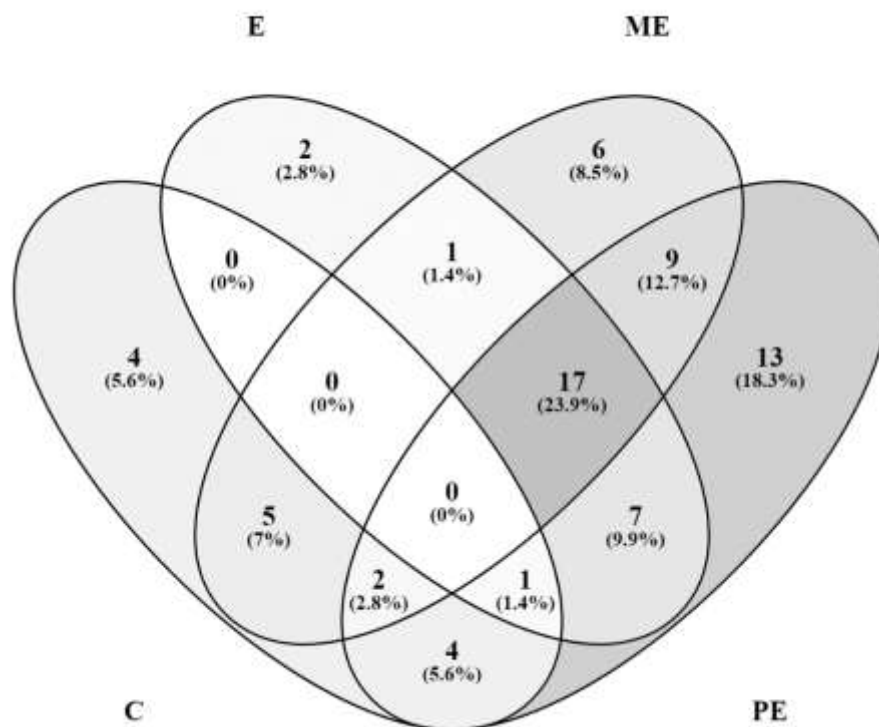


Figura 8. Diagrama de Venny das proteínas *up* reguladas, *down* reguladas e únicas da glândula mamária da prole Controle (C), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 50.

Rede de interação de proteínas- String

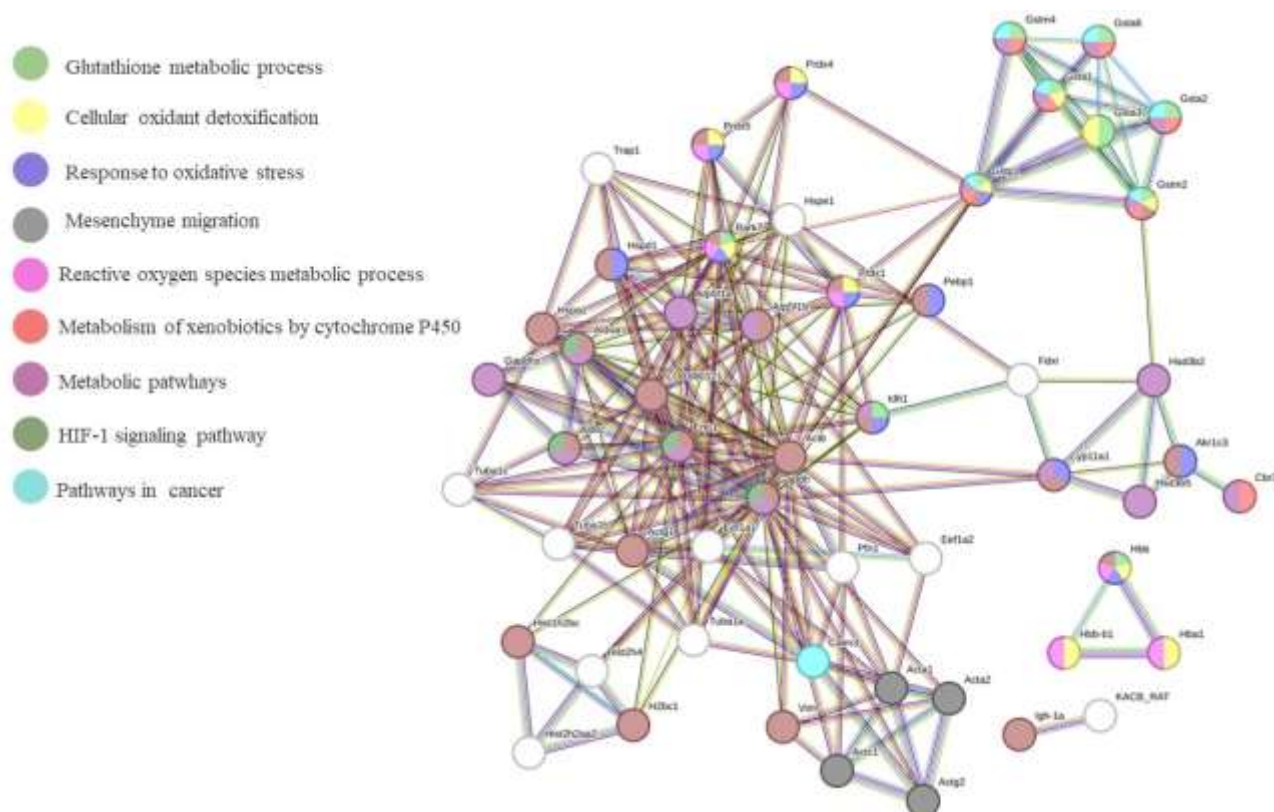
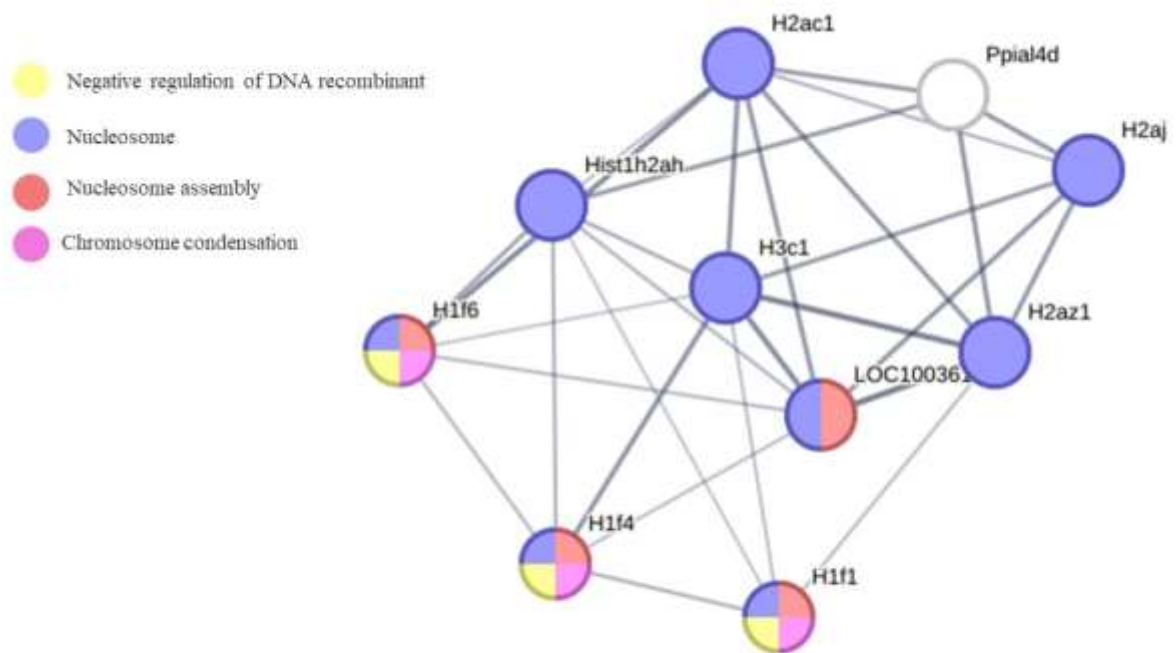


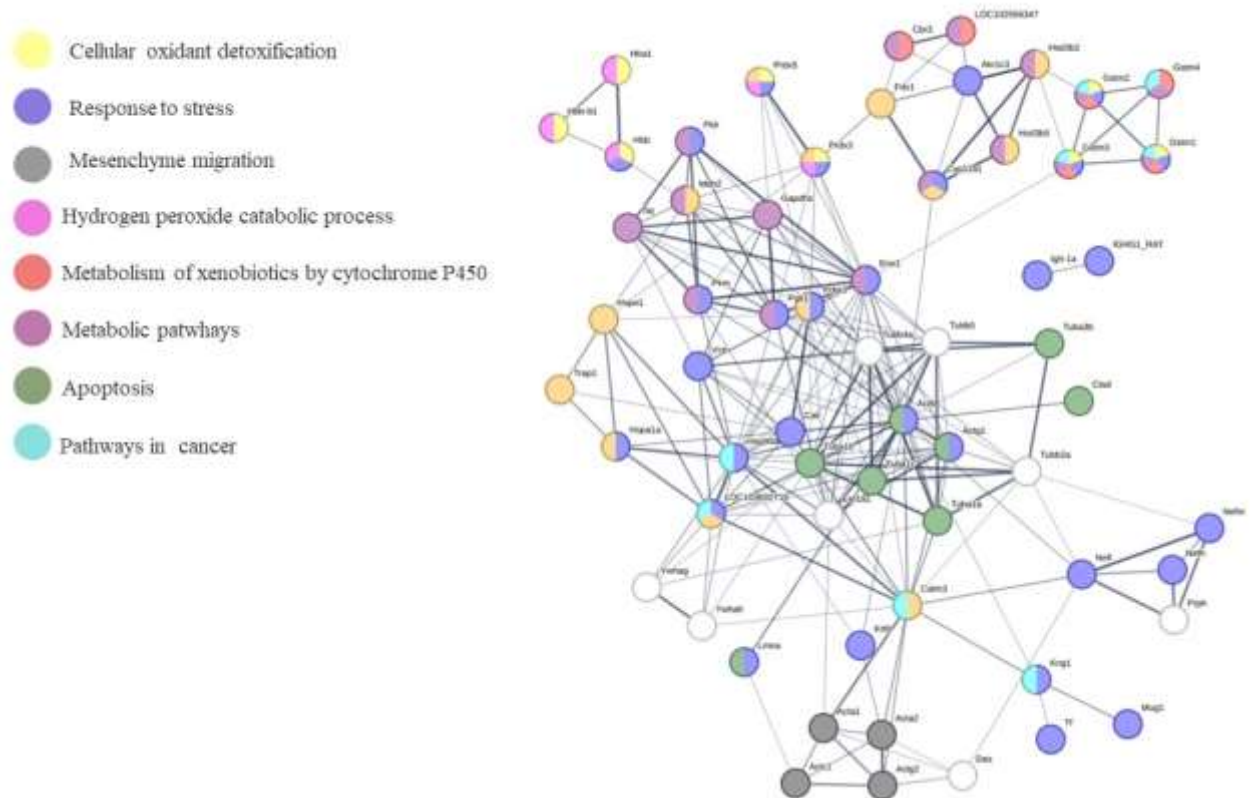
Figura 9. Proteínas do ovário *up* reguladas da prole Etanol em relação à Controle no DPN 300.



2084

2085 **Figura 10.** Proteínas do ovário *down* reguladas da prole Etanol em relação à Controle no DPN 300.

2086



2087

Figura 11. Proteínas do ovário *up* reguladas da prole Mãe Etanol em relação à Controle no DPN 300.

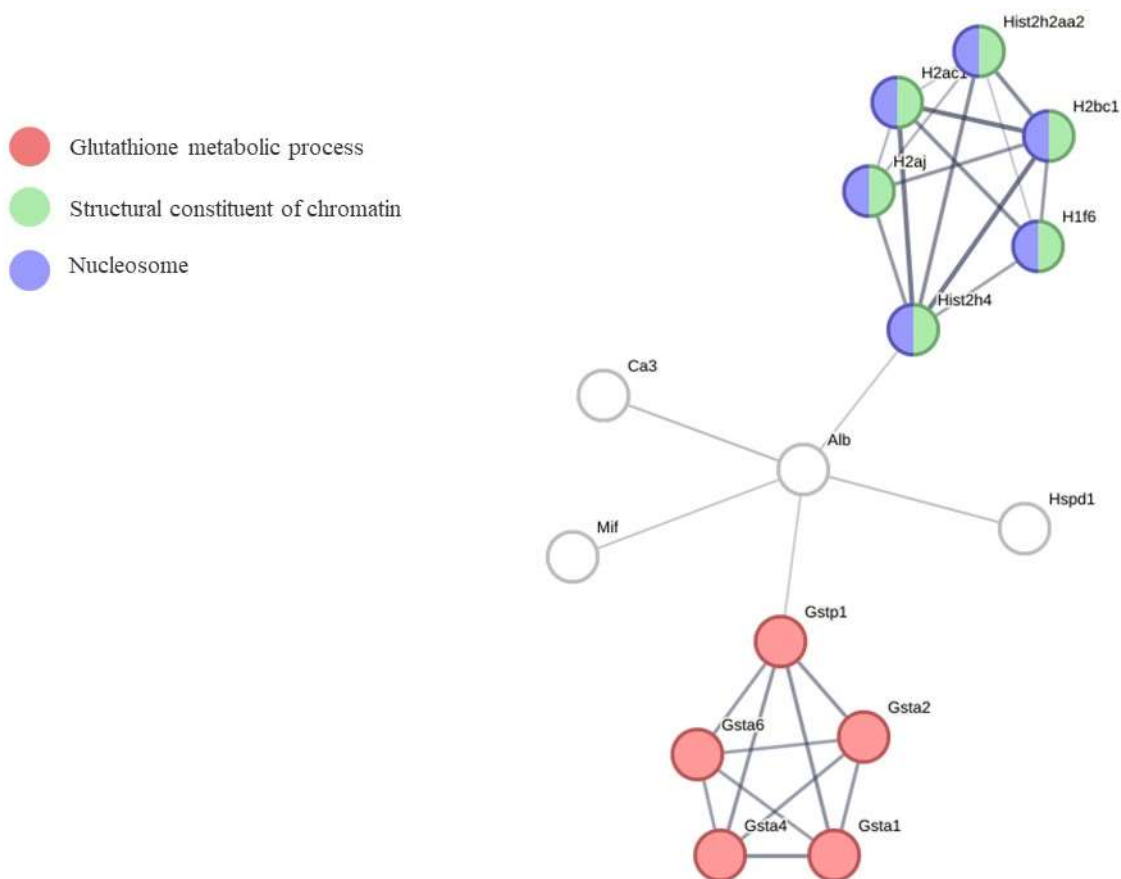


Figura 12. Proteínas do ovário *down* reguladas da prole Mãe Etanol em relação à Controle no DPN 300.

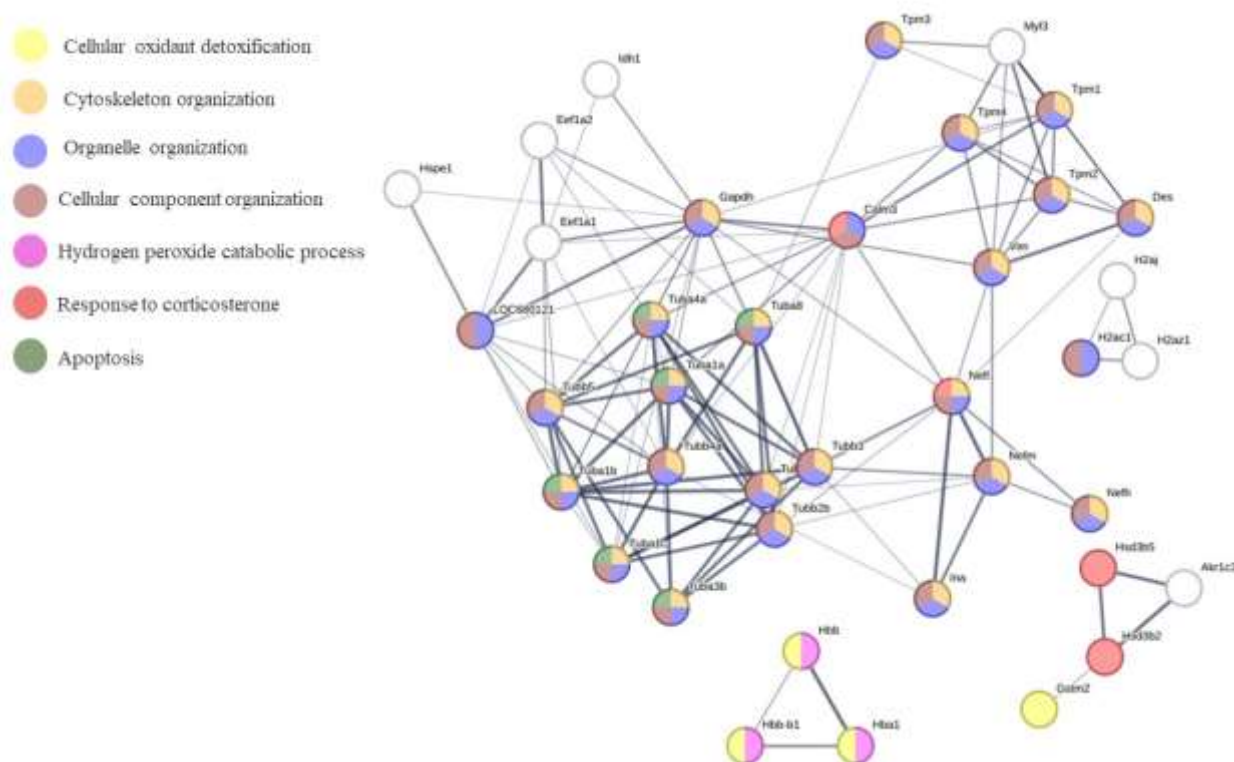


Figura 13. Proteínas do ovário *up* reguladas da prole Pai Etanol em relação à Controle no DPN 300.

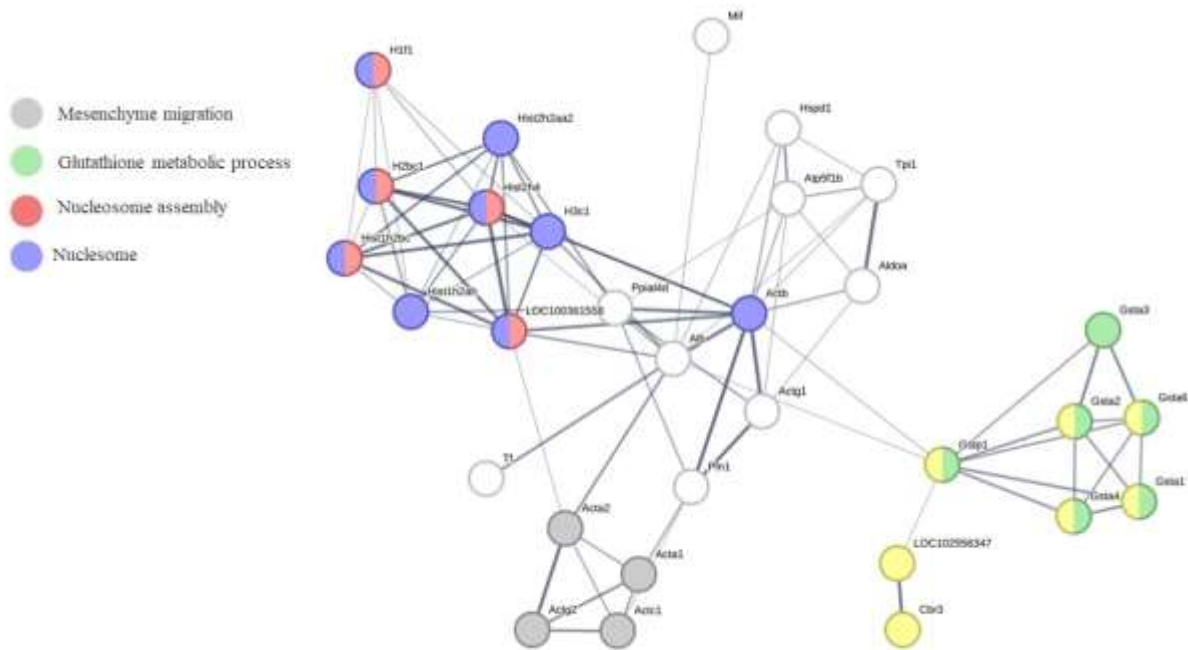


Figura 14. Proteínas do ovário *down* reguladas da prole Pai Etanol em relação à Controle no DPN 300.

Expressão gênica por RT-qPCR

Os genes de interesse foram selecionados a partir dos resultados obtidos pela avaliação da expressão proteica por espectrometria de massas, sendo os genes alvos eEF1, HSPE1, GSTP1, CALM1 e ACKR1. Após a identificação das proteínas pelo software *ProteinLynx Global Server*, os dados obtidos serão buscados no banco de dados *UniProtKB* para localização dos genes codificantes das proteínas diferentemente expressas. Selecionamos 5 genes relacionados as principais vias de alteração obtidas pela proteômica.

Amostras do ovário esquerdo (n = 5) foram removidas, alocadas em tubos criogênicos e imersas em RNAlater (Sigma-Aldrich, R0901) por 24 h para estabilizar e preservar a integridade do RNA. Após essa etapa, as amostras foram mantidas em freezer a -80 °C até o momento de seu processamento. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados com as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (Bustin *et al.*, 2009).

A extração, do RNA foi feita segundo o protocolo presente no *PureLink™ RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). O tecido foi extraído com o tampão de lavagem presente no kit, sendo utilizado aproximadamente 90 mg de tecido (1,8 ml de lise + 1,8 microlitro de mercaptoetanol) e homogeneizado em rotor mecânico. Posteriormente foi realizado a ligação, a lavagem (sem tratamento com DNase) e a eluição do RNA. Posteriormente foi realizado a análise do rendimento do RNA.

A reação de transcrição reversa (RT) do RNA total obtido da mama será realizada utilizando o *High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Esse kit contém primers randômicos e poli- (T) que se anelam e retro transcrevem todos os RNAs transcritos do genoma juntamente com a enzima transcriptase reversa. Além disso, também contém todos os demais componentes necessários para a conversão quantitativa de RNA total em cDNA com alto rendimento, linearidade e precisão. A reação de transcrição reversa e condições de ciclagem serão realizadas seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra de cDNA foi analisada no aparelho ViiATM 7 Real-Time PCR system com placas TaqMan ® (Life Technologies, EUA). As reações de RT-qPCR serão realizadas no aparelho ViiATM7 Realtime

PCR System (Life Technologies, EUA) do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do IBB/UNESP. A quantificação relativa da expressão gênica será realizada pelo método do Cq comparativo.

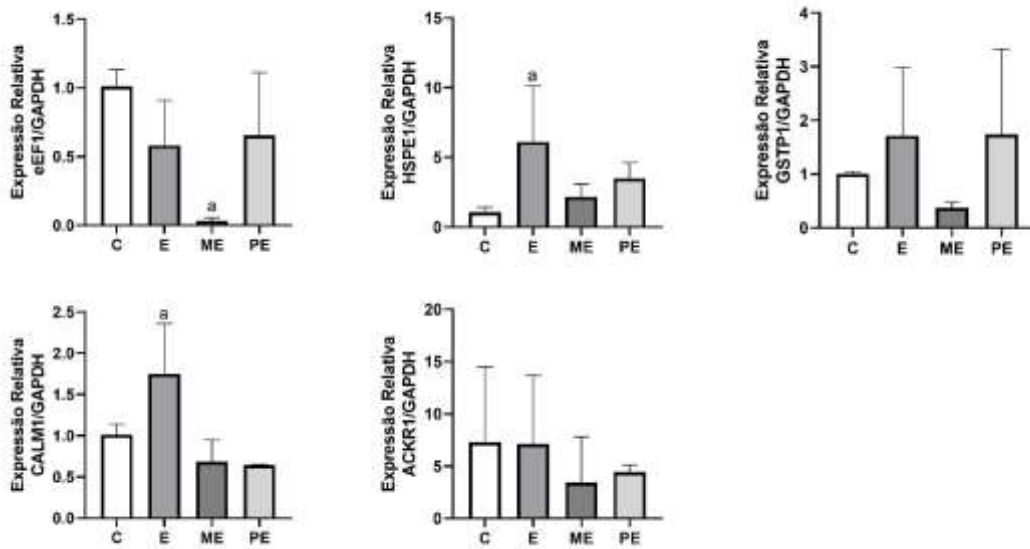


Figura 15. Expressão gênica relativa dos alvos eEF1, HSPE1, GSTP1, CALM1 e ACKR1 no tecido ovariano da prole C, E, ME e PE no DPN 300. n = 5/grupo. Valores expressos como média $\pm$ D.P. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. $p < 0,05$ por One-way ANOVA com pós-teste de Dunnett.

Análise Hormonal

A concentração plasmática dos hormônios reprodutivos, estradiol, progesterona e testosterona foram dosadas. O plasma cervical foi coletado, armazenado em tubos EDTA e alocados a -4°C . A concentração plasmática de testosterona foi determinada por ELISA competitiva (Kit Elabiscience Biotechnology CO., Houston, Texas, catalog nº: E-EL-0144, 96 T, sensibilidade de 0.17 ng/mL, faixa de detecção entre 0,31 à 20 ng/mL, repetibilidade com coeficiente de variação 10%). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 450 nm.

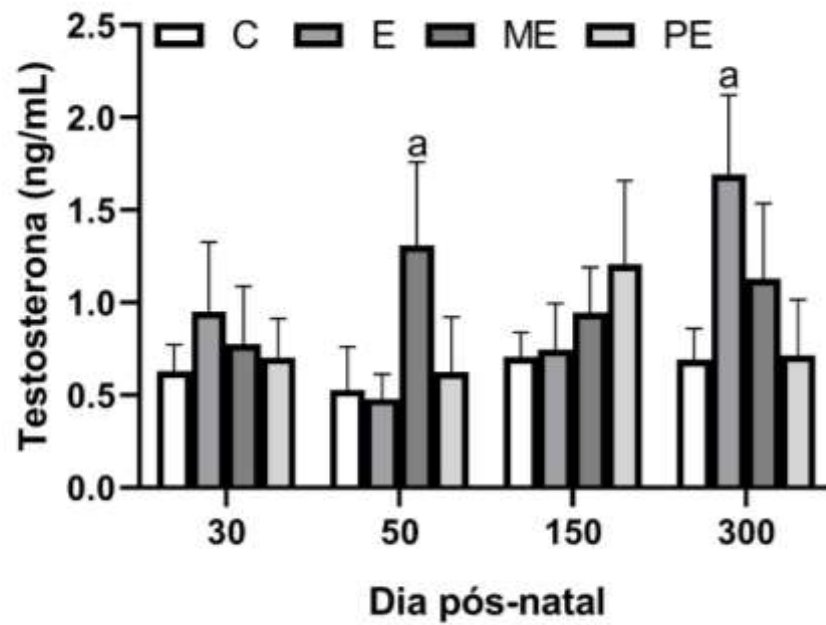


Figura 16. Hormônio reprodutivo. Concentração plasmática de testosterona da prole feminina dos grupos Controle (C), Etanol (E), Mãe Etanol (ME) e Pai Etanol (PE) no dia pós-natal 30, 50, 150 e 300. $n = 5$ / grupo / idade. As letras representam as diferenças em relação ao Controle. Valores expressos como média $\pm$ D.P. $p < 0,05$ pelo *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet.

2150

Anexo

*Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências de Botucatu*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O alto consumo de etanol parental pós-púbere e o desenvolvimento e a inflamação mamária e ovariana na prole feminina não exposta", protocolada sob o CEUA nº 3632210121 (ID 000172), sob a responsabilidade de **Francisco Eduardo Martinez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 18/02/2021.

We certify that the proposal "The high postpubertal parental ethanol use and breast and ovary development and inflammation of ethanol-naïve female offspring", utilizing 200 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 3632210121 (ID 000172), under the responsibility of **Francisco Eduardo Martinez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 02/18/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2021 a 12/2023** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério do Setor de Anatomia, IBB/UNESP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **30 a 360 dias**

N: **200**

Linhagem: **UchA e UchB**

Peso: **30 a 450 g**

Local do experimento: **Setor de Anatomia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional**

Botucatu, 18 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno César Schimming
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

2151