



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL - PPGBA

Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho

**Avaliação do efeito protetor da melatonina exógena sobre os
neonatos de matrizes submetidas ao consumo crônico de álcool
durante a prenhez**

RECIFE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL - PPGBA

ILKA DAYANE DUARTE DE SOUSA COELHO

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA
SOBRE OS NEONATOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AO CONSUMO
CRÔNICO DE ÁLCOOL DURANTE A PRENHEZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadores:

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- C672a Coelho, Ilka Dayane Duarte de Sousa
Avaliação do efeito protetor da melatonina exógena sobre os neonatos de matrizes submetidas ao consumo crônico de álcool durante a prenhez / Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho. – 2018. 163 f. : il.
- Orientador: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Coorientadores: Valéria Wanderley Teixeira, Cristiano Aparecido Chagas
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).
1. Ensaio Cometa 2. Etanol 3. Imunohistoquímica 4. Melatonina 5. Neonato 6. Teste do Micronúcleo I. Teixeira, , Álvaro Aguiar Coelho, orient. II. Teixeira, Valéria Wanderley, coorient. III. Chagas, Cristiano Aparecido, coorient. IV. Título

CDD 636.089

ILKA DAYANE DUARTE DE SOUSA COELHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA
SOBRE OS NEONATOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AO CONSUMO
CRÔNICO DE ÁLCOOL DURANTE A PRENHEZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) – UFRPE

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas – UFPE/CAV

Profa. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos – UFPE/CAV

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza – UFRPE

“Dedico este trabalho a Deus, meu amigo fiel de todas as horas que me deu forças e me guiou para a realização deste sonho.”

AGRADECIMENTOS

O doutorado foi decerto um dos maiores desafios acadêmicos da minha vida enquanto pesquisadora. Ao longo desses quatro anos de curso muitos obstáculos surgiram. Por diversas vezes pensei em desistir, porém nos momentos mais árduos, o Senhor me guiou e colocou pessoas incríveis em meu caminho, mostrando que a concretização deste sonho seria possível. Hoje, quando olho pra trás, percebo que todo esforço foi válido e tenho comigo a sensação de dever cumprido. Por isso, gostaria de fazer um singelo agradecimento àqueles que me ajudaram nessa jornada.

Agradeço primeiramente ao meu grandioso Deus pelo dom da vida e pela permissão que tudo isso acontecesse. Ele, meu amigo fiel, esteve sempre ao meu lado, me sustentou e iluminou meu caminho durante essa caminhada.

À minha filhinha Laura que mesmo sem saber, me deu motivação para continuar e me fez uma pessoa mais forte para suportar as adversidades da vida. Ela, que me mostrou o amor mais puro e verdadeiro que alguém pode sentir.

Aos meus amados pais pelo amor incondicional, motivação e conselhos. Minha mãe, que sempre se dispôs a ficar com a minha filha para que eu pudesse estudar e meu pai, que incansáveis vezes me buscava na universidade para que o meu experimento não fosse prejudicado.

Ao meu querido esposo e companheiro Anderson pelo incentivo e paciência nos momentos de angústia, estresse e ausência.

Aos meus sogros Marta e Alfredo pelo apoio e ajuda com Laura.

À minha prima Érica que muitas vezes se viu sobrecarregada com os afazeres da nossa escola por conta do meu afastamento.

Aos demais familiares que me apoiaram. Agradeço carinhosamente à minha prima Geyza pelo incentivo, paciência com os longos desabafos e pelas palavras amigas nos momentos em que mais precisava.

Ao meu orientador, o professor Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela orientação, dedicação, incentivo e confiança durante todo o processo.

À minha querida co-orientadora, a professora Dra. Valéria Wanderley Teixeira, pelo carinho, amizade, apoio e atenção, essenciais para a realização desta pesquisa.

Ao meu co-orientador, o professor Dr. Cristiano Aparecido Chagas, pelos ensinamentos, apoio e, principalmente, pela paciência com as minhas dúvidas e agonias.

Aos professores Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos e Dr. Francisco Carlos Amanajás da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), professores da época da graduação e hoje colaboradores desta pesquisa. Sou grata pela valiosa força, disponibilidade, colaboração, ensinamentos e oportunidade de realizar meus experimentos no CAV.

Aos demais professores que passaram pela minha vida durante esses últimos quatro anos de doutorado, pelo estímulo e ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Edna Cherias, pelo seu valioso serviço.

Aos bioteristas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), André e Renata, pelo apoio e ajuda com os animais.

Aos meus colegas de laboratório de Histologia da UFRPE Aline, Carol, Cíntia, Lécio, Welma, Ismaela, Marina, Hilda, Yuri, Bárbara pelo carinho, receptividade, momentos de descontração, palavras de apoio e saberes compartilhados. Agradeço em especial a Clóvis, que se mostrou um verdadeiro amigo, sempre se dispondo a me ajudar, me dando apoio nos momentos de maiores aflições e medo. Sua ajuda foi imprescindível.

Aos meus colegas do laboratório de Biotecnologia e Fármacos da UFPE – CAV, em especial a Talita pela ajuda e ensinamentos nos experimentos e a Meykson Alexandre, que se fez presente a todo o momento, nos dias mais complicados, independente destes dias serem durante ou nos finais de semana.

Às minhas queridas Juliana e Ketsia pela amizade e palavras de apoio durante esse percurso da minha vida.

Aos meus amigos da época da graduação Fabíola, Rafael, Cléo, Karlinha, Paloma e Jarci pelos momentos de desabafo e descontração.

Às minhas amigas de infância Fernanda, Kariny e Aline pela cumplicidade, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Agradeço pela torcida pelo meu crescimento profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBC) pela oportunidade.

Ao Centro Acadêmico de Vitória/ Universidade Federal de Pernambuco por abrir suas portas e contribuir para a realização deste trabalho.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos técnicos e demais funcionários do Centro Acadêmico de Vitória e da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

E a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho.

Sem a ajuda de vocês, seria impossível chegar aonde cheguei. Muito obrigada a todos!

"Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança."

Stephen Hawkin

RESUMO

O consumo de álcool na gestação constitui um grave problema de saúde pública, pois aumenta o risco de abortos espontâneos, retardo mental e anomalias congênitas, comprometendo o desenvolvimento fetal saudável. A produção de acetaldeído e o aumento na liberação de radicais livres decorrentes do metabolismo etílico são os principais fatores que contribuem para os prejuízos causados pelo álcool. Esses produtos reagem e lesionam proteínas, lipídeos e DNA das células e, portanto, prejudicam a organogênese e a fisiologia fetal. A melatonina é um poderoso antioxidante, capaz de cruzar livremente as barreiras morfofisiológicas encontradas nas células e nos compartimentos celulares, incluindo o núcleo e a mitocôndria, protegendo, assim, as membranas celulares, as proteínas e os genomas nuclear e mitocondrial. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da melatonina exógena sobre os neonatos de matrizes submetidas ao consumo crônico de álcool durante a prenhez. Utilizou-se 20 ratas prenhes divididas nos grupos: I – Ratas que receberam água destilada (controle); II – Ratas que receberam álcool etílico absoluto (3 g/kg/dia); III – Ratas que receberam álcool etílico absoluto (3 g/kg/dia) e melatonina (10 mg/kg/dia); IV – Ratas que receberam álcool etílico absoluto (3 g/kg/dia) e melatonina (15 mg/kg/dia). Após o nascimento, as matrizes e 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas) de cada grupo experimental foram anestesiados para coleta do sangue e fígado das mães e do sangue, fígado e cérebro dos neonatos para verificação da frequência de danos no DNA pelo ensaio cometa. O sangue ainda foi usado para o teste do micronúcleo. Análises sobre tamanho e peso ao nascer dos neonatos, assim como avaliações morfométricas, histoquímicas (quantificação de glicogênio e colágeno) e imunohistoquímicas (fator TNF- α e IL-6) no fígado desses animais também foram realizadas. Os resultados demonstraram um aumento significativo de dano no DNA das células sanguíneas e hepáticas das matrizes e das proles do grupo álcool, bem como no cérebro desses neonatos. Os tratamentos com melatonina (10 e 15 mg/kg/dia) reduziram significativamente a genotoxicidade causada pelo etanol no sangue das mães e dos neonatos (machos e fêmeas), no fígado das matrizes e dos filhotes machos e no cérebro da prole de fêmeas. Mostrou-se ainda que apenas a prole de fêmeas exposta ao consumo materno de álcool apresentou frequência maior de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Além disso, a exposição intrauterina ao

álcool provocou redução significativa no comprimento e peso ao nascer dos neonatos. Ademais, reduziu o número de hepatócitos e de sua área nuclear, aumentou a área citoplasmática dessas células, diminuiu o acúmulo de glicogênio hepático e elevou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Contudo, o número de megacariócitos e a deposição de colágeno não foram alterados. Os tratamentos com melatonina a 10 e a 15 mg/kg durante a prenhez protegeram os neonatos contra as injúrias provocadas pelo consumo materno de álcool sobre o crescimento, peso ao nascer e morfofisiologia hepática. Assim, concluímos que o tratamento com melatonina exógena pode ser uma estratégia eficaz na proteção contra danos induzidos pela exposição pré-natal ao álcool.

Palavras-chave: Ensaio Cometa. Etanol. Imunohistoquímica. Melatonina. Neonato. Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

Alcohol consumption during pregnancy is a serious public health problem because it increases the risk of spontaneous abortions, mental retardation and congenital anomalies, compromising healthy fetal development. Production of acetaldehyde and increase in the liberation of free radicals due to the metabolism of ethanol are the main factors that contribute to the damages induced by alcohol. These products react and injure proteins, lipids and DNA of the cells and thus impair organogenesis and fetal physiology. Melatonin is a powerful antioxidant capable of freely crossing the morphological and physiological barriers found in cells and cell compartments, including the nucleus and mitochondria, protecting cell membranes, proteins and nuclear and mitochondrial genomes. The objective of this study was to evaluate the protective effect of exogenous melatonin on the neonates of matrices submitted to chronic alcohol consumption during pregnancy. Twenty pregnant rats were used and divided into the groups: I - Rats receiving distilled water (control); II - Rats receiving absolute ethyl alcohol (3 g/kg/day); III - Rats receiving absolute ethyl alcohol (3 g/kg/day) and melatonin (10 mg/kg/day); IV - Rats receiving absolute ethyl alcohol (3 g/kg/day) and melatonin (15 mg/kg/day). After birth, dams and 10 neonates (five males and five females) of each experimental group were anesthetized to collect of the dams' blood and liver and of the neonates' blood, liver and brain to verify the frequency of DNA damage by the comet assay. Blood was also used for the micronucleus test. Analyzes of size and birth weight of newborns, as well as, morphometric, histochemical (quantification of glycogen and collagen) and immunohistochemical (tumor necrosis factor alpha - TNF- α and interleukin 6 - IL-6) evaluations in the liver of these animals were also performed. Our results demonstrated a significant increase in DNA damage in the blood and liver cells of the dams and offspring of the alcohol group as well as in the brains of these neonates. Treatments with melatonin (10 and 15 mg/kg/day) significantly reduced the genotoxicity caused by ethanol in the blood of dams and neonates (males and females), liver of dams and male offspring, and in the brain of offspring of females. It was also shown that only the offspring of females exposed to maternal alcohol consumption showed a higher frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes. In addition, intrauterine exposure to alcohol resulted in a significant reduction in neonatal length and birth weight. Moreover, it reduced the number of

hepatocytes and their nuclear area, increased the cytoplasmic area of these cells, decreased the accumulation of hepatic glycogen and raised the levels of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. However, the number of megakaryocytes and collagen deposition were not altered. Treatments with melatonin at 10 and 15 mg/kg during pregnancy protected the neonates against injuries caused by maternal alcohol consumption on growth, birth weight and hepatic morphophysiology. Thus, we conclude that treatment with exogenous melatonin may be an effective strategy in protecting against damage induced by intrauterine exposure to alcohol.

Key words: Comet assay. Ethanol. Immunohistochemistry. Melatonin. Micronucleus test. Neonate.

SUMÁRIO

Capítulos

I	1. INTRODUÇÃO.....	23
	2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
	2.1. Consumo de álcool e suas consequências.....	26
	2.2. Metabolismo do álcool.....	27
	2.3. Álcool e o estresse oxidativo	30
	2.4. Álcool e o processo inflamatório	32
	2.5. Efeitos do álcool sobre o sistema nervoso central	35
	2.6. Efeitos do álcool sobre o fígado.....	38
	2.7. Efeitos do álcool sobre os desenvolvimentos embrionário e fetal.....	41
	2.8. Melatonina: estrutura, síntese e mecanismos de ação.....	45
	2.9. O papel antioxidante da melatonina.....	48
	2.10. Melatonina e gestação.....	49
	2.11. Modelos de avaliação de danos ao DNA.....	50
	2.11.1. Teste do Micronúcleo.....	51
	2.11.2. Ensaio Cometa ou Eletroforese de Célula Única.....	54
	3. OBJETIVOS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
II	Efeito protetor da melatonina exógena em ratas e sua prole sobre a resposta genotóxica induzida pelo consumo crônico de álcool durante a prenhez.....	73
	RESUMO.....	74
	ABSTRACT.....	75
	INTRODUÇÃO.....	76
	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
	RESULTADOS.....	81
	DISCUSSÃO.....	85
	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS	88

III	Ação da melatonina exógena sobre o fígado da prole de ratas submetidas à exposição crônica ao álcool durante a prenhez: Um estudo morfométrico, histoquímico e imunohistoquímico.....	99
	RESUMO.....	100
	ABSTRACT.....	101
	INTRODUÇÃO.....	102
	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
	RESULTADOS.....	107
	DISCUSSÃO	108
	REFERÊNCIAS	111

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

FIGURA 1: Esquema representando as possíveis vias de metabolização do etanol nos hepatócitos. Adaptado de Elamin et al. (2014).....	28
FIGURA 2: Esquema representando como o etanol pode danificar o DNA. Adaptado de Kruman; Henderson; Bergeson (2012).....	37
FIGURA 3: Espectro da doença hepática alcoólica (DHA). Observa-se que a cirrose é o processo patológico primário para o surgimento do carcinoma hepatocelular, porém uma DHA pode evoluir para um câncer sem passar necessariamente pela cirrose. Adaptado de Zhu et al. (2012).....	39
FIGURA 4: À esquerda, criança de quatro meses com SAF e a direita, essa mesma criança com oito anos de idade. Notar fissuras palpebrais curtas, lábios superiores finos e ausência de filtro labial (JONES, 2011).....	42
FIGURA 5: Estrutura química da melatonina (CHEN et al., 2012).....	45
FIGURA 6: Biossíntese da melatonina. Adaptado de Carpentieri et al. (2012).	46
FIGURA 7: Formação de micronúcleos na divisão celular (SABHARWAL et al., 2015)	51
FIGURA 8: Eritrócito policromático micronucleado (seta vermelha) e eritrócitos normocromáticos (em verde) (SOUZA, 2016).....	52
FIGURA 9: Imagens de cometas de linfócitos, representando as classes 0-4 usadas na mensuração dos danos. Arquivo pessoal.	55

Capítulo III

FIGURA 1: Peso dos filhotes dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	121
FIGURA 2: Comprimento dos filhotes dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	122
FIGURA 3: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais evidenciando o glicogênio hepático corado pelo Ácido Periódico de Schiff. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.....	123
FIGURA 4: Quantificação de glicogênio hepático. Coloração Ácido Periódico de Schiff. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	124
FIGURA 5: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais mostrando a deposição de colágeno corada pelo Picrosirius Red. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.....	125
FIGURA 6: Quantificação do colágeno hepático. Coloração Picrosirius Red. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	126
FIGURA 7: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. Imunohistoquímica para IL-6. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.....	127

FIGURA 8: Quantificação de IL-6 no fígado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	128
FIGURA 9: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. Imunohistoquímica para TNF- α . A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.....	129
FIGURA 10: Quantificação de TNF- α no fígado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....	130

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

TABELA 1: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com as matrizes.....	82
TABELA 2: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com a prole de machos.....	83
TABELA 3: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com a prole de fêmeas.....	84

Capítulo III

TABELA 1: Média $\pm$ desvio padrão do número de hepatócitos (NH), área citoplasmática dos hepatócitos (ACH), área do núcleo dos hepatócitos (ANH) e número de megacariócitos (NM) nos neonatos dos grupos experimentais.....	120
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH – Área celular dos hepatócitos
ADH – Enzima álcool desidrogenase
ALDH – Enzima aldeído desidrogenase
ANH – Área nuclear dos hepatócitos
ARBD – Defeitos Congênitos Relacionados ao Álcool
ARND – Desordens do Neurodesenvolvimento Relacionados ao Álcool
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – Albumina sérica bovina
CAT – Catalase
CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CSF – Fator estimulador de colônias
DHA – Doença hepática alcoólica
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etileno diamina tetra acético
ENC – Eritrócitos normocromáticos
EPC – Eritrócitos policromáticos
EPM – Eritrócitos policromáticos micronucleados
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FASD – Espectro de Desordens Fetais Alcoólicas
FD – Fator de dano
FD_{Ce} – Frequência de dano no cérebro
FD_{Fi} – Frequência de dano no fígado
FD_{Sa} – Frequência de dano no sangue
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
GSH-Rd – Glutathione reductase
HCl – Ácido clorídrico
HClO – Ácido hipocloroso

HE – Hematoxilina-eosina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

•HO – Hidroxila

ID – Índice de dano

IDCe – Índice de danos no cérebro

IDFi – Índice de danos no fígado

IDSa – Índice de danos no sangue

IL – Interleucina

IL-1 – Interleucina 1

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IFN – Interferons

IOM – Institute of Medicine

L(R)OOH – Hidroperóxido

LO• – Radical alcóxil

MEOS – Sistema microssômico de oxidação do etanol

MT1 – Receptor de melatonina tipo 1

MT2 – Receptor de melatonina tipo 2

MT3 – Receptor de melatonina tipo 3

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NMDA – N-metil-D-aspartato

NH – Número de hepatócitos

NMC – Número de megacariócitos

•NO – Óxido nítrico

NSQ – Núcleo supraquiasmático

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO- – Ânion peroxinitrito

O₂^{-•} – Superóxido

PAS – Ácido Periódico de Schiff

PBS – Tampão fosfato salino

REL – Retículo endoplasmático liso

RNA – Ácido ribonucleico

SAA – Síndrome de Abstinência Alcoólica

SAF – Síndrome Alcoólica Fetal

SENAD – Secretaria Nacional Antidroga

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TGF – Fator de transformação de crescimento

TLR4 – Receptor do tipo Toll 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1– Receptor do fator de necrose tumoral 1

TNFR2– Receptor do fator de necrose tumoral 2

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento beta

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O álcool é a substância psicoativa mais utilizada em todo mundo. Seu consumo em excesso e regular pode desenvolver dependência, uma condição conhecida como alcoolismo (PASSINI JÚNIOR, 2005). O alcoolismo tem aumentado demasiadamente entre homens e mulheres e atualmente é considerado um grave problema de saúde pública, merecendo atenção especial o uso abusivo de bebidas alcoólicas pelas gestantes (LARANJEIRA, 2014).

A ingestão exagerada de etanol está associada ao desenvolvimento de diversas complicações fisiológicas, tais como: desordens neurológicas, doenças hepáticas, disfunções do ciclo reprodutivo em mulheres, pancreatite crônica e risco para o surgimento de neoplasias (APTE; PIROLA; WILSON, 2010; CHUFFA et al., 2011; FEDELI et al., 2003; GAO; BATALLER, 2011; RIDLEY; DRAPER; WITHALL, 2013; WÜNSCH FILHO, 2013). Nos fetos e embriões, a exposição pré-natal ao etanol pode levar a efeitos deletérios, incluindo alterações na morfogênese de vários órgãos e a uma série de alterações físicas, cognitivas e comportamentais permanentes e irreversíveis (COOK, 2003; LANDGREN et al., 2010).

A Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) representa a consequência mais severa resultante da exposição intrauterina ao álcool. Esse quadro patológico acarreta desordens fetais que incluem dismorfias faciais características, restrições nos crescimentos pré e pós-natal, anormalidades estruturais e distúrbios no sistema nervoso central, podendo apresentar outras malformações congênitas, dificuldades de aprendizagem, de memória, problemas funcionais, emocionais e de comportamento (MOMINO; SANSEVERINO; SCHULER-FACCINI, 2008). Ainda não foi estabelecida a quantidade segura para se consumir de álcool durante a gestação, por isso, a abstinência nessa situação é considerada a conduta mais segura (YAMAGUCHI et al., 2008).

O etanol ingerido pela gestante atravessa livremente a barreira placentária e distribui-se pelo líquido amniótico, atingindo os tecidos fetais (GUERRINI et al., 2007). A difusão passiva do álcool ocorre por gradiente de concentração, de forma que os níveis da mãe e do feto são semelhantes até que todo o álcool tenha sido metabolizado. Como nos fetos o metabolismo e a eliminação são processos mais lentos, a exposição fetal ao etanol e seu metabólito, o acetaldeído, é maior (DOMINGUES; TOLEDO; MORAES, 2009).

Um dos maiores fatores contribuintes para os danos induzidos pelo álcool consiste na geração aumentada das espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas são capazes de reagir e lesionar constituintes celulares essenciais, como proteínas, lipídios e DNA, prejudicando a organogênese (WU; CEDERBAUM, 2009). Renis et al. (1996) observaram um aumento significativo de danos ao DNA no hipocampo e cerebelo de ratos submetidos à administração crônica de etanol. Também tem sido demonstrado que o consumo dessa droga produz danos ao DNA de hepatócitos de humanos e modelos de animais (NAVASUMRIT; MARGISON; CONNOR, 2001; WANG et al., 2006). Deste modo, os danos genotóxicos podem ser uma importante razão para a neurotoxicidade, carcinogenicidade ou anomalias congênitas induzidas pelo etanol.

Estudos têm apontado que o consumo etílico em excesso ainda estimula o surgimento de doenças inflamatórias sistêmicas, visto que, o álcool tem o potencial de elevar os níveis das citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), no plasma e em tecidos (CREWS et al., 2006). A translocação de endotoxinas bacterianas causada pelo aumento na permeabilidade da mucosa intestinal e o estresse oxidativo são condições que podem levar ao crescimento na produção dessas citocinas constatado no consumo crônico de etanol (LU; CEDERBAUM, 2010).

A melatonina (N-Acetil-5-Metoxitriptamina) é uma indolamina sintetizada principalmente pela glândula pineal. Sua secreção é controlada pelos ciclos de iluminação ambiental característicos de dia/noite, sendo estimulada pelo escuro e inibida pela luz. Estudos têm reportado que este hormônio exerce papel importante em uma variedade de funções fisiológicas, atuando na regulação dos ciclos circadianos e sazonais, na modulação da reprodução, exercendo efeitos antitumorais em diferentes tipos de neoplasias, na modulação da inflamação e como molécula com elevado poder antioxidante (GONZALEZ et al., 2008; REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010; SANTOS et al., 2004).

O papel antioxidante da melatonina se deve a sua natureza anfífila que a permite cruzar livremente as barreiras morfofisiológicas encontradas nos tecidos, nas células e nos compartimentos celulares, incluindo o núcleo e a mitocôndria. Por isso, protege as membranas celulares, proteínas e os genomas nuclear e mitocondrial (HERRUZO; MUNOZ, 2009). A melatonina pode ajudar a neutralizar os

radicais livres antes que estes exerçam suas atividades oxidativas. Além disso, é capaz de capturar as espécies reativas diretamente e estimular a expressão gênica de algumas enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase (FERRARO; LÓPEZ-ORTEGA, 2008; LEMOS et al., 2014).

Uma pesquisa relacionada à melatonina indicou que a administração deste hormônio durante 15 dias diminuiu o estresse hepático induzido por etionina em ratos e aumentou a atividade específica da enzima glutathione peroxidase (FERRARO; LÓPEZ-ORTEGA, 2008). No mesmo sentido, Rosa et al. (2010), em estudo com ratos cirróticos, reportaram que a administração de melatonina reduziu os danos e os níveis de lipoperoxidação no fígado e em eritrócitos e, aumentou a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase nos eritrócitos.

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são importantes ferramentas que podem ser utilizadas na investigação da genotoxicidade e na identificação do potencial de mutagenicidade de um determinado produto físico, químico ou biológico (BAUSINGER; SPEIT, 2016; BOLOGNESI; HOLLAND, 2016). O ensaio cometa é capaz de detectar lesões pré-mutagênicas, analisando danos e reparos no DNA em diversos tipos celulares em resposta a uma série de agentes nocivos a saúde (KAMMANN et al., 2001), enquanto que o teste do micronúcleo verifica a existência de mutações cromossômicas (BONASSI et al., 2011). Esses testes têm sido utilizados na detecção de danos genotóxicos induzidos pela exposição ao etanol (IGNATOWICZ et al., 2013; RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

Diante do exposto, torna-se interessante testar a hipótese de que a melatonina exógena pode apresentar um efeito protetor durante a gestação sobre os neonatos de matrizes submetidas à ingestão crônica de álcool.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Consumo de álcool e suas consequências

O álcool (etanol) é uma droga psicoativa que tem seu uso difundido em todo o mundo. Historicamente, é consumido pela sociedade há muitos séculos em comemorações, rituais religiosos e usado na produção de medicamentos e de perfumes (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

Inicialmente, o teor alcoólico das bebidas era relativamente baixo, pois dependiam exclusivamente dos processos de fermentação. Contudo, novos tipos surgiram a partir da técnica de destilação desenvolvida na Idade Média (OLIVEIRA et al., 2012). Com a Revolução Industrial, houve uma crescente produção e comercialização das bebidas alcoólicas, contribuindo significativamente para o aumento de seu consumo e, conseqüentemente, ampliando o número de pessoas que passaram a apresentar complicações devido ao consumo excessivo de álcool (GIGLIOTTI; BESSA, 2004). Diferente de outras drogas, as bebidas alcoólicas são lícitas, possuem baixo custo e são de fácil acesso, o que estimula ainda mais sua aceitação pela sociedade (CAVALCANTE; ALVES; BARROSO, 2008).

O consumo de álcool pode gerar vício em pessoas predispostas geneticamente e/ou submetidas a situações de depressão, estresse e uso abusivo e frequente, bem como em decorrência das motivações individuais para beber (GONZALEZ; REYNOLDS; SKEWES, 2011; O'SHEA; DASARATHY; MCCULLOUGH, 2010). Essa dependência do indivíduo ao álcool é definida como alcoolismo (Síndrome de Dependência do Álcool), atualmente considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença multifatorial que compromete os aspectos biológicos, psicológicos, sociais e ambientais do indivíduo e uma grave questão de ordem pública em todo o mundo. Estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas em todo o planeta façam o uso de bebidas alcoólicas, o que corresponde a 40% (2 em cada 5) da população acima dos 15 anos (BRITES; ABREU; PINTO, 2014; WHO, 2004).

Segundo o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas do Departamento de Psicologia da Universidade Federal de São Paulo – CEBRID, em um estudo com o objetivo de acompanhar a atualização do consumo de álcool e de outras drogas no Brasil, o número de brasileiros com idade entre 12 a 65 anos,

dependentes de bebidas alcoólicas foi de 12,3%, o que corresponde à aproximadamente seis milhões de pessoas no país (CARLINI et al., 2006).

As principais consequências relacionadas ao consumo de álcool estão relacionadas à saúde. O álcool é apontado como causador de mais de 60 tipos de doenças, de desenvolvimento agudo e crônico, contribuindo com cerca de 4% do total dos casos mundiais de processos patológicos (NALPAS et al., 2003). Aproximadamente 7,3 milhões das pessoas que fazem o uso do álcool são acometidas por doenças provocadas pelo seu consumo, levando o álcool a terceira maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e neoplasias (WHO, 2014). Além de pessoas que ficam incapacitadas devido a acidentes ou pelos efeitos nocivos do álcool sobre o organismo (WONG et al., 2008).

O etanol está associado a transtornos psicológicos, doenças do fígado, desordens do sistema imune, promoção de efeitos adversos no trato gastrointestinal, abortos espontâneos e desenvolvimento de neoplasias na cavidade oral, no esôfago e na mama em mulheres (CAO et al., 2015; COOK, 1998; MINCIS; MINCIS, 2011). Além disso, o consumo crônico de álcool está relacionado a acidentes de trânsito e de trabalho, situações traumáticas e de violência, envenenamentos, suicídios, homicídios, dentre outras (BOHLAND; GONÇALVES, 2015). Contudo, a ingestão de álcool continua sendo amplamente aceita pela sociedade, o que dificulta o reconhecimento de seus efeitos maléficos (ELAMIN et al., 2014; INUMARU et al., 2011).

2.2. Metabolismo do álcool

O etanol ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{HO}$) é uma molécula simples, possui um peso molecular baixo, moderada solubilidade em lipídios e é bastante hidrossolúvel. Depois de ingerido, é absorvido pelas mucosas da boca e do esôfago (em pequenas quantidades), do estômago e do intestino grosso (em quantidades moderadas), por difusão simples. Contudo, é no intestino delgado seu local de maior absorção (CRABB, 1987). A taxa de absorção do etanol depende de diversos fatores, dentre os quais, podemos citar: presença de comida no estômago, efeito dos alimentos, ingestão de fármacos que afetam a motilidade gastrointestinal e o fluxo sanguíneo, índice de massa corporal, quantidade de álcool consumida e atividade enzimática no

estômago (HOLFFMANN; CARBONELL; MONTORO, 1996). Aproximadamente 2-10% da quantidade absorvida é expelida pelos pulmões, rins ou suor, sendo a maior parte dele metabolizada pelo fígado (90-98%) (MARTINS, 2013).

Após absorvido, o etanol atinge a circulação sanguínea e rapidamente é distribuído através dos fluidos corporais para os tecidos. O coração, o cérebro e os músculos são, geralmente, expostos às mesmas concentrações de álcool do sangue, sendo o fígado o órgão sujeito a concentrações mais elevadas, já que recebe o etanol absorvido pelo estômago e intestino. A maior parte do álcool é desintoxicada no fígado, que contém a maioria das enzimas capazes de metabolizá-lo, através de alterações metabólicas oxidativas (MINCIS; MINCIS, 2011).

As etapas envolvidas na metabolização do etanol consistem na oxidação em acetaldeído e depois em acetato. Nos hepatócitos, principais células que compõem o fígado, existem três vias metabólicas capazes de oxidar o etanol em acetaldeído: o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH), presente no citosol; o sistema microssômico de oxidação do etanol (MEOS, do inglês, *microsomal ethanol oxidizing system*) nos microssomos e através da catalase nos peroxissomos (MINCIS; MINCIS, 2011) (Figura 1).

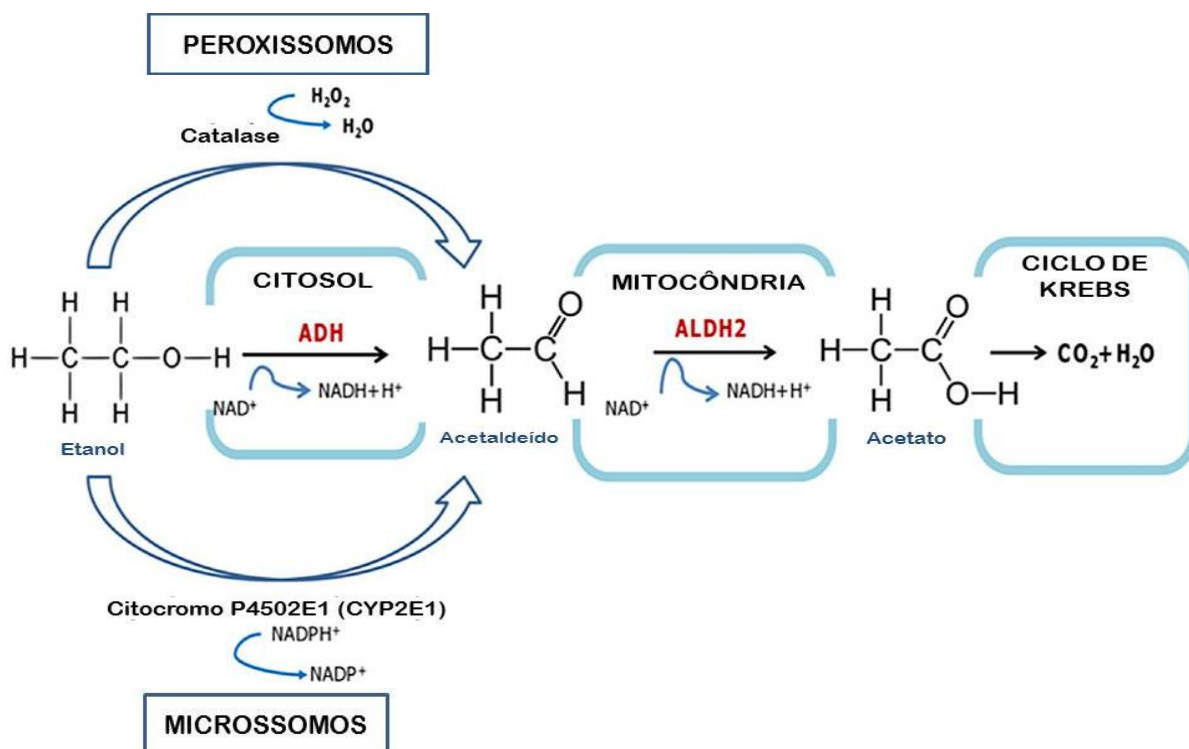


Figura 1. Esquema representando as possíveis vias de metabolização do etanol nos hepatócitos. Adaptado de Elamin et al. (2014).

O sistema da ADH é uma via metabólica essencial de conversão do etanol em acetaldeído e apresenta uma grande complexidade genética e funcional. As enzimas álcool desidrogenases estão agrupadas em cinco classes diferentes, de acordo com suas subunidades, composição de suas isoenzimas e de suas propriedades físicas e químicas (HURLEY; EDENBERG, 2012; REBELLO; CARVALHO, 2008).

As ADH da classe I (codificadas pelos genes ADH_1 , ADH_2 e ADH_3) são as maiores responsáveis pelo metabolismo do álcool nos seres humanos, respectivamente constituídas por associações de subunidades polipeptídicas α , β e γ . A maior parcela dessas enzimas é encontrada no fígado, porém estudos já demonstraram sua expressão em células epiteliais do intestino (ADH_1), nos pulmões, nos rins (ADH_2) e no estômago (ADH_3). As enzimas ADH_2 codificam três subunidades β diferentes e as ADH_3 codificam duas subunidades γ diferentes. As enzimas ADH_2 e ADH_3 são polimórficas, portanto, distribuem-se de forma diferente entre os grupos raciais, influenciando, assim, no hábito de consumo das bebidas alcoólicas e no desenvolvimento de doenças associadas aos efeitos do álcool no organismo. As ADH das classes II (ADH_4), III (ADH_5) e IV (ADH_7) estão menos presentes no organismo. As das classes V (ADH_6) foram descritas há pouco tempo e sua importância no processo de metabolização do etanol ainda é desconhecida (ELAMIN et al., 2014; REBELLO; CARVALHO, 2008).

A segunda via de metabolização do etanol em acetaldeído ocorre pelo MEOS, através do citocromo P450E1 ou CYP2E1, presentes no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. É responsável por menos de 10% da oxidação do etanol nas condições normais do organismo, contudo, torna-se fortemente ativo em alcoolistas, expostos cronicamente ao etanol (JIN et al., 2013).

A catalase oxida o etanol em acetaldeído na presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos peroxissomos. A presença da catalase no homem, especialmente no fígado, nos rins e nos eritrócitos, juntamente com diversos sistemas geradores de H_2O_2 parece não exercer um papel relevante na oxidação do etanol sob as condições fisiológicas normais. No entanto, assim como o MEOS, quando o organismo é exposto por um longo período ao etanol, a catalase é vigorosamente ativada (FORTEA et al., 1999).

O acetaldeído é um metabólito altamente nocivo ao organismo, mesmo que em pequenas concentrações. O aumento dos níveis desse produto está relacionado

a muitas ações tóxicas secundárias, principalmente no fígado (LU; CEDERBAUM, 2008).

Depois de ser transformado em acetaldeído por uma das três vias metabólicas, ocorre a conversão em acetato por ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). A ALDH possui duas formas variantes: a ALDH₁ e a ALDH₂ (MESSAS; FILHOB, 2004).

Nas reações do metabolismo do etanol mediadas pelas enzimas ADH e ALDH ocorre a transferência de íons de hidrogênio do álcool para o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) que é convertido para sua forma reduzida NADH+H⁺ no citoplasma do hepatócito. O acúmulo de NADH+H⁺ leva à alteração da homeostase celular (MARTINS, 2013).

O acetato é convertido em acetil-CoA e segue na corrente sanguínea. Em outros tecidos ou no próprio fígado, a coenzima A entra no Ciclo de Krebs e é rapidamente oxidada em dióxido de carbono e água (MARTINS, 2013).

Do ponto de vista biológico, as mulheres são menos tolerantes ao álcool que os homens. O organismo feminino apresenta menos água e mais tecido gorduroso, fazendo com que o álcool na corrente sanguínea da mulher seja mais concentrado mesmo após ingestão similar a do homem. As mulheres também possuem uma menor quantidade das enzimas metabolizadoras do álcool. Por isso, em comparação com os homens, as mulheres demoram mais tempo para metabolizar o álcool. Além disso, há a influência da ação de estrógenos. Isto faz com que as mulheres, na maioria das vezes, fiquem alcoolizadas em doses mais baixas e estejam mais vulneráveis ao desenvolvimento de complicações clínicas do que os indivíduos do sexo masculino (CEDERBAUM, 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

A susceptibilidade aos efeitos negativos do álcool sobre o indivíduo também é influenciado por sua genética. Em asiáticos, por exemplo, cerca de 10% da população, apresenta a forma variante da ALDH que resulta em um acúmulo de acetaldeído no organismo, causando desconforto e náuseas, reduzindo, assim, seu estímulo para dependência alcoólica (MESSAS; FILHOB, 2004).

2.3. Álcool e o estresse oxidativo

Radicais livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN) instáveis por possuírem um elétron livre não pareado

na sua camada orbital externa. Para alcançar sua estabilidade, tendem a se associar a outras moléculas de carga positiva, oxidando-as (VASCONCELOS et al., 2014).

A constante produção de radicais livres no organismo consiste em um processo biológico comum, desenvolvido primariamente na mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons ao converter os nutrientes provenientes da dieta em energia (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; SILVA; FERRARI, 2011). Em condições fisiológicas normais, 2-5% do oxigênio metabolizado na mitocôndria são convertidos em radicais livres (BARBOSA et al., 2010), que são altamente reativos e causam lesões nas células, como a peroxidação de lipídios, a oxidação de proteínas e danos ao DNA (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997). As espécies reativas incluem: ânion peroxinitrito (ONOO^-), hidroxila ($\cdot\text{HO}$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), ácido hipocloroso (HClO), radical hidroperoxil, radical alcoxi ($\text{LO}\cdot$) e hidroperóxido [L(R)OOH] (FERREIRA et al., 2011).

Para inibir ou reduzir os danos causados por essas substâncias, os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante. A glutathiona reduzida (GSH), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GSH-Px), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona redutase (GSH-Rd) são enzimas que fazem parte desse sistema de proteção e atuam regulando a formação de radicais livres ou podem neutralizá-los depois de formados. As vitaminas C (ácido ascórbico), E (tocoferol) e os β -carotenos também são poderosos antioxidantes, capazes de amenizar as lesões causadas pelos radicais livres (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as atividades mediadas pelo sistema de defesa antioxidante e a geração de radicais livres, de modo que a produção das espécies reativas é superior à capacidade antioxidante do sistema de defesa, resultando na oxidação de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (ONDEI; TERESA; BONINI-DOMINGOS, 2014). Ele tem grande relevância nos processos de envelhecimento, inflamação, transformação e morte celular, levando ao desenvolvimento de processos patológicos, como câncer, doenças autoimunes, cardiovasculares, pulmonares, diabetes, síndrome metabólica, hipertensão arterial sistêmica e doenças neurodegenerativas (Alzheimer e

Parkinson) (FURUKAWA et al., 2017; GIACCO; BROWNLEE, 2010; JACOB et al., 2013; REUTER et al., 2010; SILVA; FERRARI, 2011).

Durante o metabolismo do álcool, quando ocorre sua conversão em acetaldeído e, posteriormente, em acetato há a produção excessiva de radicais livres, ademais, o etanol também pode diminuir a atividade do sistema de defesa antioxidante (BANSAL et al., 2010). No consumo excessivo de bebidas alcoólicas, as enzimas álcool desidrogenases ficam saturadas; por isso, as moléculas de etanol passam a ser também metabolizadas pelas proteínas de membrana CYP2E1 no retículo endoplasmático (citocromo P450) (LIEBER, 1997). Isso aumenta a produção de acetaldeído e das EROs. O aumento nos níveis dessas espécies reativas resulta na peroxidação lipídica, danos na formação de proteínas e na estrutura dos ácidos nucleicos, além da redução nos níveis da enzima antioxidante glutathione que, por conseguinte, causa um desequilíbrio no balanço redox das células e favorece o surgimento do estresse oxidativo (TSEDENSODNOM et al., 2013).

2.4. Álcool e o processo inflamatório

A inflamação é uma reação de defesa do organismo diante de infecções ou lesões teciduais locais (RANKIN, 2004). Esse processo fisiológico possui um importante papel na manutenção da homeostase tecidual, no entanto, sua persistência ou resposta demasiada pode ser extremamente prejudicial ao tecido afetado e favorecer o desenvolvimento de doenças (CHALLIS et al., 2009).

O processo inflamatório é desencadeado pelas células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, contando com a participação de seus mediadores químicos (COSTA; RUFINO; LAPA e SILVA, 2009).

As citocinas são moléculas proteicas (algumas contêm moléculas de açúcar ligadas - glicoproteínas) que desempenham um papel crucial na comunicação e ativação celular durante as respostas imunes. Elas atuam na célula-alvo e exercem múltiplas funções, tais como ativação e proliferação celular, imunomodulação, estímulo à liberação de outras citocinas ou mediadores inflamatórios, favorecem o crescimento e a diferenciação celular e até induzem a apoptose (CHUNG; BARNES, 1999). Interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) e fator de transformação de crescimento (TGF) são citocinas inflamatórias (CREWS et al., 2006; VARELLA; FORTE, 2001).

As citocinas são os primeiros mensageiros químicos envolvidos nas inflamações aguda e crônica. Elas são sintetizadas por diversas células e podem ser classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, de acordo com o seu papel no processo inflamatório. Os mediadores pró-inflamatórios induzem a liberação de outras citocinas e, assim, amplificam a inflamação, sendo as principais: TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN, enquanto que os anti-inflamatórios atenuam a inflamação (IL-4 e IL-10) (CREWS et al., 2006).

A interleucina 6 (IL-6) é produzida por diferentes tipos de células, tais como células T, células B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células tumorais (KISHIMOTO et al., 1989). É geralmente produzida em resposta a microrganismos e à estimulação por outras citocinas como o IL-1 e o TNF- α , promovendo a maturação de células que secretam anticorpos, atuando com outras citocinas e estimulando outras células do sistema imune (MCCLAIN et al., 1993; SOUZA et al., 2008).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é sintetizado principalmente por monócitos e macrófagos ativados (JOVINGE et al., 1996). Ele exerce suas atividades sobre as células através de dois receptores de membrana: TNFR1 e TNFR2, cuja interação pode ativar diversas vias de transdução de sinais com efeitos variados, tais como indução da necrose e apoptose, o estímulo à produção de outras citocinas inflamatórias e modulação da proliferação celular (LASO; PASTOR; ORFAO, 2005).

O álcool é uma droga conhecida por modular as respostas imunes inata e adaptativa de maneira complexa. Estudos têm relacionado seu consumo crônico ao desenvolvimento de doenças inflamatórias sistêmicas, pois seu uso compulsivo pode levar ao aumento dos níveis das citocinas inflamatórias no plasma e em uma variedade de tecidos, como fígado, pulmão e cérebro (EL-GUINDY; DE VILLIERS; DOHERTY, 2007; GONZALEZ-QUINTELA, et al., 2000; NEUMAN et al., 2015; TERASAKI; SCHWARZ, 2017). Alfonso-Loeches et al. (2010), por exemplo, mostraram que a ingestão crônica de etanol elevou os níveis das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α no córtex cerebral de camundongos.

O fígado é um órgão que desempenha um papel importante na resposta inflamatória tanto por ser um local potencial para o desenvolvimento de doenças crônicas, como por ser fonte de fagócitos (a maioria dos macrófagos fixos do

organismo residem no fígado, conhecidos com células de Kupffer) e citocinas (RAMADORI; ARMBRUST, 2001).

O etanol tem a capacidade de aumentar a permeabilidade da mucosa intestinal e, com isso, leva à translocação de endotoxinas de bactérias gram-negativas que colonizam o intestino à circulação porta, atingindo o fígado. Esses produtos bacterianos tóxicos estimulam a secreção de citocinas como o TNF- α pelas células de Kupffer, o que pode contribuir com posterior inflamação do tecido hepático (DONG et al., 2016). As endotoxinas ativam as células de Kupffer pela interação com o receptor CD14 e o receptor tipo Toll 4 (TLR4), promovendo sinais intracelulares que induzem o fator de transcrição NF κ B, que regula a síntese de TNF- α (SU, 2002). HANCK et al. (1998) demonstraram uma correlação entre o grau de endotoxemia e as concentrações plasmáticas de TNF- α e seus receptores com o gravidade da doença alcoólica hepática.

O estresse oxidativo causado pelo metabolismo etílico também é um fator que desempenha um importante papel na expressão aumentada de TNF- α induzida pelo etanol. Além de atuar como substâncias tóxicas, as EROs estimulam a transdução de sinais intracelulares, ativando o NF κ B que, por sua vez, leva a produção TNF- α (ZHOU et al., 2003).

O excesso de citocinas gerados por esses dois fatores induzidos pelo álcool podem desencadear processos bioquímicos que aumentam ainda mais a permeabilidade intestinal e a geração de EROs, aumentando a lesão tecidual e a inflamação (MCCLAIN et al., 1993). Um estudo realizado por Wang et al. (2002) demonstrou que injeções com baixas doses de endotoxinas em ratos foi seguido por um aumento nos níveis sanguíneos das citocinas TNF- α e IL-6.

Alguns pesquisadores apontam que esse desequilíbrio da produção das citocinas inflamatórias induzido pelo uso crônico de álcool contribui para o desenvolvimento de doenças hepáticas, em virtude de pacientes diagnosticados com doença hepática alcoólica apresentarem níveis elevados de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α no sangue e fígado, reduzindo na medida em que a função hepática melhorou (BODE; BODE, 2005; DANILUK et al., 2001). Segundo Bala et al. (2014), a administração de etanol resultou em um aumento rápido no nível do DNA ribossomal 16s (um marcador de translocação bacteriana do intestino) no sangue,

bem como das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α e quimiocinas no sangue de humanos.

2.5. Efeitos do álcool sobre o sistema nervoso central

O álcool é uma droga depressora do sistema nervoso central (SNC), podendo afetar qualquer parte de seu eixo (AMINOFF, 2007). As alterações no SNC causadas pela ingestão de bebidas alcoólicas são bem variadas, podendo ocasionar desde excitação ao coma. Os indícios iniciais da intoxicação alcoólica caracterizam-se por mudanças no humor, desinibição social, ataxia leve, disartria, rubor facial, taquicardia e midríase. Na medida em que esses sinais evoluem, passam a predominar os sintomas de depressão do SNC, levando ao coma, hiporreflexia, depressão respiratória e hipotensão arterial (HAES et al., 2010).

As alterações psicológicas e comportamentais provocadas pelo álcool estão relacionadas diretamente à concentração das doses das bebidas alcoólicas consumidas; porém, em alcoolistas crônicos, a tolerância aos efeitos da ingestão do etanol é maior quando comparada a de indivíduos não etilistas, ou seja, uma dose de álcool que pode ser fatal para um paciente não etilista, pode nem provocar sinais de intoxicação em etilistas crônicos (HAES et al., 2010). A tolerância é caracterizada por uma resistência que o organismo desenvolve atribuída a adaptação ao consumo contínuo do álcool, de modo que, o SNC torna-se tolerável a uma rotina de nível alcoólico na corrente sanguínea (REIS et al., 2014).

O etanol é capaz de atravessar facilmente através da barreira hematoencefálica, alcançando de forma rápida o SNC (APFEL et al., 2002). Estudos relacionados aos mecanismos envolvidos nos danos induzidos pelo álcool ao SNC sugerem que a ingestão dessa droga provoca desorganização geral da transmissão dos impulsos nervosos nas membranas excitáveis, mediada pelos principais sistemas de neurotransmissores, como GABAérgico, glutamatérgico, opióide, serotoninérgico e dopaminérgico. Essas interações resultam nos prejuízos mentais e comportamentais mencionados anteriormente (HAES et al., 2010).

O efeito depressor do SNC observado pelo uso do etanol está associado à sua afinidade pelos receptores inibitórios ácido γ -aminobutíricos (GABA). O álcool potencializa a ação desses receptores, através de mecanismos pré e pós-sinápticos,

levando a um efeito sedativo, ansiolítico e de descoordenação (DAVIS; WU, 2001; SILBERMAN; ARIWODOLA; WEINER, 2009).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Ele atua através de vários receptores, incluindo o do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato). Quando ocorre o consumo elevado de álcool, a atividade glutamatérgica é reduzida devido à sua atuação sobre os receptores NMDA (CREWS; NIXON, 2009).

Existem evidências de que o uso do álcool etílico está associado ao aumento da atividade opióide, reforçando os mecanismos de dependência alcoólica, fissura e sinais de abstinência, acompanhados por agitação, agressividade e depressão (TURCATEL; FUNCHAL; DOMEZ, 2012).

Ainda não está bem estabelecido o efeito do etanol sobre a serotonina; no entanto, alguns estudos demonstraram que essa droga pode reduzir os níveis de serotonina e suas projeções neuronais em embriões de ratas (SARI; ZHOU, 2004).

O álcool também pode afetar o sistema dopaminérgico. Tem sido apontado que a exposição às bebidas alcoólicas aumenta a liberação de dopamina, causando no indivíduo as sensações de prazer e euforia (REIS et al., 2014)

Os indivíduos dependentes do álcool geralmente apresentam alterações no número e na função dos neurotransmissores em resposta compensatória aos efeitos do álcool. Sabe-se que inicialmente o etanol potencializa o efeito do GABA e reduz o efeito do glutamato, mas sua exposição contínua leva a diminuição da ação sobre os receptores inibitórios GABA e aumento dos sítios de ligação do glutamato nos receptores NMDA, o que explica a tolerância alcoólica (WONG et al., 2008). Quando há suspensão repentina da ingestão de etanol, podem surgir sintomas como insônia, tremores, náuseas, sudorese, ansiedade, agitação e desordens mais severas como as crises convulsivas, características da Síndrome de Abstinência Alcoólica (SAA) (LUIS; LUNETTA; FERREIRA, 2016).

Além de agir sobre o sistema de neurotransmissores, tem sido demonstrado que a ingestão permanente das bebidas alcoólicas está associada ao aumento da produção de EROs e de acetaldeído, metabólito primário do etanol, que suprimem o sistema de defesa antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo. A oxidação do etanol pelo citocromo P4502E1 (CYP2E1) e pela catalase é particularmente relevante para o metabolismo do etanol no cérebro. O excesso dessas espécies reativas e de acetaldeído alteram a função neuronal, pois elas reagem com os

lipídios, alterando a fluidez da membrana celular, além disso, lesionam diretamente o material genético (ERUKAINURE et al., 2011; KRUMAN; HENDERSON; BERGESON, 2012) (Figura 2). As células nervosas são extremamente sensíveis aos efeitos nocivos do estresse oxidativo, uma vez que, apresentam alta taxa metabólica, concentração elevada de ácidos graxos insaturados e metais de transição, um sistema antioxidante menos eficiente e baixa capacidade regenerativa (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012).

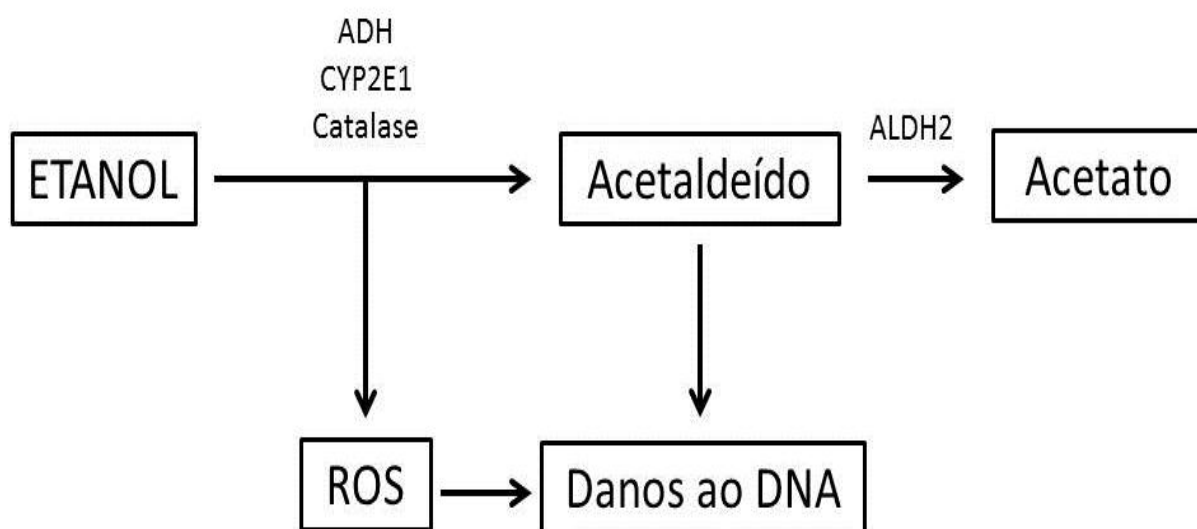


Figura 2. Esquema representando como o etanol pode danificar o DNA. Adaptado de Kruman; Henderson; Bergeson (2012).

O consumo de álcool durante a gestação fornece riscos aos desenvolvimentos embrionológico e fetal. Pesquisas têm demonstrado que o cérebro é o órgão mais vulnerável às consequências da exposição intrauterina ao álcool. Essa droga atua sobre o encéfalo de várias formas, dependendo da célula e do estágio de desenvolvimento embrionário, podendo provocar apoptose, interferir nas funções celulares, prejudicar a gênese de novas células, causar migração anormal dos neuroblastos e desorganizar a estrutura tecidual, interferindo na produção de neurotransmissores e causando a formação anormal de sinapses nervosas (ARONNE et al., 2011; FARBER; CREELEY; OLNEY, 2010; IERACI; HERRERA, 2007).

Esses danos geralmente são permanentes e irreversíveis e se manifestam como anormalidades neurológicas, alterações no comportamento e atrasos no desenvolvimento cognitivo (MOMINO; SANSEVERINO; SCHÜLER-FACCINI, 2008).

2.6. Efeitos do álcool sobre o fígado

O fígado é um órgão complexo que realiza muitas funções vitais para o organismo, cujo papel primordial é a homeostase. É responsável pelo metabolismo, síntese, acúmulo e redistribuição de nutrientes, carboidratos, lipídios e vitaminas (ZUH et al., 2012).

O metabolismo do álcool ocorre essencialmente no fígado, sendo, portanto, o órgão mais afetado pelos malefícios provocados pelo consumo crônico das bebidas alcoólicas (HENZEL et al., 2004). O consumo de álcool é o maior responsável pelo surgimento de doenças crônicas no fígado em países ocidentais. Nos Estados Unidos, por exemplo, a dependência alcoólica é apontada como causa de aproximadamente 48% das mortes relacionadas à cirrose e a maior contribuinte para a mortalidade acometida por doenças hepáticas no mundo (MINCIS; MINCIS, 2011).

Estudos têm demonstrado que hepatotoxicidade do etanol está estreitamente relacionada ao seu metabolismo. A formação de moléculas de acetaldeído, o aumento da produção de radicais livres (provocado principalmente pela oxidação do etanol no citocromo P450 2E1), a redução da enzima antioxidante glutatona, a desnutrição, a passagem de endotoxinas do intestino e, conseqüentemente, a ativação das células de Kupffer são essenciais para o desenvolvimento de enfermidades hepáticas (AMBADE; MANDREKAR, 2012; GAO; BATALLER, 2011).

O consumo crônico de álcool está relacionado ao surgimento de doenças hepáticas alcoólicas (DHA), como a esteatose (fígado gorduroso, devido ao acúmulo anormal de lipídios nos hepatócitos), a hepatite (causada por inflamação e necrose), a cirrose (relacionada ao excesso de fibrose) e até o carcinoma hepatocelular (AMINI; RUNYON, 2010; XIONGWEN et al., 2010). Estas não são, obrigatoriamente, as etapas de evolução das desordens hepáticas relacionadas ao etanol, pois mais de um desses estágios patológicos podem acometer um indivíduo simultaneamente (ZHU et al., 2012) (Figura 3).

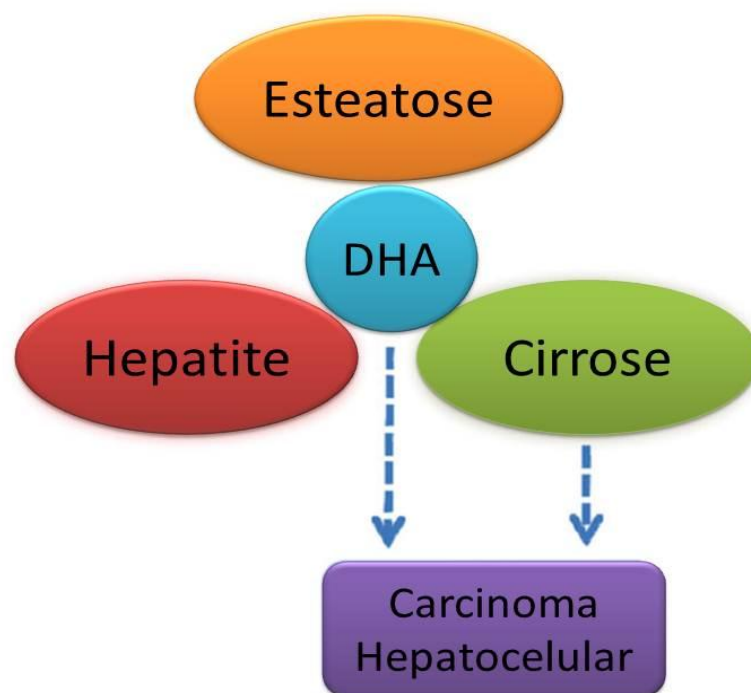


Figura 3. Espectro da doença hepática alcoólica (DHA). Observa-se que a cirrose é o processo patológico primário para o surgimento do carcinoma hepatocelular, porém, uma DHA pode evoluir para um câncer sem passar necessariamente pela cirrose. Adaptado de Zhu et al. (2012).

A esteatose hepática alcoólica é o primeiro e mais frequente dano induzido pelo etanol. Geralmente é um processo patológico menos grave e assintomático, desenvolvido pela maioria dos alcoolistas (O'SHEA; DASARATHY; MCCULLOUGH, 2010). É resultante da deposição elevada de gordura nos hepatócitos devido à inibição da oxidação dos ácidos graxos e aumento da lipogênese, a partir, principalmente de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol (BARAONA; LIEBER, 1979). Em condições menos complicadas, a esteatose localiza-se na zona centrolobular, porém, em condições mais severas pode situar-se por todo lobo hepático (MINCIS; MINCIS, 2011). O acúmulo de gordura hepática pode ser completamente reversível com a abstinência alcoólica (2-6 semanas), todavia, em caso de continuidade de ingestão etílica, essa condição pode evoluir para o desenvolvimento de tecido fibroso ao redor das veias hepáticas terminais, podendo estender-se para os capilares sinusóides adjacentes, levando a uma hepatite alcoólica ou a uma cirrose (ANDRADE, 2006; MINCIS, 2002).

A hepatite alcoólica é um processo patológico caracterizado por inflamação e lesão hepatocelular, geralmente ocasionada devido ao abuso do álcool por um período prolongado. O nível de severidade dessa doença é variável, apresentando-se desde forma assintomática até uma hepatite grave com falência do fígado e morte. Esta é a complicação precursora da cirrose mais importante, no entanto, não a sua única causa (MATOS, 2006; MINCIS, MINCIS, 2006).

O dano crônico ao fígado resulta em um processo de inflamação, que estimula o desenvolvimento da fibrose hepática como medida fisiológica de reparação tecidual. A fibrose é identificada pelo acúmulo excessivo de colágeno (I e III) e de outras proteínas na matriz extracelular. O colágeno é sintetizado pela ativação das células estreladas hepáticas (células de Ito) que se diferenciam em células com características de miofibroblastos (GARCIA et al., 2002; ROSA; BONA; MARRONI, 2008).

A cirrose hepática é uma doença resultante de longos períodos de agressão ao fígado, sendo considerada irreversível. É caracterizada pela disfunção hepática e pela deformação nodular do parênquima, consequente da fibrose. Essa é a forma mais comum para o surgimento do carcinoma hepatocelular avançado (PASSOS et al., 2010).

O consumo moderado ou excessivo das bebidas alcoólicas por indivíduos acometidos por doenças hepáticas de origem não alcoólica, tal como, a hepatite B pode elevar os danos hepáticos. Lin et al. (2013) demonstraram que o consumo pesado de álcool aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento de hepatocarcinoma em pacientes com cirrose relacionada a hepatite viral B.

Galligan et al. (2012) demonstraram que o estresse oxidativo é um fator primário no desenvolvimento das doenças hepáticas relacionadas ao consumo demasiado de álcool. As espécies reativas reagem com os lipídios de membrana e provocam a peroxidação lipídica que, por sua vez, altera a fluidez e a estrutura das membranas celulares, prejudicando sua permeabilidade no transporte iônico e sinalização, assim, prejudicando o transporte celular (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

O acetaldeído produzido pelo metabolismo do etanol é altamente prejudicial aos hepatócitos porque pode formar adutos (ligação de substâncias às bases do DNA) que interferem na síntese e no reparo do material genético (GALBIATTI et al.,

2013). Além disso, promove a depleção da enzima antioxidante glutatona, lesiona as mitocôndrias, provoca a morte celular e induz a peroxidação lipídica (GAO; BATALLER, 2011). O acetaldeído também tem sido apontado como um estimulador das células estreladas hepáticas e, conseqüentemente, da produção do colágeno do tipo I (HA et al., 2010).

Acredita-se que a ingestão crônica de álcool ainda esteja associada ao comprometimento da barreira intestinal, levando ao aumento de sua permeabilidade com passagem de endotoxinas bacterianas para o fígado por meio da circulação porta. Essa exposição estimula a ativação das células de Kupffer à liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, prostaglandinas e leucotrienos), resultando na inflamação hepática (MATOS et al., 2013). O aumento da síntese das citocinas inflamatórias pelas células de Kupffer e a elevação da produção das EROs e de acetaldeído resultantes do metabolismo etílico estimulam os fatores fibrinogênicos, cuja progressão causa a produção aumentada de fibras de colágeno na matriz extracelular, culminando em fibrose ou cirrose (AJAKAIYE et al., 2011).

2.7. Efeitos do álcool sobre os desenvolvimentos embrionário e fetal

O alcoolismo materno tem se tornado um hábito cada vez mais comum, constituindo um dos problemas mais relevantes da dependência alcoólica em todo o mundo. Muitas mulheres continuam com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas mesmo durante a gestação, apesar das recomendações médicas e campanhas públicas a respeito dos riscos da exposição pré-natal ao álcool (SKAGERSTRÖM; CHANG; NILSEN, 2011).

O uso do álcool é o vetor mais relevante de retardo mental nos filhos de mães usuárias dessa droga, além de ser o principal responsável por teratogênias no mundo. A ingestão de bebidas alcoólicas durante o período de gravidez pode levar a graves efeitos deletérios nos desenvolvimentos embrionário e fetal, como abortos espontâneos, natimortatidade, alterações na morfogênese de vários órgãos, prematuridade e/ou futuros problemas físicos, cognitivos e comportamentais inconvertíveis (COOK, 2003; MESQUITA, 2010).

A forma mais severa de condição patológica decorrente do uso do álcool durante a gravidez é denominada de Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Essa síndrome é caracterizada por combinação de dismorfias faciais (fissura labial, fenda

palatina, hipoplasia maxilar, fissuras palpebrais curtas, lábios superiores finos, orelhas sem paralelismo, pregas epicânticas, filtro labial indistinto, nariz curto e face plana), retardo nos crescimentos pré e/ou pós-natal, anormalidades estruturais e comprometimentos neurológicos. A criança ainda pode apresentar outras malformações congênitas, dificuldades de aprendizagem e de memória, problemas funcionais, emocionais e de comportamento (RIBEIRO et al., 1995; RIBEIRO; GONZALEZ, 1995; JONES, 2011) (Figura 4).



Figura 4. À esquerda, criança de quatro meses com SAF e a direita, essa mesma criança com oito anos de idade. Notar fissuras palpebrais curtas, lábios superiores finos e ausência de filtro labial (JONES, 2011).

A caracterização dessas malformações foi descrita e publicada pela primeira vez em 1968, na França, por Lemoine e colaboradores. Esses pesquisadores descreveram os graves efeitos adversos do álcool em 127 casos de crianças de mães alcoolistas (LEMOINE et al., 1968; JONES, 2011). Contudo, o termo Síndrome Alcoólica Fetal foi proposto por Jones e Smith, no ano de 1973, nos Estados Unidos, quando estabeleceram um padrão para as anormalidades presentes nos filhos de alcoolistas e critérios diagnósticos (JONES; SMITH, 1973; RIBEIRO; GONZALEZ, 1995). Foi identificado um conjunto característico de traços faciais dismórficos em crianças em que as mães haviam ingerido bebidas alcoólicas durante a gravidez associado ao retardo no crescimento e a disfunções cognitivas e comportamentais, perdurando na adolescência e na vida adulta (STREISSGUTH et al., 1991).

Com a finalidade de padronizar a nomenclatura referente às características parciais da SAF, o *Institute of Medicine (IOM) of the National Academy of Sciences*,

em Washington, nos Estados Unidos, em 1996, introduziu os termos: Defeitos Congênitos Relacionados ao Álcool (ARBD, do inglês, *Alcohol Related Birth Defects*) e Desordens do Neurodesenvolvimento Relacionados ao Álcool (ARND, do inglês, *Alcohol Related Neurodevelopmental Disorder*). A fim de simplificar a aplicação dos termos empregados pela IOM, Hoyme et al. (2005) chamou as alterações físicas, psicológicas, comportamentais e cognitivas relacionadas ao consumo materno de álcool de Espectro de Desordens Fetais Alcoólicas (FASD, do inglês, *Fetal Alcohol Spectrum Disorders*) que abrange a SAF, os ARBD e as ARND (JONES, 2011; MESQUITA; SEGRE, 2010).

O Espectro de Desordens Fetais Alcoólicas representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. O registro mundial da prevalência da SAF é variante. Estima-se que cerca de 1-2 de cada 1.000 nascidos vivos são diagnosticados com a síndrome (MAY; GOSSAGE, 2001). Os motivos que levam ao consumo de álcool durante a gestação são bastante complexos. Fatores como gravidez antes dos 30 anos, cultura, problemas psicológicos, baixo nível socioeconômico, menor escolaridade, desnutrição, predisposição genética, desestrutura familiar, gravidez não planejada e o uso concomitante de outras drogas, podem estar fortemente ligados à susceptibilidade para o desenvolvimento da SAF (MESQUITA; SEGRE, 2010; RAMALHO; SANTOS, 2015; SOUSA; ROSS, 2015).

Diversos estudos já demonstraram que os danos causados pelo álcool no desenvolvimento embrionário são evidentes logo após o nascimento ou no decorrer da infância. O sistema nervoso central é o mais prejudicado, apresentando níveis de gravidade distintos (MATTA et al., 2008). No entanto, a exposição intrauterina ao álcool também pode afetar a organogênese do coração, dos rins, do fígado, além de provocar dermatites atópicas (SHEN et al., 2014).

Diferentes mecanismos têm sido apresentados para justificar os efeitos teratogênicos provocados pelo álcool no desenvolvimento embriológico, tais como o aumento do estresse oxidativo, alteração no metabolismo da glicose, das proteínas, dos lipídios e do DNA, aumento da apoptose, principalmente em células da crista neural e defeitos na expressão genética (BROCARD et al., 2012; ORNOY; ERGAZ, 2010).

O álcool é uma substância teratogênica que atravessa livremente a placenta, por um gradiente de concentração, sem que este seja modificado, de forma que, em pouco tempo, o etanol absorvido pelo feto ou embrião é equivalente ao da mãe (JONES; BASS, 2003). Contudo, a exposição fetal ao álcool é maior porque seu metabolismo e processos de eliminação são mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado pelo etanol e pelo seu metabólito, o acetaldeído, o que expõe ainda mais o feto aos seus efeitos tóxicos (JONES; SMITH, 1973; FREIRE et al., 2005). O álcool também prejudica o transporte normal dos nutrientes essenciais ao feto realizado pela placenta e favorece a desnutrição materna, levando a vasoconstricção da placenta e dos vasos umbilicais, podendo resultar em hipóxia (GRINFELD et al., 2000). A placenta humana possui pouca capacidade metabólica para o álcool e o fígado fetal ainda não apresenta um sistema competente para oxidá-lo, de modo que, a diminuição da concentração alcoólica ocorre pela reentrada na circulação materna (BURD et al., 2007).

O etanol consumido pela mãe também é transferido ao bebê através do leite materno, na proporção de 2% da alcoolemia materna. Crianças amamentadas por mães alcoolistas podem apresentar alterações nos padrões de sono, mamar pouco, ser irritável, hiperexcitado, apresentar tremores, hipotonia muscular, transpirar bastante e ter apneia. Mais tarde, a criança pode apresentar comprometimentos neuromotor e de aprendizagem (NICCOLS, 2007).

Apesar da existência de diversas pesquisas sobre o tema, não se sabe até o momento a dose segura que uma gestante pode consumir de álcool. Porém, se conhece que a severidade dos danos fetal e embriológico devido ao álcool depende da frequência e da quantidade consumida, de modo que, quanto maior o consumo de bebidas alcóolicas por mulheres grávidas, maior as chances de prejudicar o bebê. Além disso, o período da gestação em que a mãe ingeriu a substância, a idade materna, aspectos genéticos, nutricionais e físicos também interferem. Por isso, é recomendável a total abstinência do consumo de álcool durante toda a gravidez, bem como se aconselha que a mãe que ingeriu algum tipo de bebida alcoólica deixe de amamentar nas horas seguintes a ingestão, a fim de evitar os danos causados pelo etanol no feto ou recém-nascido (DOMINGUES; TOLEDO; MORAES, 2009; GIL-MOHAPEL et al., 2010).

2.8. Melatonina: estrutura, síntese e mecanismos de ação

A melatonina (N-Acetil-5-Metoxitriptamina) é um hormônio produzido e secretado principalmente na glândula pineal (ALMEIDA et al., 2016). Essa molécula foi isolada e identificada estruturalmente pela primeira vez em 1958, por Aron Lerner e seus colaboradores, a partir de extratos de pineais bovinas (LERNER et al., 1958) (Figura 5).

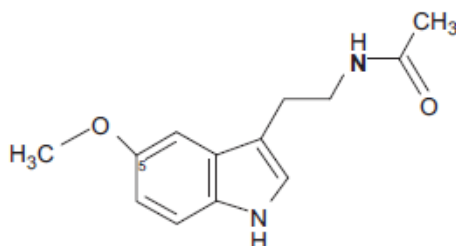


Figura 5. Estrutura química da melatonina (CHEN et al., 2012).

A melatonina pertence ao grupo das indolaminas. Em vertebrados, sua síntese ocorre nos pinealócitos (principais células que compõem a pineal) e é regulada pelos ciclos de iluminação ambiental, sendo estimulada durante a fase de escuridão e inibida na presença de luz (STEHLER et al., 2011). Consequentemente, a informação temporal percebida é enviada ao meio interno, modulando as funções fisiológicas e comportamentais associadas aos ciclos circadianos e sazonais, fundamentais para a adaptação dos indivíduos às alterações temporais cíclicas do ambiente (HIRIART et al., 2012).

O ritmo diário da produção de melatonina depende principalmente de vias neurais que controlam sua ritmicidade circadiana. Os impulsos nervosos resultantes da estimulação dos fotorreceptores (cones e bastonetes) da retina pela luz, através da via retino-hipotalâmica, projetam-se para o núcleo supraquiasmático (NSQ) (estrutura localizada no hipotálamo que atua como um relógio endógeno) e para o núcleo paraventricular do hipotálamo. As variações rítmicas no NSQ projetam-se para os gânglios cervicais superiores (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; MARKUS; BARBOSA JÚNIOR; FERREIRA, 2003). Durante a fase de escuro, as fibras simpáticas pós-ganglionares liberam noradrenalina na pineal que estimulam os receptores β -adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos, promovendo a ativação da via dependente de AMP cíclico que desencadeia a produção de melatonina pela expressão gênica da enzima N-acetiltransferase, etapa limitante para

a produção da melatonina (CARPENTIERI et al., 2012; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

A cascata de eventos envolvidos na biossíntese de melatonina conta com a ação de quatro enzimas: triptofano-hidroxilase, descarboxilase de L-aminoácido aromático, N-acetiltransferase e hidroxindol-O-metiltransferase (GARCÍA et al., 2014). Inicialmente, o aminoácido triptofano, presente na corrente sanguínea, é capturado e sofre uma hidroxilação através da enzima triptofano-hidroxilase, sendo convertido em 5-hidroxitriptofano que, em seguida, é descarboxilado sob a ação da enzima descarboxilase de L-aminoácido aromático e transformado em serotonina. Durante o escuro, a enzima N-acetiltransferase converte a serotonina em N-acetilserotonina. Este composto, por sua vez, é oximetilado em melatonina pela atividade da enzima hidroxindol-O-metiltransferase (CARPENTIERI et al., 2012; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009). Depois de produzida, a melatonina é liberada para a circulação sanguínea, atingindo fluidos, tecidos e compartimentos celulares. Seu transporte plasmático se dá principalmente acoplado à albumina (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008) (Figura 6).

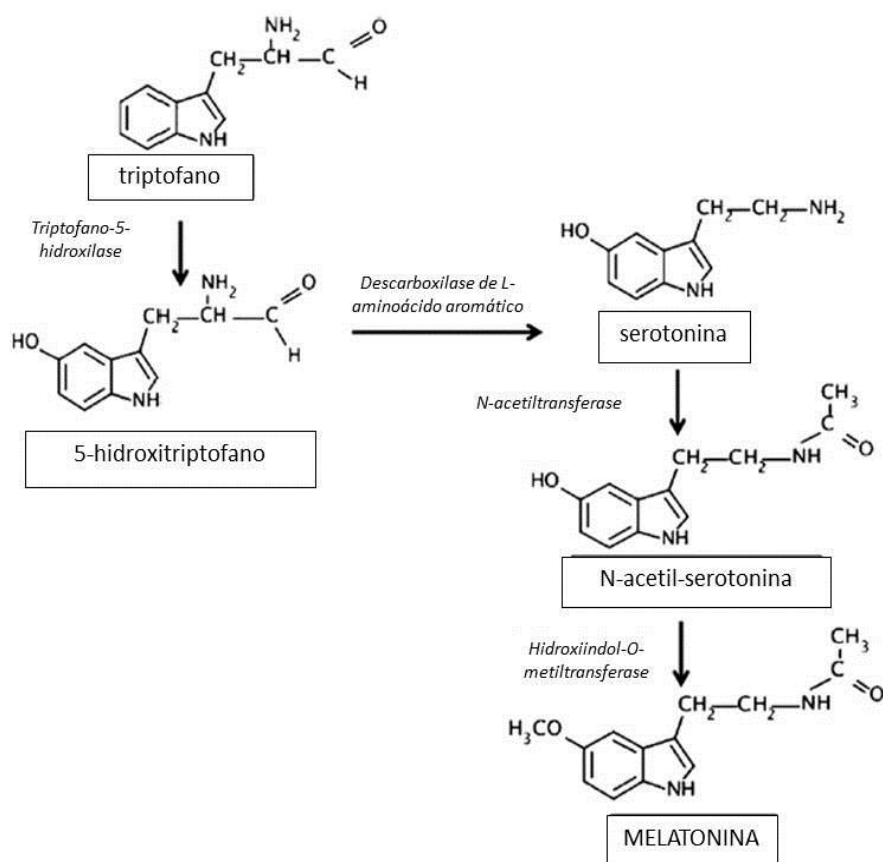


Figura 6. Biossíntese da melatonina. Adaptado de Carpentieri et al. (2012).

A vida média da melatonina circulante dura em torno de 20 minutos e seu metabolismo ocorre particularmente no fígado. Nesse progresso, a melatonina segue uma via de hidroxilação, envolvendo enzimas do sistema citocromo P450, que catalisam a formação de 6-hidroximelatonina. Esse composto sofre conjugação com sulfatos ou com glicuronídeos, formando o metabólito 6-sulfatoximelatonina que é eliminado na urina (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

Por muitos anos após sua descoberta, a melatonina foi considerada como secretada exclusivamente pela glândula pineal e se limitava apenas ao controle dos ritmos circadiano e sazonal, incluindo a reprodução sazonal. No entanto, a presença de enzimas ligadas à melatonina foram subsequentemente descobertas na retina, no cerebelo e em muitos outros tecidos, levando à descoberta da produção de melatonina fora da pineal (CARDINALI; ROSNER, 1971; BUBENIK et al., 1974). Contudo, a produção extrapineal de melatonina não é controlada pelos ciclos de iluminação ambiental e atua de forma autócrina e parácrina, possivelmente, protegendo as células contra danos inflamatórios e oxidativos (GARCÍA et al., 2014). A existência da síntese de enzimas-chave, de receptores para este hormônio em muitos tecidos e de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias levaram os pesquisadores a considerar a melatonina como uma molécula com múltiplas funções (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2014).

A melatonina contém dois grupos funcionais, os resíduos O-metil e N-acetil, conferindo a essa molécula, propriedade anfifílica (hidro e lipossolúvel), o que a permite alcançar facilmente diversos compartimentos celulares, agindo diretamente nas células através de ações não mediadas por receptores, bem como, por receptores nucleares e de membrana específicos (CARPENTIERI et al., 2012; MOHD et al., 2011; GARCÍA et al., 2014).

Atualmente, estão descritos três sítios de ligação para a melatonina. Dois tipos de receptores de membrana, o MT1 e o MT2 são receptores tipicamente de sete alças e acoplados à proteína G (CAMPINO et al., 2008; DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). Ambos os receptores estão presentes em diversos órgãos. Os receptores MT1 já foram encontrados no cérebro, sistema cardiovascular, sistema imune, testículos, ovários, fígado, adrenais, rins, placenta e útero (CAMPINO et al., 2008; SLOMINSKI et al., 2012; TORRES-FARFAN et al., 2003; VENEGAS et al., 2013). Os receptores MT2 são expressos no sistema imune,

hipotálamo, núcleo supraquiasmático, retina, trato gastrointestinal, glândulas mamárias e tecido adiposo (SLOMINSKI et al., 2012). O terceiro tipo de receptor de membrana, o MT3, é uma enzima identificada como uma quinona redutase 2, membro da superfamília de receptores nucleares RZR/ROR. Eles já foram encontrados em fígado, rins, coração e tecido adiposo de hamsters e retina de coelhos e, estão geralmente ligados à proteção contra o estresse oxidativo (ROCHA et al., 2011; SLOMINSKI et al., 2012).

Este hormônio é um ligante natural para receptores nucleares identificados como receptores órfãos ROR que incluem três subtipos: α , β e γ (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2014; EKMEKCIOGLU, 2006).

Além de atuar como um sinal fotoperiódico ao meio interno, a literatura tem demonstrado que a melatonina também está relacionada a vários processos fisiológicos, incluindo a digestão de alimentos, controle do sono, o processo de inflamação, atividades do ciclo reprodutivo, ações anti-apoptóticas e como um poderoso antioxidante (DING et al., 2014; REITER et al., 2012; SILVA; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2015; TAMURA et al., 2014).

2.9. O papel antioxidante da melatonina

Desde a descoberta do alto poder antioxidante da melatonina, é crescente a quantidade de pesquisas documentando sua eficiência nas diversas espécies animais. Esses trabalhos têm demonstrado que essa indolamina é capaz de proteger efetivamente os sistemas biológicos contra o estresse oxidativo (CHABRA et al., 2014; GHOSH et al., 2016; SUWANJANG et al., 2016).

O importante papel antioxidante da melatonina é atribuído principalmente a sua natureza anfifílica que a permite cruzar livremente as barreiras morfofisiológicas encontradas nos tecidos, nas células e nos compartimentos celulares, incluindo o núcleo e a mitocôndria, preservando as membranas celulares, proteínas e os genomas nuclear e mitocondrial (HERRUZO; MUNOZ, 2009).

A melatonina pode auxiliar na redução dos danos oxidativos por diferentes meios. Ela pode atuar diretamente, capturando e neutralizando as ERO e ERN antes que estas tragam prejuízos às células (FERRARO; LÓPEZ-ORTEGA, 2008) ou de forma indireta, estimulando o aumento da síntese de algumas enzimas do sistema

antioxidante e potencializando a função mitocondrial, reduzindo a formação de radicais livres (DING et al., 2014; KÜCÜKAKIN et al., 2009; ZHNAG; ZHANG, 2014).

Depois de passar pela membrana, a melatonina dispõe-se, principalmente, na região superficial da bicamada lipídica, próximo à cabeça polar dos fosfolipídios. Nessa localização ela pode atuar como um “removedor” (*scavenger*) das espécies reativas, além de ajudar na estabilização e fluidez da membrana, preservando sua eficiência (CARPENTIERI et al., 2012; SOUZA; MORAES, 2016).

Devido à presença de um anel aromático rico em elétrons, a melatonina possui propriedades redutoras, agindo como uma poderosa doadora de elétrons, capaz de neutralizar os radicais livres (SOUZA; MORAES, 2016).

A melatonina também pode atuar como antioxidante de maneira indireta, através da estimulação da atividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase e superóxido dimutase (SOD) (REITER et al., 2003; SOUZA; MORAES, 2016). Esse hormônio tem a capacidade de aumentar os níveis celulares de RNA mensageiro para essas enzimas, provavelmente por regular sua expressão gênica (REITER, 2000).

A mitocôndria é o maior alvo da melatonina. Tem sido demonstrado que a melatonina protege a mitocôndria contra os danos oxidativos e melhora seu funcionamento. Na mitocôndria, esse hormônio detoxifica diretamente as ERO e ERN, removendo esses radicais livres, aumenta os níveis das enzimas antioxidantes e diminui a geração de enzimas pró-oxidantes, estabiliza membrana mitocondrial interna, mantendo sua integridade, melhora a atividade mitocondrial na cadeia transportadora de elétrons, a respiração mitocondrial e a formação de ATP, reduzindo a formação dos radicais livres (ZHNAG; ZHANG, 2014).

2.10. Melatonina e gestação

A melatonina tem sido apontada como um importante hormônio para a fisiologia fetal, visto que, alguns estudos têm demonstrado a expressão de receptores para este hormônio em órgãos fetais como o cérebro, o fígado, os rins e as gônadas (GOLDMAN, 2003; SAGRILLO-FAGUNDES et al., 2016; THOMAS et al., 2002; WEAVER; NAMBOODIRI; REPPERT, 1988; YELLON; LONGO, 1988).

Conforme demonstrado em alguns mamíferos, a pineal fetal ainda não tem a capacidade de secretar melatonina, sendo as oscilações circadianas maternas,

responsáveis pela organização temporal do feto (SÉRÓN-FERRÉ et al., 2012). A melatonina materna é transferida ao feto através da placenta (TAMURA et al., 2008). Lanoix; Ouellette; Vaillancourt (2006) e Maekawa et al. (2007), em pesquisa com ratas, demonstraram que os níveis de melatonina sérica aumentaram do 12º ao 21º dia de gestação, declinando logo após o parto.

Os níveis séricos de melatonina neonatal são muito baixos nas primeiras semanas de vida; no entanto, a melatonina materna também é capaz de passar para o recém-nascido via leite materno, sincronizando temporalmente sua fisiologia (BISHNUPURI; HALDAR, 2000; CARPENTIERI et al., 2012).

Além de exercer importante papel na sincronização dos ritmos biológicos fetais e neonatais, foi mostrado que a melatonina da mãe também possui efeitos protetores nas células/tecidos de embriões e fetos, uma vez que possui uma poderosa atividade antioxidante, atuando na redução do estresse oxidativo em várias partes do corpo, como ovários, placenta e feto (REITER et al., 2013).

2.11. Modelos de avaliação de danos ao DNA

A exposição a agentes genotóxicos (físicos, químicos ou biológicos) está intimamente relacionada ao desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde humana, tais como malformações, doenças congênitas e degenerativas, envelhecimento celular e câncer (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013). Dentre os agentes químicos capazes de provocar alterações no DNA, o álcool, maior componente das bebidas alcólicas, merece importante destaque (BENASSI-EVANS; FENECH, 2011).

Desse modo, os testes de genotoxicidade representam uma importante ferramenta para a avaliação da toxicidade celular para identificar o potencial de mutagenicidade de um determinado produto físico, químico ou biológico e, consequentemente, proteger o material genético. Diversos ensaios são utilizados para a detecção de agentes mutagênicos, incluindo a detecção de danos ao DNA, aberrações cromossômicas e mutações genéticas *in vitro* e *in vivo*, todavia, o teste do micronúcleo e o ensaio cometa têm sido altamente empregados para essa finalidade, sendo conceituados como padrão ouro nos testes citogenéticos (BAUSINGER; SPEIT, 2016; BOLOGNESI; HOLLAND, 2016).

2.11.1. Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos são pequenos corpos nucleares adicionais localizados à parte do núcleo principal das células-filhas, formados a partir da extrusão de cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos que não foram incluídos no núcleo principal durante a divisão celular, sendo uma parte de cromatina resultante de mitoses aberrantes (RAMIREZ; SALDANHA, 2002). É concebido devido às alterações estruturais cromossômicas espontâneas, decorrentes de fatores ambientais ou a falhas no fuso mitótico. Os micronúcleos possuem cromatina semelhante a do núcleo principal, diâmetro menor que um terço do núcleo, formato arredondado ou oval e localização intracitoplasmática (CARRARD et al., 2007; LOBO; BOLAÑOS, 2014) (Figura 7).

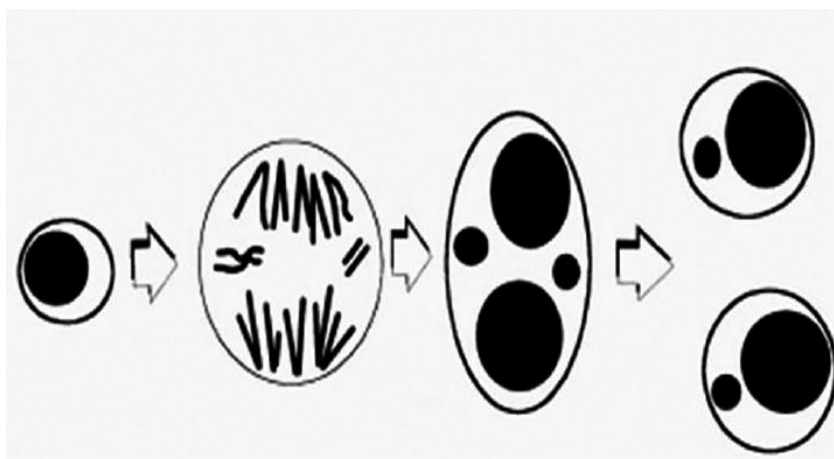


Figura 7. Formação de micronúcleos na divisão celular (SABHARWAL et al., 2015).

Ainda que os mecanismos celulares de reparo sejam altamente minuciosos, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes clastogênicos (que quebram os cromossomos) e aneugênicos (que interferem na formação do fuso mitótico, induzindo a segregação cromossômica anormal), responsáveis por aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

Devido a sua associação com as aberrações cromossômicas, os micronúcleos vêm sendo reconhecidos como biomarcadores de mutagenicidade em organismos expostos a agentes genotóxicos (MOREIRA et al., 2010). Desde 1973, os micronúcleos têm sido objeto de estudo como indicador de exposição genotóxica

baseados em experimentos com radiação, conduzidos por Brenneke e Mather (HEDDLE et al., 1983).

O teste do micronúcleo é um ensaio desenvolvido primariamente para detectar possíveis danos cromossômicos em células previamente expostas a agentes químicos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008), proposto pela primeira vez em 1975, por Schmid, em uma metodologia realizada com células da medula óssea de roedores *in vivo* (SCHIMID, 1975). Desde então, trabalhos subsequentes envolvendo células vegetais, animais e, inclusive, humanas tanto *in vitro* como *in vivo* foram sendo desenvolvidos (BANNISTER et al., 2016; KOTOVA, 2015).

O teste do micronúcleo *in vivo* em mamíferos é especialmente relevante para avaliar riscos mutagênicos na medida em que permite a consideração de fatores como o metabolismo *in vivo*, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA, embora estes possam variar entre as espécies e entre os tecidos. Um ensaio *in vivo* também é importante para uma investigação mais aprofundada de um efeito mutagênico detectado por um sistema *in vitro*. Geralmente é avaliada a formação de micronúcleos em eritrócitos oriundos da medula óssea ou de células sanguíneas periféricas de animais, na maioria das vezes, roedores (OECD, 2016).

O teste do micronúcleo em eritrócitos imaturos (policromáticos) tem sido aplicado juntamente com outros testes clássicos de mutagenicidade para a avaliação de agentes com potencial mutagênico (OLIVEIRA et al., 2016) (Figura 8).

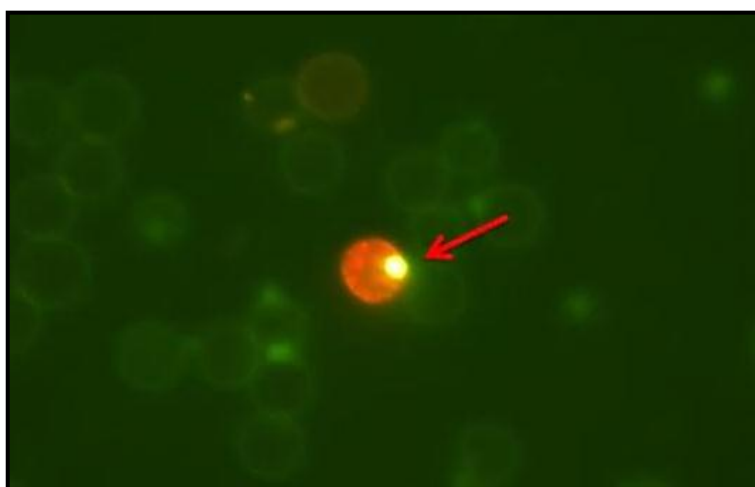


Figura 8. Eritrócito policromático micronucleado (seta vermelha) e eritrócitos normocromáticos (em verde) (SOUZA, 2016).

O teste do micronúcleo é extremamente relevante em estudos toxicológicos genéticos e ambientais, uma vez que, o aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados é uma indicação de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, podendo ser considerado um indicador prévio para a carcinogênese (BONASSI et al., 2011). Esse teste tem sido utilizado com sucesso em diversos experimentos de monitoramento ecológico, avaliação dos efeitos genotóxicos da exposição a compostos químicos, tais como agrotóxicos, medicamentos e drogas, apontando para a necessidade da implementação de medidas de segurança para diminuição dos riscos à saúde (KHAYAT et al., 2013; MARTINS; PAZ; BRENTANO, 2010; NERSESYAN et al., 2011).

Quando comparado aos demais testes citogenéticos, o teste do micronúcleo oferece muitas vantagens. É considerado um método de avaliação simples e mais rápido, realizado a baixo custo e concomitantemente confiável, visto que, é sensível e, por isso, monitora com precisão as alterações cromossômicas causadas pelos agentes químicos. Além disso, apresenta uma produtividade satisfatória, dado que, a metodologia já foi adaptada por diversos autores em diferentes espécies animais (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Estudos têm relacionado o consumo excessivo de álcool à capacidade de produzir lesões genéticas em diversos órgãos, resultando em uma variedade de patologias que podem levar ao surgimento de câncer (BAGNARDI et al., 2013; VALERA-REY et al., 2013). A habilidade que o álcool possui em produzir aneuploidia é importante para sua associação com câncer em geral (ROBBINS et al., 1997). Pesquisas têm demonstrado os efeitos mutagênicos do álcool em cromossomos de mamíferos *in vitro* e *in vivo* (BARDAG-GORCE et al., 2006; KOTOVA et al., 2013; SING; LAI; KHAN, 1995).

O teste do micronúcleo tem sido utilizado como um modelo experimental para a avaliação do efeito genotóxico do etanol nos diversos tecidos do corpo. Consequentemente, é de suma importância para a detecção da ação do álcool como um agente genotóxico, especialmente da detecção pré-clínica no processo da formação de desordens (KAYANI; PARRY, 2010).

2.11.2. Ensaio cometa ou Eletroforese de Célula Única

O ensaio cometa, também conhecido como Eletroforese de Célula Única, é uma das técnicas mais usadas atualmente para a detecção da toxicologia genética, graças a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas, analisando danos e reparos no DNA em diversos tipos celulares em resposta a uma série de agentes nocivos a saúde (KAMMANN et al., 2001).

O teste é eficiente na identificação de diferentes tipos de lesões no DNA, tais como quebras de fita simples e de fita dupla, danos a sítios álcali lábeis e *crosslinks*. Essas lesões são passíveis de reparo. Quando reparadas, resultam em nenhum efeito persistente. Caso não sejam reparadas, podem gerar mutação, mas essa mudança não ter influencia sobre a atividade celular ou mesmo causar uma mutação que leva a perda de função celular, provocando a morte da célula por apoptose. Elas também podem conduzir a danos cromossômicos associados a muitas doenças humanas, incluindo as neoplasias (OECD, 2014).

O princípio da técnica é simples. Neste teste, as células a serem estudadas são incluídas em gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia; em seguida, são lisadas, utilizando um detergente com altas concentrações salinas e posterior desespiralização do DNA. Depois, a amostra passa por uma corrente elétrica com pH elevado. As lâminas são posteriormente coradas com um corante fluorescente (o brometo de etídio é mais comumente utilizado) e analisadas em um microscópio de fluorescência. Em caso de clastogênese, os fragmentos de DNA migram para longe da “cabeça” na “cauda”. A extensão do DNA deslocado durante a eletroforese reflete o tamanho e a quantidade da quebra do DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

As lâminas são avaliadas de acordo com o comprimento e a quantidade de DNA presente na “cauda”, comparada à chamada “cabeça” do cometa. Os danos são qualificados em cinco classes: 0 = sem dano visível; 1 = dano mínimo; 2 = dano médio; 3 = dano médio com cauda mais longa; 4 = dano máximo. Geralmente, 100 cometas são contados e cada um deles recebe um valor de 0-4 de acordo com a sua classificação (Figura 9) (COLLINS, 2004).

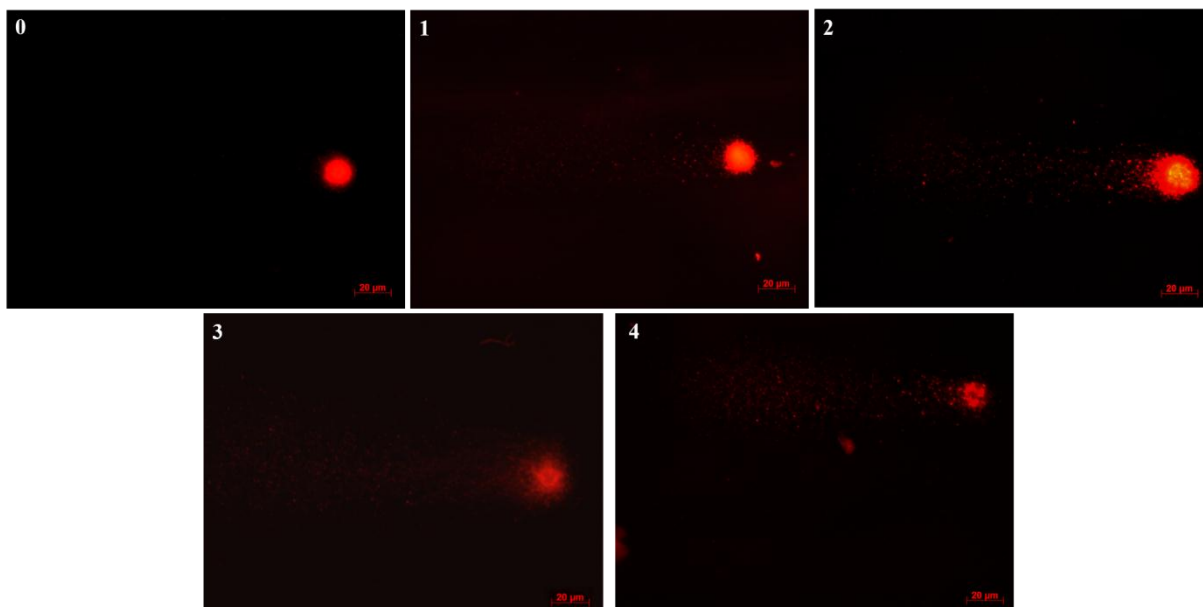


Figura 9. Imagens de cometas de linfócitos, representando as classes 0-4 usadas na mensuração dos danos. Arquivo pessoal.

Na década de 70, Peter Cook e colaboradores, desenvolveram um modelo de estrutura do nucleóide, técnica que investiga a estrutura nuclear, baseada na lise da célula. Para isso, utilizaram um detergente não iônico com alta concentração de cloreto de sódio. Este tratamento promovia a remoção das membranas, do citoplasma e do nucleoplasma, restando apenas o nucleossomo sem as histonas, porém, com o DNA ainda espiralizado (COOK et al., 1976).

Mais tarde, Östling; Johanson (1984), baseados nas vantagens do procedimento desenvolvido pela pesquisa anterior, no entanto, com maior sensibilidade e resolução, demonstraram os primeiros “cometas”. Nesse teste, as células individualizadas eram embebidas em gel de agarose; posteriormente, essas células eram lisadas por detergentes contendo alta concentração de sais e submetidas à eletroforese em condições neutras. O DNA danificado migrava para além do nucleóide, em direção ao ânodo, devido a sua carga negativa. Porém, as condições neutras utilizadas limitavam o emprego do ensaio, pois somente quebras de fita dupla podiam ser detectadas (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; TICE et al., 2000).

A versão alcalina ($\text{pH} > 13$) do ensaio cometa foi introduzida por Singh et al. (1988). A eletroforese em condições alcalinas potencializa a migração do DNA e

permite a detecção dos níveis de quebras de fitas simples, quebras de fitas simples relacionadas à extração de sítios de reparo, além de quebras de fitas duplas. Desde então, essa técnica vem sendo amplamente aplicada em diversos estudos genotóxicos (KHISROON et al., 2015; ŞAHİN; PIRINÇ; TÜRKOĞLU, 2015; SÖYLEMEZ et al., 2017).

Diferentemente do teste do micronúcleo que detecta mutações já estabelecidas, o ensaio cometa é uma técnica mais sensível porque é capaz de verificar a presença de danos pré-mutagênicos no DNA. Essas lesões podem ser reparadas, porém, caso o reparo não ocorra, podem resultar em mutação (GONTIJO; TICE, 2003).

Comparado a outros testes citogenéticos, o ensaio cometa ainda apresenta outras vantagens que incluem: rapidez, simplicidade, baixo custo, boa reprodutibilidade e pode ser aplicado a qualquer tipo de célula (desde que nucleadas), sendo necessário um pequeno número delas e não necessita que estas estejam em divisão (TICE et al., 2000).

Esse teste tem sido bem utilizado em diversas áreas da biologia, abrangendo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, diagnósticos, radiação biológica e ecotoxicologia genética (BÜCKER et al., 2012; CARBAJAL-LÓPEZ et al., 2016; KUMAR et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito protetor da melatonina exógena sobre os neonatos de matrizes expostas ao consumo crônico de álcool durante a prenhez.

3.2. Específicos

- Investigar a frequência de danos genotóxicos no sangue e fígado das matrizes e dos neonatos e, no cérebro dos neonatos através do ensaio cometa;
- Verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos circulantes das matrizes e dos neonatos;
- Avaliar o comprimento e o peso ao nascer dos neonatos;
- Analisar alterações nos hepatócitos dos neonatos através de métodos morfométricos;
- Quantificar o glicogênio e o colágeno hepáticos por meio de métodos histoquímicos;
- Examinar a expressão das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) no fígado dos neonatos.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n.16, p. 2997-3025, 2014.
- AJAKAIYE, M. et al. Alcohol and hepatocyte-Kupffer cell interaction (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 4, p. 597-602, 2011.
- ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 24, p. 8285-8295, 2010.
- ALMEIDA, L. L. et al. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 174-179, 2016.
- AMBADE, A.; MANDREKAR, P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. **International Journal of Hepatology**, v. 2012, article ID 853175, p. 1-9, 2012.
- AMINI, M.; RUNYON, A. A. Alcoholic hepatitis: a clinician's guide to diagnosis and therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 39, p. 4905-4912, 2010.
- AMINOFF, M. J. **Neurology and General Medicine**. 4th. Ed.: Churchill Livingstone, 2007.
- ANDRADE, Z. A. As relações entre álcool e fibrose hepática. **Arquivos Médicos do ABC**, Supl. 2, p. 17-18, 2006.
- APFEL, M. I. R.; ÉSBERARD, C. A.; RODRIGUES, F. K. P.; JÚNIOR, F. M. B.; SILLERO, R. Estudo estereológico das células de Purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos wistar. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 60, n. 2-A, p. 258-263, 2002.
- APTE, M. V.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, n. 12, p. 1816-1826, 2010.
- ARONNE, M. P. et al. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. **Experimental Neurology**, v. 229, p. 364-371, 2011.
- BAGNARDI, V. et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 2, p. 301-308, 2013.
- BALA, S. et al. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96864, 2014.
- BANNISTER, L. A. et al. Dose and radioadaptive response analysis of micronucleus induction in mouse bone marrow. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1-16, 2016.
- BANSAL, S. et al. Mitochondria-targeted cytochrome P450 2E1 induces oxidative damage and augments alcohol-mediated oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24609 -24619, 2010.
- BARAONA, E.; LIEBER, C. S. Effects of ethanol on lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 20, N. 3, p. 289-315, 1979.

- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARDAG-GORCE, F. et al. Gene expression patterns of the liver in response to alcohol: In vivo and in vitro models compared. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 80, n. 3, p. 241-251, 2006.
- BAUSINGER, J.; SPEIT, G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay, **Mutagenesis**, v. 31, n. 5, p. 567-572, 2016.
- BENASSI-EVANS, B.; FENECH, M. Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell lines. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 421-429, 2011.
- BISHNUPURI, K. S.; HALDAR, C. Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female Indian palm squirrel *Funambulus pennant*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 974-981, 2000.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.
- BODE, C.; BODE, J. C. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. s2, 2005.
- BOHLAND, A. K.; GONÇALVES, A. R. Mortalidade atribuível ao consumo de bebidas alcoólicas. **Revista Eletrônica de Saúde Mental Álcool e Drogas**, v. 11, n. 3, p. 136-144, 2015.
- BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research**, v. 770, p. 183-203, 2016.
- BONASSI, S. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011.
- Brites, R. M. R.; ABREU, A. M. M.; PINTO, J. E. S. S. Prevalência de alcoolismo no perfil das aposentadorias por invalidez dentre trabalhadores de uma universidade federal. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 67, n. 3, p. 373-380, 2014.
- BROCARD, P. S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1, p. 209-225, 2011.
- BUBENIK, G. A. et al. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. **Brain Research**, v. 81, n. 2, p. 233-242, 1974.
- BUCKER, A. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 1, p. 65-73, 2012.

- BURD, L. et al. Ethanol and the placenta: a review. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 20, n. 5, p. 361-375, 2007.
- CAMPINO, C. et al. La melatonina reduce la respuesta de cortisol al ACTH em humanos. **Revista Médica do Chile**, Santiago, v. 136, n. 11, p. 1390-1397, 2008.
- CAO, Y. et al. Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. **British Medical Journal**, v. 18; 351:h4238, 2015.
- CARBAJAL-LÓPEZ, Y. et al. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2513-2520, 2016.
- CARDINALI, D. P.; ROSNER, J. M. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. **Endocrinology**, v. 89, n. 1, p. 301-303, 1971.
- CARLINI, E. A. et al. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil**. Secretaria Nacional Antidroga (SENAD) – Centro Brasileiro de Informações sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas (CEBRID). Departamento de Psicologia, UNIFESP. Brasília, 2006.
- CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.
- CARRARD, V. C. et al. Teste dos Micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade Odontológica de Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.
- CAVALCANTE, M. B. P. T.; ALVES, M. D. S.; BARROSO, M. G. T. Adolescência, álcool e drogas: uma revisão na perspectiva da promoção da saúde. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 555-559, 2008.
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. **Clinical Liver Disease**, v.16, n. 4, p. 667-685, 2012.
- CHABRA, A. et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 185-195, 2014.
- CHALLIS, J. R. et al. Inflammation and pregnancy. **Reproductive sciences**, v. 16, n. 2, p. 206-215, 2009.
- CHEN, Y. C. et al. Melatonin utility in neonates and children. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, n. 2, p. 57-66, 2012.
- CHUFFA, L. G. A. et al. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. **Reproductive Biology and endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 108, 2011.
- CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**, v. 54, n. 9, p. 825-857, 1999.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula Pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: GANABARA-Koogan, 2008. p. 881-990.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; JOST, E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, n. 2, p. 303-324, 1976.
- COOK, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system - a review. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 9, p. 1927-1942, 1998.
- COOK, J. D. Biochemical markers of alcohol use in pregnant woman. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 9-19, 2003.
- COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 3, p. 347-354, 2009.
- CRABB, D. W. Ethanol metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 1, p. 59-73, 1987.
- CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 4, p. 720-730, 2006.
- CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 115-127, 2009.
- DANILUK, J. et al. Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. **Alcohol**, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2001.
- DAVIS, K. M.; WU, J. Y. Role of glutamatergic and GABAergic systems in alcoholism. **Journal of Biomedical Science**, v. 8, n. 1, p. 7-19, 2001.
- DING, K. et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2–ARE signaling pathway as a potential mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 1-11, 2014.
- DOMINGUES, J. A.; TOLEDO, M. T.; MORAES, S. G. Análise histomorfológica do fígado materno e fetal de ratas prenhes desnutridas submetidas à exposição ao etanol. **Revista da Faculdade de Ciências de Sorocaba**, v. 11, n. 3, p. 9-17, 2009.
- DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Melatonina y aterosclerosis coronaria. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 21, n. 5, p. 247-256, 2009.
- DONG, D. et al. Oxidative products from alcohol metabolism differentially modulate pro-inflammatory cytokine expression in Kupffer cells and hepatocytes. **Cytokine**, v. 85, p. 109-119, 2016.
- DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.
- EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 3, p. 97-108, 2006.
- ELAMIN, E. E. et al. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 7, p. 483-499, 2014.
- EL-GUINDY, N. B. D. S.; DE VILLIERS, W. J.; DOHERTY, D. E. Acute alcohol intake impairs lung inflammation by changing pro-and anti-inflammatory mediator balance. **Alcohol**, v. 41, n. 5, p. 335-345, 2007.
- ERUKAINURE, O.L. et al. Protective effect of pineapple (*Ananas cosmosus*) peel extract on alcohol-induced oxidative stress in brain tissues of male albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 1, n. 1, p. 5-9, 2011.

- FARBER, N. B.; CREELEY, C. E.; OLNEY, J. W. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 200-206, 2010.
- FEDELI, D. et al. Lymphocyte DNA alteration by sub-chronic ethanol intake in alcohol-preferring rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 337, n. 1, p. 43-48, 2003.
- FERRARO, S. M.; LÓPEZ-ORTEGA, A. Actividad antioxidante de la melatonina sobre el hígado graso inducido por etionina em ratones. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 40, n. 1, p. 51-57, 2008.
- FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista de Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.
- FORTEA, M. S.; BADENES, J. C.; ARNAU, M. A. S. Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética de alcoholismo. **Adicciones**, v. 11, n. 2, p. 115-126, 1999.
- FREIRE, T. M. et al. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 7, p. 376-81, 2005.
- FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.
- GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-47, 2013.
- GALLIGAN, J. J. Oxidative stress and the ER stress response in a murine model for early-stage alcoholic liver disease. **Journal of Toxicology**, v. 2012, article ID 207594, 12 pages, 2012.
- GAO, B.; BATALLER, R. Alcohol liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1572-1585, 2011.
- GARCIA, L. et al. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 797-805, 2002.
- GARCÍA, J. J. et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 3, p. 225-237, 2014.
- GHOSH, D. et al. Melatonin protects against lead acetate induced oxidative stress-mediated changes in morphology and metabolic status in rat red blood cells: a flow cytometric and biochemical analysis. **Journal of Pharmacy Research**, v. 10, n. 6, p. 381-402, 2016.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.
- GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26 (Supl I), p. 11-13, 2004.
- GIL-MOHAPEL, J. et al. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: Insights from different rodent models. **Brain Research Reviews**, v. 64, n. 2, p. 283-303, 2010.

- GOLDMAN, B. D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Science Signaling**, v. 2003, n. 192, p. pe29-pe29, 2003.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADOR, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.
- GONZALEZ-QUINTELA, A. et al. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1437-1440, 2000.
- GONZALEZ, A. et al. Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 1, p. 86-92, 2008.
- GONZALEZ, V. M.; REYNOLDS, B.; SKEWES, M. C. Role of impulsivity in the relationship between depression and alcohol problems among emerging adult college drinkers. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 303-313, 2011.
- GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl 1, p. S110-S118, 2004.
- GRINFELD, H. et al. O alcoolismo na gravidez e os efeitos na prole. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 18, n. 1, p. 41-19, 2000.
- GUERRINI, I.; THOMSON, A. D.; GURLING, H. D. The importance of alcohol misuse, malnutrition and genetic susceptibility on brain growth and plasticity. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.31, n. 2, p. 212-220, 2007.
- HA, H. et al. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 48, p. 6035-6043, 2010.
- HAES, T. M. et al. Álcool e sistema nervosa central. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 153-163, 2010.
- HANCK, C. et al. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis. **Alcohol and Alcoholism**, v. 33, n. 6, p. 606-608, 1998.
- HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.
- HENZEL K. et al. Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 1, p. 37-45, 2004.
- HERRUZO, J. A. S.; MUNOZ, P. S. Melatonin and oxidative stress. **Revista Espanhola de Enfermidades Digestivas**, v. 101, n. 7, p. 453-459, 2009.
- HIRIART, B. M. et al. Hormona de la oscuridad. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica**, v. 59, n. 4, p. 222-232, 2012.
- HOFFMANN, M. H.; CARBONELL, E.; MONTORO, L. Álcool e segurança - epidemiologia e efeitos. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 16, n. 1, p. 28-37, 1996.

- HOYME, H. E. et al. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 Institute of Medicine Criteria, **Pediatrics**, v. 115, n. 1, p. 39-47, 2005.
- HURLEY, T. D.; EDENBERG, H. J. Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. **Alcohol Research**, v. 34, n. 3, p. 339-344, 2012.
- IERACI, A.; HERRERA, D. G. Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 3, p. 597-605, 2007.
- IGNATOWICZ, EWA et al. Exposure to alcohol and tobacco smoke causes oxidative stress in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 906-913, 2013.
- INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para o câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.
- JACOB, K. D. et al. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 134, n. 3, p. 139-157, 2013.
- JIN, M. et al. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 3, p. e554, 2013.
- JONES, K. L.; SMITH, D. W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. **Lancet**, v. 3, n. 302 (7836), p. 999-1001, 1973.
- JONES, M. W.; BASS, W. T. Fetal alcohol syndrome. **Neonatal Network**, v. 22, n. 3, p. 63-70, 2003.
- JONES, K. L. The Effects of Alcohol on Fetal Development. **Birth Defects Research (Part C)**, v. 93, n. 1, p. 3-11, 2011.
- JOVINGE, S. et al. Human monocytes/macrophages release TNF- α in response to ox-LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 16, n. 12, p. 1573-1579, 1996.
- KAMMANN, U. et al. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1, p. 67-77, 2001.
- KAYANI, M. A.; PARRY, J. M. The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde, **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 56-60, 2010.
- KHAYAT, C. B. et al. Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 10, p. 7334-7340, 2013.
- KHISROON, M. et al. Evaluation of DNA damage in lymphocytes of radiology personnel by Comet Assay. **Journal of Occupational Health**, v. 57, n. 3, p. 268-274, 2015.
- KISHIMOTO, T. et al. The biology of interleukin-6. **Blood**, v. 74, n. 1, p. 1-10, 1989.
- KOTOVA, N. et al. Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. **Carcinogenesis**, v.34, n. 2, p. 325-330, 2013.

KOTOVA, N. A novel micronucleus *in vitro* assay utilizing human hematopoietic stem cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1897-1905, 2015.

KRUMAN, I. I.; HENDERSON, G. I.; BERGESON, S. E. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 7, p. 740-747, 2012.

KÜCÜKAKIN, B. et al. Oxidative stress in relation to surgery. Is there a role for the antioxidant melatonin?. **Journal of Surgical Research**, v. 152, n. 2, p. 338-347, 2009.

KUMAR, P. R. V. et al. Effect of chronic low dose natural radiation in human peripheral blood mononuclear cells: Evaluation of DNA damage and repair using the alkaline comet assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 775, p. 59-65, 2015.

LANDGREN, M. et al. Prenatal alcohol exposure and neurodevelopmental disorders in children adopted from eastern Europe. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, p. e1178-e1185, 2010.

LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 1981-1989, 2006.

LARANJEIRA, R. (Org.). **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD)**. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.

LASO, F. J.; PASTOR, I.; ORFAO, A. Sistema inmune y enfermedad hepática por alcohol. **Medicina Clínica**, v. 125, n. 7, p. 263-269, 2005.

LEMOINE, P. et al. Les enfants des parents alcooliques: Anomalies observées. **Quest-Médical**, v. 25, p. 476-482, 1968.

LEMOS, A. J. J. M. et al. Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 159-168, 2014.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.

LIEBER, C. S. Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 2, p. 517-544, 1997.

LIN, C. W. et al. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 730-735, 2013.

LOBO, T. M.; BOLAÑOS, A. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad em expostos a plaguicidas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud**, v. 18, n. 2, p. 18-26, 2014.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 5, p. 723-738, 2008.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 potentiation of LPS and TNF α -induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress,

activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction. **Genes & Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 149-167, 2010.

LUIS, M. A. V.; LUNETTA, A. C. F.; FERREIRA, P. S. protocolo para avaliação da Síndrome de Abstinência Alcoólica por profissionais de enfermagem nos serviços de urgência: teste piloto. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 39-45, 2008.

MAEKAWA, R. et al. Role and regulation of maternal melatonin during pregnancy in rats. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 105-110, 2007.

MARKUS, R. P.; BARBOSA JÚNIOR, E. J. M.; FERREIRA, Z. S. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v. 1, p. 143-148, 2003.

MARTINS, L.; PAZ, A. V.; BRENTANO, D. M. Avaliação da geração de micronúcleo em juvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo Peva) expostos a diferentes concentrações salinas. **Revista Técnico Científica**, v. 2, n. 1, p. 13-16, 2010.

MARTINS, O. A. Efeito do consumo de bebidas alcoólicas no organismo – Uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 3, n. 2, p. 07-10, 2013.

MATOS, L. C. Doença Hepática Alcoólica (DHA). **Medicina Interna**, v.13, n. 3, p. 207-216, 2006.

MATOS, L. et al. Hepatite alcoólica aguda – artigo de revisão. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 4, p. 153-161, 2013.

MATTA A. P. L. F. et al. Álcool e gestação: possíveis efeitos, mecanismos de ação e medidas preventivas. **Revista Científica da FAMINAS**, v. 4, n. 2, p. 11-26, 2008.

MAY, P. A.; GOSSAGE, J. P. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome: A summary. **Alcohol Research and Health**, v. 25, n. 3, p. 159-167, 2001.

MCCLAIN, C. et al. Cytokines and alcoholic liver disease. In: **Seminars in liver disease**. © 1993 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1993. p. 170-182.

MESQUITA, M. A. Efeitos do álcool no recém-nascido. **Einsten**, v.8, p. 368-375, 2010.

MESQUITA, M. A.; SEGRE, C. A. M. Malformações congênitas em recém-nascidos de gestantes consumidoras de álcool. **Einsten**, v. 8, p. 461-466, 2010.

MESSAS, G. P.; FILHO, H. P. O papel da genética na dependência do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. Supl I, p. 54-58, 2004.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B.; ARAÚJO, E. G. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do Pequi (*Caryocar brasiliense*). **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n.15, p. 1960-1976, 2012.

MINCIS M. **Doença Hepática Alcoólica**. In: Mincis M., Editor. Gastroenterologia & Hepatologia 3ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2002 p. 695-716.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica: diagnóstico e tratamento. **Prática Hospitalar**, v. 8, p. 48, 2006.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Álcool e o fígado. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.

- MOHD, F. et al. Clinical aspects of melatonin hormone. **International Journal of Research in Pharmacy and Science**, v. 1, n. 3, p. 1-15, 2011.
- MOMINO, W; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHULER-FACCINI, L. Prenatal alcohol exposure as a risk factor for dysfunctional behaviors: the role of the pediatrician. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 76-79, 2008.
- MOREIRA, T. N. et al. Influência dos métodos de captura dos peixes da avaliação genotóxica utilizando diferentes tecidos de *astyanaxfasciatus* (Osteichthyes, Characidae). **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2010.
- NALPAS, B. et al. Financial costs of alcoholism treatment programs: a longitudinal and comparative evaluation among four specialized centers. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 27, n. 1, p. 51-56, 2003.
- NAVASUMRIT, P.; MARGISON, G. P.; O'CONNOR, P. J. Ethanol modulates rat hepatic DNA repair functions. **Alcohol Alcohol**, v. 36, n. 5, p. 369-376, 2001.
- NERSESYAN, A. et al. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. **Mutagenesis**, v. 26, n. 2, p. 295-301, 2011.
- NEUMAN, M. G. et al. Alcoholic liver disease: role of cytokines. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 2023-2034, 2015.
- NICCOLS, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. **Brain and Cognition**, v. 65, n. 1, p. 135-142, 2007.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Guideline 489, *In vivo* mammalian alkaline comet assay, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris, France, 2014.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Guideline 474, Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris, France, 2016.
- OLIVEIRA, G. C. et al. Consumo abusivo de álcool em mulheres. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 60-68, 2012.
- OLIVEIRA, A. M. et al. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 162-168, 2016.
- ONDEI, L. S.; TERESA, F. B.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação de fatores preditivos de estresse oxidativo em pessoas saudáveis. **Biotemas**, v. 27, n. 3, p. 167-173, 2014.
- ORNOY, A.; ERGAZ, Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 2, p. 364-379, 2010.
- O'SHEA, R. S.; DASARATHY, S.; MCCULLOUGH, A. J. Alcoholic Liver Disease. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 307-328, 2010.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, n. 1, p. 291-298, 1984.

- PASSINI JÚNIOR, R. Alcohol consumption during pregnancy. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 7, p. 373-375, 2005.
- PASSOS, C. C. et al. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p.183-190, 2010.
- RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 777-784, 2001.
- RAMALHO, J; SANTOS, M. R. Síndrome Alcoólica Fetal: Implicações Educativas. **Revista Brasileira de Educação Especial**, v.21, n. 3, p. 335-344, 2015.
- RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetics and Molecular Research**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.
- RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Advanced Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.
- REBELLO, A. S.; CARVALHO, M. G. C. Metodologia para estudo do polimorfismo de gene da enzima álcool desidrogenase. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 7, n. 2, p. 163-168, 2008.
- REIS, G. A. et al. Alcoolismo e seu tratamento. **Revista Científica do ITPAC**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2014.
- REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **News in Physiology Science**, v. 15, n. 5, p. 246-250, 2000.
- REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1129-1146, 2003.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, v. 181, p. 127-151, 2010.
- REITER, R. J. Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. **Annals of Medicine**, v. 44, n. 6, p. 564-577, 2012.
- REITER, R. J. et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 293-307, 2013.
- RENIS, M. et al. Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. **FEBS letters**, v. 390, n. 2, p. 153-156, 1996.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- RIBEIRO, E. M.; GONZALEZ, C. H. Síndrome Alcoólica Fetal: revisão. **Pediatria**, v. 17, n. 1, p. 47-56, 1995.
- RIBEIRO, E. M. et al. Síndrome Alcoólica Fetal: Relato de três irmãos afetados. **Pediatria**, v. 17, n. 2, p. 91-94, 1995.
- RIDLEY, N. J.; DRAPER, B.; WITHALL, A. Alcohol-related dementia: an update of the evidence. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 3, 2013.

- ROBBINS, W. A. et al. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, N. 2, p. 175-183, 1997.
- ROCHA, R. M. P. et al. Melatonina e reprodução animal: Implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 147-157, 2011.
- ROSA, D. P.; BONA, S.; MARRONI, N. A. P. Papel da melatonina no estresse oxidativo do fígado e sangue de ratos cirróticos. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 7, n. 7, p. 109-121, 2008.
- ROSA, D. P. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 72-78, 2010.
- SABHARWAL, R. et al. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian Journal of Medical and Paediatric oncology: Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology**, v. 36, n. 4, p. 212, 2015.
- SAGRILLO-FAGUNDES, L. et al. Melatonin in pregnancy: Effects on brain development and CNS programming disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 8, p. 978-986, 2016.
- SAHIN, N.; PIRINÇ, B.; TÜRKOĞLU, S. *In vivo* genotoxicity assessment of some food preservatives in *Drosophila melanogaster* with the Comet Assay. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 6, p. 2138-2145, 2015.
- SANTOS, K. R. P. et al. Morphometric analysis of the development of the ovarian follicles in pinealectomized rats. **International Journal of Morphology**, v. 2, n. 2, p. 109-112, 2004.
- SARI, Y.; ZHOU, F. C. Prenatal alcohol exposure causes long-term serotonin neuron deficit in mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 6, p. 941-948, 2004.
- SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde Karine. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 3, p. 49-60, 2013.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.
- SERÓN-FERRÉ, M. et al. Circadian rhythms in the fetus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 1, p. 68-75, 2012.
- SHEN, L. et al. Prenatal ethanol exposure programs an increased susceptibility of non-alcoholic fatty liver disease in female adult offspring rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, n. 2, p. 263-273, 2014.
- SKAGERSTRÓM, J.; CHANG, G.; NILSEN, P. Predictors of drinking during pregnancy: a systematic review. **Journal of Women's Health**, v. 20, n. 6, p. 901-913, 2011.
- SILBERMAN Y.; ARIWODOLA, O. J.; WEINER, J. L. Differential effects of GABA B autoreceptor activation on ethanol potentiation of local and lateral paracapsular GABAergic synapses in the rat basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 5, p. 886-895, 2009.
- SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

- SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, 2011.
- SILVA, F. C. A.; TEIXEIRA, A. A. C.; TEIXEIRA, V. W. Efeito da iluminação constante sobre a placenta de ratas: um estudo morfológico, morfométrico e histoquímico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n. 3, p.698-706, 2015.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SINGH, N. P.; LAI, H.; KHAN, A. Ethanol-induced single- strand DNA breaks in rat brain cells. **Mutation Research**, v. 345, n. 3-4, p. 191-196, 1995.
- SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.
- SOUSA, P. H. L.; ROSS, J. R. Fatores relacionados ao consumo de bebida alcoólica por gestantes em uma cidade do leste maranhense. **Revista Interdisciplinar**, v. 8, n. 4, p. 144-151, 2015.
- SOUZA, J. R. M. et al. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.
- SOUZA, T. G. S. Avaliação genotóxica *in vivo* dos efeitos agudos da mistura dos praguicidas metomil e cipermetrina, 2016, 72 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Vitória de Santo Antão.
- SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão da literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 13, n. 5, p. 4831-4839, 2016.
- SÖYLEMEZ, E. et al. Evaluation of relationship between lymphocyte DNA damages and blood arsenic levels in silver mining workers using alkaline comet assay. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, p. 530-536, 2017.
- STEHLE, J. H. et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 17-43, 2011.
- STREISSGUTH, A. P. et al. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. **Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 15, p. 1961-1967, 1991.
- SU, G. L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 2, p. G256-G265, 2002.
- SUWANJANG, W. et al. Melatonin prevents cytosolic calcium overload, mitochondrial damage and cell death due to toxically high doses of dexamethasone-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 34-41, 2016.
- SUZUKI, Y.; FORMAN, H.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 1, p. 269-285, 1997.

- TAMURA, H. et al. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 291-303, 2008.
- TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2014.
- TERASAKI, L. S.; SCHWARZ, J. M. Impact of prenatal and subsequent adult alcohol exposure on pro-inflammatory cytokine expression in brain regions necessary for simple recognition memory. **Brain Sciences**, v. 7, n. 10, p. 125, 2017.
- THOMAS, L. et al. Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and MT1 gene expression. **Journal of Pineal Research**, v. 33, n. 4, p. 218-224, 2002.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TORRES-FARFAN, C. et al. mt1 melatonin receptor in the primate adrenal gland: Inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 1, p. 450-458, 2003.
- TSEDENSODNOM, O. et al. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 5, p. 1213-1226, 2013.
- TURCATEL, E.; FUNCHAL, C. S.; GOMEZ, R. Alterações comportamentais e de estresse oxidativo no sistema nervoso central pelo uso de álcool e tabaco. **Revista Neurociências**, v. 20, p. 444-454, 2012.
- VARELA-REY, M. et al. Alcohol, DNA methylation and Cancer. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 35, n. 1, acessado em 27 de abril de 2017.
<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/25-35.htm>
- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.
- VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.
- VENEGAS, C. et al. Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 313-321, 2013.
- WANG, M. et al. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N 2-ethyldeoxyguanosine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 319-324, 2006.
- WANG, P. et al. The role of endotoxin, TNF- α , and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 3, p. 531, 2002.
- WEAVER, D. R.; NAMBOODIRI, M. A. A.; REPPERT, S. M. Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. **FEBS Letters**, v. 228, n. 1, p. 123-127, 1988.
- WONG, D. V. T. et al. Álcool e neurodesenvolvimento: aspectos genéticos e farmacológicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 1, p. 8-23, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol.** Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Status Report on Alcohol and Health**, 2014.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. In: **Seminars in liver disease**. © Thieme Medical Publishers, 2009. p. 141-154.

WÜNSCH FILHO, V. Consumo de bebidas alcoólicas e risco de câncer. **Revista USP**, n. 96, p. 37-46, 2013.

XIONGWEN, L. et al. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. **Inflammation Research**, v. 59, n. 8, p. 635-645, 2010.

YAMAGUCHI, E. T. et al. Drogas de abuso e gravidez. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 1, p. 44-47, 2008.

YELLON, S. M.; LONGO, L. D. Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. **Biological of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1093-1099, 1988.

ZHANG, H.; ZAHNG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 131-146, 2014.

ZHOU, Z. et al. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF- α production. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, p. 1137-1146, 2003.

ZHU, H. et al. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. **Journal of Digestive Diseases**, v. 13, n. 3, p. 133-142, 2012.

CAPÍTULO II

Efeito protetor da melatonina exógena em ratas e sua prole sobre a resposta genotóxica induzida pelo consumo crônico de álcool durante a prenhez

Artigo submetido à revista:
**Mutation Research - Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis**



EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA EM RATAS E SUA PROLE
SOBRE A RESPOSTA GENOTÓXICA INDUZIDA PELO CONSUMO CRÔNICO DE
ÁLCOOL DURANTE A PREENHEZ

Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho^{a,*}; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a; Talita Giselly dos Santos Souza^b; Meykson Alexandre da Silva^b; Cristiano Aparecido Chagas^b; Valéria Wanderley Teixeira^a; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^a

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE, Brasil

^b Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

***Autor para correspondência:**

Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho (I.D.D.S. Coelho), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900. Telefone: +55 81 99506-4612.

E-mail: ilkadayane@hotmail.com

RESUMO

O alcoolismo materno pode induzir sérios comprometimentos nos desenvolvimentos embrionário e fetal. O metabolismo do álcool aumenta a produção de radicais livres e acetaldeído, moléculas capazes de reagir com o DNA, prejudicando a organogênese. A melatonina é um poderoso antioxidante que pode funcionar como agente protetor contra danos no DNA causados por agentes genotóxicos, como o etanol. Este estudo avaliou o efeito protetor da melatonina exógena em ratas e sua prole sobre a resposta genotóxica induzida pelo consumo crônico de álcool durante a prenhez. Utilizou-se 25 ratas prenhes, divididas nos grupos: CN – Controle negativo (água destilada); ET – Ratas que receberam etanol (3 g/kg/dia); ET+10M – Ratas que receberam etanol (3 g/kg/dia) e melatonina (10 mg/kg/dia);

ET+15M – Ratas que receberam etanol (3 g/kg/dia) e melatonina (15 mg/kg/dia); CP – Controle positivo (40 mg/kg de ciclofosfamida). As matrizes e 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas) de cada grupo foram anestesiados para coleta do sangue e fígado das mães e do sangue, fígado e cérebro dos neonatos para avaliação da frequência de danos no DNA pelo ensaio cometa. O sangue também foi usado para o teste do micronúcleo. Os resultados demonstraram um aumento significativo de dano no DNA das células sanguíneas e hepáticas das matrizes e das proles do grupo ET, bem como no cérebro desses neonatos. Os tratamentos com melatonina (10 e 15 mg/kg/dia) reduziram significativamente a genotoxicidade causada pelo etanol no sangue das mães e dos neonatos (machos e fêmeas), no fígado das matrizes e dos filhotes machos e no cérebro da prole de fêmeas. Mostrou-se que apenas a prole de fêmeas exposta ao consumo materno de álcool apresentou frequência maior de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Consequentemente, a melatonina exógena pode ser um agente terapêutico promissor contra danos genotóxicos induzidos pelo álcool, entretanto, mais estudos são necessários para confirmação desses benefícios.

Palavras-chave: Ensaio Cometa; Etanol; Matrizes; Melatonina; Neonato; Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

Maternal alcoholism can induce serious injuries in embryonic and fetal development. The metabolism of alcohol increases the production of free radicals and acetaldehyde, molecules capable of reacting with DNA, impairing organogenesis. Melatonin is a powerful antioxidant that can act as a protective agent against DNA damage caused by genotoxic agents, such as ethanol. This study evaluated the protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by chronic alcohol consumption during pregnancy. Twenty-five pregnant rats were divided into the following groups: NC - Negative control (distilled water); ET - Rats receiving ethanol (3 g/kg/day); ET+10M - Rats receiving ethanol (3 g/kg/day) and melatonin (10 mg/kg/day); ET+15M - Rats receiving ethanol (3 g/kg/day) and melatonin (15 mg/kg/day); PC - Positive control (40 mg/kg cyclophosphamide). The dams and 10 pups (five males and five females) from each group were anesthetized to collect blood and liver from the mothers and blood, liver and brain of neonates to evaluate the frequency of DNA damage by the comet assay. Blood was also used for the micronucleus test. The results demonstrated a significant increase in DNA damage in the blood and liver cells of dams receiving ethanol and their offspring as well as in the brain

of these neonates. Treatments with melatonin (10 and 15 mg/kg/day) significantly reduced the genotoxicity caused by ethanol in the blood of dams and neonates (males and females), liver of dams and male offspring, and in the brain of female offspring. It was shown that only the female offspring exposed to maternal alcohol consumption showed a higher frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes. Consequently, exogenous melatonin may be a promising therapeutic agent against genotoxic damage induced by alcohol; however, further studies are needed to confirm these benefits.

Keywords: Comet Assay; Dams; Ethanol; Melatonin; Neonate; Micronucleus Test.

1. Introdução

O alcoolismo é uma doença crônica e multifatorial considerada, atualmente, como um grave problema de saúde pública [1]. A ingestão excessiva e frequente de etanol está associada a diversos distúrbios fisiológicos, tais como desordens do sistema nervoso central (SNC), doenças hepáticas, complicações no trato gastrointestinal, problemas cardiovasculares e aumento do risco para o desenvolvimento de câncer [2,3,4,5].

O consumo de álcool entre as mulheres vem crescendo de modo significativo. Um estudo realizado pela SENAD (Secretaria Nacional Antidroga) em parceria com o CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) – II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas – 2006 demonstrou um aumento preocupante de quase 14% no número de mulheres dependentes do álcool com relação ao estudo anterior no ano de 2001, merecendo atenção especial as mulheres grávidas [6,7].

O alcoolismo materno pode levar a sérios comprometimentos nos desenvolvimentos embrionário e fetal [8]. A exposição intrauterina ao etanol pode acarretar alterações físicas, cognitivas e comportamentais permanentes e irreversíveis, incluídas no Espectro de Desordens Fetais Alcoólicas (FASD) [9,10,11]. O FASD pode manifestar-se de forma variável e depende da frequência e da quantidade do consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez; todavia, ainda não há consenso sobre a quantidade máxima de álcool permitida ao longo do período gestacional [12].

O álcool ingerido pela mãe é absorvido pelas mucosas do tubo digestivo e entra na corrente sanguínea, cruzando livremente a barreira placentária e distribui-se rapidamente para o líquido amniótico e o concepto. A difusão passiva do etanol ocorre por gradiente de concentração, de modo que, em minutos, as concentrações materna e fetal são equivalentes.

Contudo, o feto permanece impregnado pelo etanol e seu metabólito, o acetaldeído, por mais tempo, devido ao seu metabolismo e processos de eliminação serem mais lentos [13].

Um dos principais fatores contribuintes para os danos induzidos pelo álcool sobre os desenvolvimentos embrionário e fetal é atribuído ao seu efeito pró-oxidante. O álcool metabolizado pela enzima álcool desidrogenase (ADH), pelo sistema microssômico de oxidação do etanol e pela catalase produz acetaldeído e espécies reativas de oxigênio (ERO) [14]. As espécies reativas são tóxicas às células e capazes de reagir e lesionar lipídios, proteínas e DNA, aumentando a apoptose e prejudicando o processo de organogênese [15]. Elas levam a diferentes danos no DNA, incluindo oxidação e fragmentação de bases, rupturas de cadeias simples e duplas, ligações cruzadas e produtos da fragmentação do açúcar. O acetaldeído também é altamente tóxico e reativo, podendo formar adutos de proteínas de curta duração e estáveis, bem como ligações cruzadas de DNA-DNA e DNA-proteína [16,17].

A melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) é um hormônio secretado principalmente pela glândula pineal durante o escuro [18]. Essa indolamina exerce papel importante em várias funções fisiológicas, atuando na regulação do sono, na modulação da reprodução sazonal e, como descrito mais recentemente, com alto poder antioxidante [19,20,21]. Devido a sua propriedade anfifílica, a melatonina penetra facilmente as membranas biológicas e é capaz de proteger estruturas intracelulares importantes, como a mitocôndria e o DNA, contra o estresse oxidativo [22]. A melatonina é capaz de capturar e neutralizar diferentes tipos de radicais livres, além disso, reduz as enzimas pró-oxidantes e aumenta a expressão de enzimas antioxidantes [23,24,25]. Assim, ela pode ser um antioxidante com potencial terapêutico durante a exposição alcoólica e proteger o desenvolvimento fetal contra os efeitos genotóxicos e teratogênicos do álcool.

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são ensaios citogenéticos simples, sensíveis e eficientes na avaliação de substâncias com potencial para induzir danos no DNA, amplamente empregados em estudos de genética toxicológica [26,27,28]. O ensaio cometa é capaz de identificar lesões genômicas como quebras no DNA, simples e duplas, danos álcali-lábeis e ligações cruzadas que são passíveis de reparo, mas que podem levar a mutações, caso o reparo não ocorra [29,30]. O teste do micronúcleo é um dos ensaios mais recomendados para avaliação da mutagenicidade. Este teste consiste na análise da frequência de mutações induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos [31]. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da melatonina exógena em ratas e sua prole sobre a resposta genotóxica induzida pelo consumo crônico de álcool durante a prenhez.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Neste estudo foram utilizadas 25 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200 ± 30 g, procedentes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Durante o experimento, as fêmeas foram acondicionadas em caixas de polipropileno adequadas, com alimentação e água *ad libitum*, mantidas à temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e expostas à luz por um período diário de 12 horas (7h-19h). As ratas foram acasaladas e divididas aleatoriamente nos grupos experimentais. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (CEUA – UFRPE), com licença de número 009/2016.

2.2. Acasalamento

Para o acasalamento, as ratas foram colocadas nas gaiolas na proporção de três fêmeas para cada macho da mesma linhagem, sempre no início da noite (18h). No dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos, sempre no período da manhã (06h), para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozoides ao exame microscópico, sendo este considerado como o primeiro dia de prenhez.

2.3. Grupos experimentais

Após a confirmação do acasalamento, as fêmeas foram distribuídas em cinco grupos, contendo cinco animais cada: CN – Ratas prenhes que receberam apenas água destilada (grupo controle negativo); ET – Ratas prenhes que receberam apenas etanol (3 g/kg/dia); ET+10M – Ratas prenhes que receberam etanol (3 g/kg/dia) mais a administração de 10 mg/kg de melatonina; ET+15M – Ratas prenhes que receberam etanol (3 g/kg/dia) mais a administração de 15 mg/kg de melatonina; CP – Ratas prenhes que receberam apenas água destilada com administração de 40 mg/kg de ciclofosfamida (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), por via intraperitoneal (grupo controle positivo).

2.4. Administração do etanol

As matrizes dos grupos ET, ET+10M e ET+15M receberam diariamente álcool etílico absoluto P.A., na dosagem de 3 g/kg de peso corporal, diluído em água destilada, com volume

final de 3,8 mL, através de gavagem intragástrica, durante todo o período gestacional. As ratas dos grupos CN e CP receberam diariamente 3,8 mL de água destilada, por gavagem intragástrica, durante toda a prenhez [32,33].

2.5. Tratamentos com melatonina

A administração de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi realizada diariamente nas ratas dos grupos ET+10M e ET+15M, durante toda a prenhez, nas concentrações de 10 mg/Kg e 15 mg/Kg, respectivamente. Para tanto, a melatonina foi dissolvida em um valor mínimo de álcool etílico absoluto e depois diluída na água de beber, com concentração final de 0,07% (p/v) de etanol. As garrafas de água foram envolvidas com papel alumínio para proteção contra a luz [34].

2.6. Coleta dos materiais biológicos

Logo após o nascimento, no primeiro dia, as matrizes e 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas) de cada grupo experimental foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, para coleta do sangue e do fígado das mães e do sangue, do fígado e do cérebro dos neonatos para avaliação da frequência de danos no DNA pelo ensaio cometa. O sangue coletado também foi utilizado para o teste do micronúcleo. Para tanto, foi coletado 1 mL de sangue por punção cardíaca e diluído em PBS (tampão fosfato salino). Partes do fígado e do cérebro foram coletadas e mergulhadas em tampão de suspensão celular frio. Em seguida, esses pedaços foram picotados, utilizando-se tesoura de aço inoxidável adequada, em fragmentos com aproximadamente 1 mm de diâmetro e agitados delicadamente para facilitar a saída de sangue dos vasos dos órgãos para a solução. O tampão foi retirado e um novo tampão foi adicionado. As amostras foram novamente picotadas até que o tampão se tornasse turvo e translúcido, indicando que grande parte das células hepáticas e nervosas foi desprendida. Cerca de 1 mL da suspensão celular foi colocado em microtubos e levados a geladeira até o momento do preparo das lâminas para o ensaio cometa.

2.7. Ensaio Cometa

O dano genético foi avaliado através do ensaio cometa conforme o protocolo proposto por Singh et al. [35] e modificado por Tice et al. [36]. As etapas do experimento foram realizadas sob luz vermelha para se evitar danos ao DNA causados pela luz.

Para tanto, 15 µL da suspensão celular em estudo (sangue, fígado e cérebro) foram adicionados a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão previamente aquecida e mantida a 37°C. As amostras foram depositadas em duas lâminas de vidro previamente preparadas com agarose padrão. Posteriormente, essas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas à temperatura de 4°C por 10 minutos para solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas em cubas contendo a solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, 10% DMSO, com pH 10), mantidas em geladeira por 48 horas. Após a lise, as amostras foram transferidas para uma cuba horizontal contendo solução de tampão alcalino gelado (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) e descansaram por 20 minutos, para desnaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas à eletroforese durante 20 minutos, com corrente de ±300 mA e diferença de potencial de 32 V.

Logo após a corrida eletroforética, as lâminas permaneceram durante 15 minutos em tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) e depois foram fixadas por 5 minutos em álcool etílico absoluto. Para a revelação, as lâminas foram coradas com 30 µL de solução de brometo de etídio (0,0002%, p/v) e cobertas com lamínulas. Todas as etapas descritas anteriormente são fotossensíveis, portanto, foram realizadas sob a luz vermelha.

A análise dos danos no DNA foi realizada em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com ampliação de 400X, utilizando-se o filtro Alexa Fluor 546. Foram examinadas 100 nucleoides por animal. Para cada nucleóide analisado, os danos no DNA foram classificados em cinco classes: 0 = sem dano visível; 1 = dano mínimo; 2 = dano médio; 3 = dano médio com cauda mais longa; 4 = dano máximo).

Os resultados foram expressos em índice de dano (ID) e frequência de danos (FD%). O valor obtido para cada indivíduo pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4), denominado de (ID) por animal, calculado da seguinte maneira:

$$ID\ total = 0\ (n^o\ classe\ 0) + 1\ (n^o\ classe\ 1) + 2\ (n^o\ classe\ 2) + 3\ (n^o\ classe\ 3) + 4\ (n^o\ classe\ 4)$$

A frequência de danos (FD%) foi determinada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleoides contabilizados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total), seguindo a fórmula:

$$FD = [(n^{\circ} \text{ total} - n^{\circ} \text{ classe 0}) \times 100] / n^{\circ} \text{ total}$$

A viabilidade celular foi medida em cada lâmina preparada pela proporção de nucleoides altamente danificados (em forma de ouriço) sobre o total de 100 nucleoides contados. Sempre que o número de nucleoides em forma de ouriço for maior do que 20% dos do total de nucleoides, a amostra é descartada [37].

2.8. Teste do Micronúcleo

A genotoxicidade do álcool também foi analisada através do teste do micronúcleo em sangue periférico. Para tanto, foram coletados 5 µL do sangue de cada animal e dispostos em três lâminas histológicas, previamente preparadas com o corante laranja de acridina. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula, a fim de espalhar uniformemente o material biológico [38].

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando-se o filtro Alexa Fluor 488. Foram avaliadas a proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) e a frequência de micronúcleos presentes nestas células. A proporção de eritrócitos policromáticos em relação aos eritrócitos totais foi estabelecida pela fórmula: $EPC/(EPC+ENC)$, onde ENC significa eritrócitos normocromáticos. Para a determinação da frequência de micronúcleos, foram contabilizados 2.000 eritrócitos policromáticos por amostra e dentro desse total, a presença de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPM) [39].

2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos no ensaio cometa e no teste do micronúcleo para cada grupo experimental foram comparados pelo Teste Kruskal-Wallis com análise *a posteriori* utilizando-se a estratégia de fazer testes t par-a-par com correção de *Bonferroni*. Os grupos CN e CP foram comparados entre si pelo teste de Wilcoxon para se verificar a eficiência dos testes. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

Os resultados demonstraram que as matrizes do grupo que recebeu etanol (ET) apresentaram aumento significativo de danos no DNA das células sanguíneas e hepáticas, quando considerados o ID e o FD%. Os tratamentos com melatonina exógena a 10 mg/kg/dia

e a 15 mg/kg/dia foram capazes de reduzir significativamente os efeitos causados pelo álcool durante a gestação. No entanto, a ingestão crônica de álcool durante a prenhez não aumentou de maneira significativa a formação de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nessas ratas (Tabela 1). As médias obtidas para o grupo controle positivo foram: ID do sangue (229.2 ± 21.05), FD% do sangue (94 ± 2.74), ID do fígado (178.4 ± 17.76), FD% do fígado (89 ± 2.12) e eritrócitos policromáticos micronucleados (19.8 ± 2.39). As comparações entre os valores médios dos grupos CN e CP foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com as matrizes.

Teste/grupo	CN	ET	ET+M10	ET+M15
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
IDSa	15 (4,80)b	58,4 (28,04)a	15,6 (5,03)b	16,6 (10,24)b
FDSa	11,8 (3,11)b	48,4 (5,33)a	12,2 (3,96)b	12 (7,81)b
IDFi	36 (14,61)b	138,6 (31,69)a	37 (10,58)b	36,2 (8,35)b
FDFi	26 (8,54)b	81,4 (12,70)a	27,2 (8,32)b	28,8 (5,07)b
EPM	1,2 (1,30)a	3 (1,87)a	0,4 (0,55)a	0,8 (0,84)a

IDSa: índice de dano no sangue pelo ensaio cometa; FDSa: frequência de dano (em porcentagem) no sangue pelo ensaio cometa; IDFi: índice de dano no fígado pelo ensaio cometa; FDFi: frequência de dano (em porcentagem) no fígado pelo ensaio cometa; EPM: eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: desvio padrão; CN: controle negativo; ET: etanol; ET+M10: etanol + melatonina a 10 mg; ET+M15: etanol + melatonina a 15 mg. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Para os filhotes machos, o ensaio cometa detectou que a ingestão materna de álcool aumentou significativamente os danos no DNA das células do sangue, fígado e cérebro tanto em relação ao ID como ao FD% nesses neonatos. Apenas o tratamento com 15 mg/kg/dia de melatonina diminuiu efetivamente o ID e o FD% do sangue. Os tratamentos com melatonina exógena a 10 mg/kg/dia e a 15 mg/kg/dia foram eficazes em reduzir o ID e o FD% no fígado desses filhotes. No entanto, nenhum dos tratamentos com melatonina foi capaz de reduzir significativamente os danos genotóxicos causados no cérebro desses filhotes. Quanto ao teste

do micronúcleo, nossos resultados demonstraram que a exposição intrauterina crônica ao etanol não interferiu de forma significativa na geração de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (Tabela 2). Os valores médios obtidos para o grupo controle positivo foram: ID do sangue ($237 \pm 13,51$), FD% do sangue ($97,2 \pm 0,84$), ID do fígado ($216,6 \pm 9,79$), FD% do fígado ($97 \pm 1,58$), ID do cérebro ($255,8 \pm 9,39$), FD% do cérebro ($100 \pm 0,00$) e eritrócitos policromáticos micronucleados ($59,8 \pm 7,73$). As comparações entre as médias dos grupos CN e CP foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com a prole de machos.

Teste/grupo	CN	ET	ET+M10	ET+M15
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
IDSa	25,4 (6,66)b	80,4 (31,91)a	49,2 (6,26)a,b	32,8 (7,12)b
FDSa	19,4 (4,93)b	44,4 (1,67)a	29,2 (6,30)b	23,2 (4,60)b
IDFi	40,4 (20,89)b	124,2 (24,13)a	61,6 (14,43)b	72,6 (9,15)b
FDFi	29 (12,47)c	78,6 (8,50)a	40,6 (4,93)b,c	48,6 (4,77)b
IDCe	50,4 (19,79)b	118,6 (38,94)a	93,2 (12,83)a,b	88,6 (11,22) a,b
FDCe	40,4 (16,40)b	74,2 (12,81)a	60,2 (4,60)a,b	58,6 (7,27) a,b
EPM	4,8 (1,10)a	5,4 (4,67)a	5 (1,87)a	5 (0,71)a

IDSa: índice de dano no sangue pelo ensaio cometa; FDSa: frequência de dano (em percentagem) no sangue pelo ensaio cometa; IDFi: índice de dano no fígado pelo ensaio cometa; FDFi: frequência de dano (em percentagem) no fígado pelo ensaio cometa; IDCe: índice de dano no cérebro pelo ensaio cometa; FDCe: frequência de dano (em percentagem) no cérebro pelo ensaio cometa; EPM: eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: desvio padrão; CN: controle negativo; ET: etanol; ET+M10: etanol + melatonina a 10 mg; ET+M15: etanol + melatonina a 15 mg. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

A tabela 3 mostra os resultados para o ensaio cometa e para o teste do micronúcleo da prole de fêmeas. O ensaio cometa demonstrou que a ingestão crônica de álcool durante a

gestação aumentou significativamente os danos no DNA das células do sangue, fígado e cérebro, tanto em relação ao ID como ao FD%. Os tratamentos com melatonina exógena a 10 mg/kg/dia e a 15 mg/kg/dia foram eficazes na redução do ID e do FD% nas células sanguíneas e do cérebro. No entanto, os tratamentos com melatonina não foram capazes de reduzir significativamente os danos genotóxicos causados no fígado desses filhotes em qualquer das doses testadas. Nota-se que a exposição pré-natal ao etanol aumentou significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. As médias obtidas para o grupo controle positivo foram: ID do sangue ($254,6 \pm 9,84$), FD% do sangue ($98,4 \pm 1,14$), ID do fígado ($218,2 \pm 15,21$), FD% do fígado ($98,4 \pm 1,14$), ID do cérebro ($245,2 \pm 14,62$), FD% do cérebro ($99,2 \pm 0,84$) e eritrócitos policromáticos micronucleados ($58,2 \pm 8,58$). As comparações entre as médias dos grupos CN e CP foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3: Resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa realizados com a prole de fêmeas.

Teste/grupo	CN	ET	ET+M10	ET+M15
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
IDSa	31,4 (8,79)b	66,8 (18,77)a	35,4 (12,70)b	35,2 (17,28)b
FDSa	22,8 (5,93)b	47 (11,85)a	23 (6,04)b	25,6 (12,16)b
IDFi	28,2 (12,38)b	96 (46,28)a	64,8 (12,83)a,b	62,6 (12,01)a,b
FDFi	20,4 (9,66)b	66 (24,48)a	41,2 (8,20)a,b	43,2 (7,26)a,b
IDCe	47 (12,69)c	127,6 (7,16)a	80,8 (14,92)b	75 (12,06)b
FDCe	35,6 (8,32)c	79,8 (3,35)a	53,8 (8,20)b	51,4 (7,16)b
EPM	3,4 (1,14)b	10,6 (5,77)a	5,4 (1,95)a,b	5,8 (1,64)a,b

IDSa: índice de dano no sangue pelo ensaio cometa; FDSa: frequência de dano (em percentagem) no sangue pelo ensaio cometa; IDFi: índice de dano no fígado pelo ensaio cometa; FDFi: frequência de dano (em percentagem) no fígado pelo ensaio cometa; IDCe: índice de dano no cérebro pelo ensaio cometa; FDCe: frequência de dano (em percentagem) no cérebro pelo ensaio cometa; EPM: eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: desvio

padrão; CN: controle negativo; ET: etanol; ET+M10: etanol + melatonina a 10 mg; ET+M15: etanol + melatonina a 15 mg. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

4. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito protetor da melatonina exógena em ratas e sua prole sobre a resposta genotóxica induzida pelo consumo crônico de álcool durante o período gestacional. De acordo com os resultados, verificou-se que a exposição crônica ao etanol durante a gestação acarretou em um aumento significativo no índice e na frequência de danos no DNA das células do sangue e do fígado das matrizes e de sua prole (machos e fêmeas), bem como do cérebro desses neonatos. Além disso, os tratamentos com melatonina a 10 mg/kg/dia e a 15 mg/kg/dia reduziram consideravelmente os efeitos genotóxicos do etanol no sangue das mães e dos neonatos (machos e fêmeas), no fígado das matrizes e dos filhotes machos e no cérebro da prole de fêmeas.

Os danos genotóxicos constatados nas células sanguíneas, hepáticas e nervosas podem ter sido consequentes do estresse oxidativo e do acúmulo de acetaldeído originados do metabolismo do etanol ingerido durante a gestação. Estudos têm sugerido que o álcool exerce sua toxicidade celular via dano no DNA, possivelmente através do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, gerado principalmente pelo sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) e da oxidação do álcool em acetaldeído [40,41]. Os produtos do metabolismo do etanol são capazes de reagir diretamente com o DNA, causando danos às moléculas que podem levar à perda de função genômica [42,43]. Além disso, o álcool prejudica o sistema de defesa antioxidante [44], o que expõe o genoma da célula a mais estresse oxidativo e, portanto, a mais danos no DNA.

Grossi et al. [45], em um estudo com humanos utilizando o ensaio cometa, demonstraram que o álcool provocou fragmentação no DNA de linfócitos do sangue periférico de bebedores sociais. Navasumrit et al. [46] indicaram que a ingestão crônica de etanol aumentou a formação de adutos no DNA das células hepáticas de ratos. Suman et al. [47] demonstraram que a exposição ao álcool induziu quebras da fita dupla de DNA e alterou as vias de reparo das células do hipocampo de ratos.

O aumento da formação das espécies reativas de oxigênio pode potencialmente desregular o desenvolvimento fetal, alterando as vias de transdução de sinais ou danificando importantes macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, resultando em defeitos congênitos estruturais ou deficiência no desenvolvimento neurológico [48]. Miller-

Pinsler, Pinto e Wells [49] demonstraram que o estresse oxidativo induzido pelo consumo materno de álcool contribuiu significativamente para a deficiência do neurodesenvolvimento em ratos. Proteínas hepáticas, lipídios e o DNA são as estruturas celulares mais afetadas pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, resultando em mudanças estruturais e funcionais do fígado, que podem levar a doenças hepáticas futuras [50].

A melatonina é um hormônio lipofílico capaz de cruzar facilmente os compartimentos celulares [51]. Diversos estudos têm demonstrado o poderoso poder antioxidante dessa indolamina em diferentes órgãos [52,53,54]. Nossos resultados demonstraram que a administração de melatonina em ratas prenhes submetidas ao consumo crônico de etanol (3 g/kg/dia) reduziu significativamente seus efeitos nocivos no sangue das matrizes e de seus filhotes, assim como no fígado das mães e dos filhotes machos e no cérebro da prole de fêmeas. A melatonina pode ter diminuído e/ou inibido a ação dos radicais livres produzidos no metabolismo do etanol [55]. Karamian; Shokrzadeh; Ahmadi [56] mostraram o efeito protetor da melatonina contra os efeitos genotóxicos induzidos pelo diazinon sobre os linfócitos do sangue periférico humano. Korkmaz et al. [57] demonstraram que a administração de melatonina reduziu os danos oxidativos no fígado de ratos diabéticos.

O tratamento com melatonina exógena a 10 mg/kg/dia e a 15 mg/kg/dia durante a gestação não reduziu significativamente os efeitos genotóxicos do álcool no fígado da prole de fêmeas. Isso pode ter ocorrido porque os fetos ficam expostos por mais tempo ao álcool devido ao seu metabolismo e processos de eliminação alcoólica serem mais lentos do que nas mães [58]. Em especial, as fêmeas da prole parecem ser mais vulneráveis do que os machos aos efeitos tóxicos do álcool no fígado [59]. As fêmeas são metabolicamente menos tolerantes ao etanol do que os machos porque possuem menor concentração de água corporal em detrimento da maior quantidade de gordura, fazendo com que a concentração de álcool no organismo seja maior [60]. Além disso, apresentam menor quantidade de enzimas metabolizadoras de álcool (álcool desidrogenase) [61]. Uma meta-análise de 12 estudos constatou que as mulheres apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de cirrose alcoólica que os homens, mesmo consumindo doses equivalentes de álcool [62].

Os resultados observados para o cérebro dos neonatos mostraram um aumento significativo no índice e na frequência de danos no DNA das células nervosas, resultados similares aos obtidos por outros autores [63,64,65]. Ainda não é bem estabelecido como a genotoxicidade do etanol pode atuar sobre o cérebro. No entanto, Fowler et al. [66]

demonstraram que as espécies reativas de oxigênio e o acetaldeído gerados a partir do metabolismo do etanol causam danos no cérebro de ratos adultos.

A melatonina exógena nas concentrações de 10 mg/kg/dia e 15 mg/kg/dia não reduziu significativamente a genotoxicidade decorrente do consumo materno de etanol no cérebro da prole de machos. O cérebro apresenta alto metabolismo energético com elevada demanda na produção de ROS [67]. O DNA das células nervosas é extremamente sensível aos efeitos nocivos do estresse oxidativo, uma vez que essas células apresentam alta taxa metabólica, sistema antioxidante menos eficiente e baixa capacidade para o reparo de seu material genético [68,69]. O tecido cerebral apresenta baixos níveis da enzima catalase, que ajuda na prevenção dos danos ao DNA induzidos por ROS [70,71]. Além disso, tem sido apontado que o consumo exagerado de etanol prejudica os mecanismos celulares de reparo do DNA, levando ao acúmulo de danos e consequente instabilidade genômica, processos relacionados à neurodegeneração [72,73]. É possível que uma dose maior de melatonina seja necessária para a redução significativa dos efeitos genotóxicos do álcool no cérebro desses neonatos.

Quando o teste do micronúcleo foi utilizado, apenas na prole de fêmeas houve um resultado significativo. O grupo de filhotes fêmeas exposto ao consumo materno de álcool apresentou uma frequência maior de micronúcleos quando comparado ao grupo controle. Isso demonstra que o ensaio cometa é um teste mais sensível para a detecção de danos genotóxicos. Ambos os testes são bem utilizados por pesquisadores que costumam correlacioná-los [74,75]. A maior sensibilidade constatada em nosso estudo pode ter sido resultante de o ensaio cometa ser capaz de identificar quebras no DNA que podem ser seguidamente reparadas por enzimas celulares [76]. Enquanto isso, o teste do micronúcleo detecta quebras nas moléculas de DNA que se estabelecem e escapam dos processos de reparo naturais da célula, estabelecendo uma mutação [77].

5. Conclusões

Os tratamentos com melatonina a 10 mg/kg e a 15 mg/kg durante todo o período gestacional reduziram os efeitos provocados pelo consumo crônico de etanol, mostrando que esse hormônio pode atuar como protetor do DNA nas células sanguíneas, hepáticas e nervosas, sendo considerada como um agente terapêutico promissor na proteção contra os danos genotóxicos induzidos pelo álcool durante o período gestacional tanto nas mães, quanto na prole. No entanto, mais estudos são necessários para a confirmação dos efeitos benéficos da melatonina contra os danos ao DNA induzidos pelo etanol durante a gestação.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] World Health Organization. Global Status Report on Alcohol. Geneva: World Health Organization; 2014.
- [2] K.A. Welch, A. Carson, S.M. Lawrie, Brain Structure in Adolescents and Young Adults with Alcohol Problems: Systematic Review of Imaging Studies, *Alcohol Alcohol.* 48 (2013) 433-444. <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agt037>.
- [3] G. Askgaard, M. Grønbaek, M.S. Kjær, A. Tjønneland, J.S. Tolstrup, Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: A prospective cohort study. *J. Hepatol.* 62 (2015) 1061-1067. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.005>.
- [4] S.C. Larsson, N. Drca, A. Wolk, Alcohol Consumption and Risk of Atrial Fibrillation: A Prospective Study and Dose-Response Meta-Analysis, *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2014) 281-289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.048>.
- [5] V. Bagnardi, M. Rota, E. Botteri, I. Tramacere, F. Islami, V. Fedirko, L. Scotti, M. Jenab, F. Turati, E. Pasquali, C. Pelucchi, R. Bellocco, E. Negri, G. Corrao, J. Rehm, P. Boffetta, C. La Vecchia, Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis, *Ann. Oncol.* 24 (2013) 301-308. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds337>.
- [6] E.A. Carlini, J.C.F. Galduróz, A.R. Noto, S.A. Nappo, I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país: 2001, São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2002.

- [7] E.A. Carlini, J.C.F. Galduróz, A.A.B. Silva, A.R. Noto, A.M. Fonseca, C.M. Carlini, L.G. Oliveira, S.A. Nappo, Y.G. Moura, Z.M. Sanchez, II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005, São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.
- [8] N. Dörrie, M. Föcker, I. Freunscht, J. Hebebrand, Fetal alcohol spectrum disorders, *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*. 23 (2014) 863-875. <http://dx.doi.org/10.1007/s00787-014-0571-6>.
- [9] H.E. Hoyme, P.A. May, W.O. Kalberg, P. Kodituwakku, J.P. Gossage, P.M. Trujillo, D.G. Buckley, J.H. Miller, A.S. Aragon, N. Khaole, D.L. Viljoen, K.L. Jones, L.K. Robinson. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 Institute of Medicine Criteria, *Pediatrics* 115 (2005) 39-47. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2004-0259>.
- [10] S. Popova, S. Lange, K. Shield, A. Mihic, A. E. Chudley, R. A. S. Mukherjee, D. Bekmuradov, J. Rehm, Comorbidity of fetal alcohol spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis, *Lancet* 387 (2016) 978-987. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01345-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01345-8).
- [11] J.F. Williams, V.C. Smith, Fetal Alcohol Spectrum Disorders, *Pediatrics* 136 (2015) 1395-1406. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2015-3113>.
- [12] P.A. May, J. Blankenship, A.S. Marais, J.P. Gossage, W.O. Kalberg, B. Joubert, M. Cloete, R. Barnard, M. Vries, J. Hasken, Luther K. Robinson, C.M. Adnams, D. Buckley, M. Manning, C.D.H. Parry, H.E. Hoyme, B. Tabachnick, S. Seedat, Maternal alcohol consumption producing fetal alcohol spectrum disorders (FASD): quantity, frequency, and timing of drinking. *Drug. Alcohol Depend.* 133 (2013) 502-512, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.07.013>.
- [13] H. Bager, L.P. Christensen, S. Husby, L. Bjerregaard, Biomarkers for the Detection of Prenatal Alcohol Exposure: A Review, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 41 (2017) 251-261. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13309>.

- [14] A. Patten, P.S. Brocardo, J. Gil-Mohapel, B.R. Christie, Oxidative Stress in Fetal Alcohol Spectrum Disorders–Insights for the Development of Antioxidant-Based Therapies. In: *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 645-667.
- [15] L. Miller, A.M. Shapiro, J. Cheng, P.G. Wells, The free radical spin trapping agent phenylbutylnitron reduces fetal brain DNA oxidation and postnatal cognitive deficits caused by in utero exposure to a non-structurally teratogenic dose of ethanol: a role for oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 60 (2013) 223-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.015>.
- [16] P.J. Brooks, S. Kornel, Timeless Insights Into Prevention of Acetaldehyde Genotoxicity?, *Cell Cycle* 16 (2017) 308-309. <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1247570>.
- [17] S.L. Rulten, E. Hodder, T.L. Ripley, D.N. Stephens, L.V. Mayne, Alcohol induces DNA damage and the Fanconi anemia D2 protein implicating FANCD2 in the DNA damage response pathways in brain, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (2008) 1186-1196. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00673.x>.
- [18] R.W. Pelham, A Serum Melatonin Rhythm in Chickens and Its Abolition by Pinealectomy 1, *Endocrinology* 96 (1975) 543-546. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-96-2-543>.
- [19] E. Ferracioli-Oda, A. Qawasmi, M.H. Bloch, Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders, *PloS one* 8 (2013) e63773. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063773>.
- [20] R.J. Reiter, H. Tamura, D.X. Tan, X.Y. Xu, Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction, *Fertil. Steril.* 102 (2014) 321-328. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.014>.

- [21] A.Z. Karakilçik, M. Bitiren, M. Zerin, H. Çelik, N. Aksoy, Melatonin increased vitamin C and antioxidant enzyme values in the plasma, heart, liver, and kidney of Adriamycin-treated rats, *Turkish J. Biol.* 39 (2015) 925-931. <http://dx.doi.org/10.3906/biy-1507-79>.
- [22] T.W. Fischer, A. Slominski, M.A. Zmijewski, R.J. Reiter, R. Paus, Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 713-730. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00767.x>.
- [23] I. Bejarano, F. Monllor, A.M. Marchena, A. Ortiz, G. Lozano, M.I. Jiménez, P. Gaspar, J.F. García, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez, J. Espino, Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa, *J. Pineal Res.* 57 (2014) 333-339. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12172>.
- [24] Y. Liang, S. Chen, L. Zhang, J. Jing, K. Fan, Q. Yao, Q. Hao, B. Yao, Protective effects of melatonin agonist on radiotherapy-induced ovarian damage in rats, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9 (2016) 4023-4028.
- [25] L.C. Souza, E.A. Wilhelm, C.F. Bortolatto, C.W. Nogueira, S.P. Boeira, C.R. Jesse, The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. *Behav. Brain Res.* 271 (2014) 316-324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.030>.
- [26] A.R. Kraynaka, J.E. Barnuma, C.L. Cunninghama, A. Ng, B.A. Ykoruka, B. Bennet, D. Stoffregena, M. Merschmana, E. Freelanda, S.M. Gallowaya, Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 786 (2015) 77-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.03.005>.
- [27] K.M. Melo, C.K. Grisolia, J.C. Pieczarka, L.R. Souza, J. Souza Filho, C.Y. Nagamachi, FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Mutagenesis* 29 (2014) 215-219. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu005>.

- [28] A.M. Oliveira, M.F. Nascimento, M.R.A. Ferreira, D.F. Moura, T.G.S. Souza, G.C. Silva, E.H.S. Ramos, P.M.G. Paiva, P.L. Medeiros, T.G. Silva, L.A.L. Soares, C.A. Chagas, I.A. Souza, T.H. Napoleão, Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L.(Moraceae) in mice, *J. Ethnopharmacol.* 194 (2016) 162-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.004>.
- [29] OECD. Test Guideline 489. In vivo mammalian alkaline comet assay, 2014. In: OECD Guideline for the testing of chemicals, Section 4: Health Effects. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en>
- [30] A.R. Collins, Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay, *Biochim. Biophys. Acta. (BBA) - General Subjects*, 1840 (2014) 794-800. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>.
- [31] W. Schmid, The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 (1975) 9-15. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8).
- [32] J.L.S. Araújo-Filho, M.R. Melo-Júnior, R.K.A. Veiga, M.C.F.P. Machado, V.J.R.M. Patu, N.T. Pontes-Filho, Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 6 (2007) 17-25.
- [33] B.P.F. Silva, M.R.D. Melo-Júnior, J.L.S. Araújo-Filho, V.J.R.M. Patus, C.B.D.L. Cavalanti, N.T.D. Pontes-Filho, Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos, *Rev. Para. Med.* 20 (2006) 07-14.
- [34] A. Agil, R.J. Reiter, A. Jiménez-Aranda, R. Ibán-Arias, M. Navarro-Alarcón, J.A. Marchal, A. Adem, G. Fernández-Vázquez, Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in Young Zucker diabetic fatty rats, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 381-388. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12012>.

- [35] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. SCHNEIDER, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175 (1988) 184-19. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [36] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
- [37] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23 (2008) 143-151. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
- [38] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research Letters* 245 (1990) 245-249. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B).
- [39] OECD. Test Guideline 474. Mammalian erythrocyte micronucleus test, 2016. In: OECD Guideline for the testing of chemicals, Section 4: Health Effects. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264762-en>.
- [40] P.J. Brooks, S. Zakhari, Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis, *Environ. Mol. Mutagen.* 55 (2014) 77-91. <http://dx.doi.org/10.1002/em.21824>.
- [41] K. Linhart, H. Bartsch, H.K. Seitz, The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic ethanol-DNA adducts, *Redox Biol.* 3 (2014) 56-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.009>.
- [42] T.M. Leung, N. Nieto, CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease, *J. Hepatol.* 58 (2013) 395-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.018>.

- [43] Y. Yukawa, S. Ohashi, Y. Amanuma, Y. Nakai, M. Tsurumaki, O. Kikuchi, S. Miyamoto, T. Oyama, T. Kawamoto, T. Chiba, T. Matsuda, M. Muto. Impairment of aldehyde dehydrogenase 2 increases accumulation of acetaldehyde-derived DNA damage in the esophagus after ethanol ingestion. *Am. J. Cancer Res.* 4 (2014) 279-284.
- [44] L. Kaphalia, W.J. Calhoun, Alcoholic lung injury: metabolic, biochemical and immunological aspects, *Toxicol. Lett.* 222 (2013) 171-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.07.016>.
- [45] S. Grossi, A. Sumberaz, M. Gosmar, F. Mattioli, G. Testino, A. Martelli, DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (2008) 22-25. <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f163fe>.
- [46] P. Navasumrit, T.H. Ward, P.J. O'connor, J. Nair, N. Frank, H. Bartsch, Ethanol enhances the formation of endogenously and exogenously derived adducts in rat hepatic DNA, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 479 (2001) 81-94. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00156-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00156-7).
- [47] S. Suman, S. Kumar, P. N'Gouemo, K. Datta, Increased DNA double-strand break was associated with downregulation of repair and upregulation of apoptotic factors in rat hippocampus after alcohol exposure, *Alcohol* 54 (2016) 45-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.06.003>.
- [48] J.M. Hansen, C. Harris, Redox control of teratogenesis, *Reprod. toxicol.* 35 (2013) 165-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.09.004>.
- [49] L. Miller-Pinsler, D.J. Pinto, P.G. Wells, Oxidative DNA damage in the in utero initiation of postnatal neurodevelopmental deficits by normal fetal and ethanol-enhanced oxidative stress in oxoguanine glycosylase 1 knockout mice, *Free Radic. Biol. Med.* 78 (2015) 23-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.026>.

- [50] H. Cichoż-Lach, A. Michalak, Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 8082-8091. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>.
- [51] J.J. García, L. Lopez-Pingarrón, P. Almeida-Souza, A. Tres, P. Escudero, F.A. Garcia-Gil, D.X. Tan, R.J. Reiter, J.M. Ramirez, M. Bernal-Perez, Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review, *J. Pineal Res.* 56 (2014) 225-237. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12128>.
- [52] D.A.M. Hermoso, L.B.C. Shimada, E.H. Gilgioni, J. Constantin, M.S. Mito, A.P.M. Hermoso, Melatonin protects female rats against steatosis and liver oxidative stress induced by oestrogen deficiency, *Life Sci.* 157 (2016) 178-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.044>.
- [53] A. Leibowitz, A. Volkov, K. Voloshin, C. Shemesh, I. Barshack, Grossman, E. Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 48-54. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12287>.
- [54] H.M. Yeung, M.W. Hung, C.F. Lau, M.L. Fung, Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats, *J. Pineal Res.* 58 (2015) 12-25. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12190>.
- [55] L.G.A. Chuffa, J.P.A. Amorim, G.R. Teixeira, L.O. Mendes, B.A. Fioruci, P.F.F. Pinheiro, F.R.F. Seiva, E.L.B. Novelli, W. Mello Jr, M. Martinez, C.C.D. Almeida-Francia, F. E. Martinez, Long-Term Exogenous Melatonin Treatment Modulates Overall Feed Efficiency and Protects Ovarian Tissue Against Injuries Caused by Ethanol-Induced Oxidative Stress in Adult UChB Rats, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35 (2011) 1498-1508. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01486.x>.
- [56] A. Karamian, M. Shokrzadeh, A. Ahmadi, The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes, *Toxicol. Ind. Health* 32 (2016) 360-366. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233713500824>.

- [57] G.G. Korkmaz, H. Uzun, U. Cakatay, S. Aydin, Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury, *Clin. Invest. Med.* 35 (2012) 370-377. <http://dx.doi.org/10.25011/cim.v35i6.19209>.
- [58] K.K. Gupta, V.K. Gupta, T. Shirasaka, An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40 (2016) 1594-1602, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13135>.
- [59] B. Engdahl, M. Ramstedt, Is the population level link between drinking and harm similar for women and men?—a time series analysis with focus on gender-specific drinking and alcohol-related hospitalizations in Sweden, *Eur. J. Public Health* 21 (2011) 432-437. <http://dx.doi.org/10.1093/eurpub/ckq096>.
- [60] S.C. Wilsnack, R.W. Wilsnack, L.W. Kantor, Focus on: women and the costs of alcohol use, *Alcohol Res.* 35 (2014) 219.
- [61] S.C. Burke, J. Cremeens, K. Vail-Smith, C. Woolsey, Drunkorexia: Calorie restriction prior to alcohol consumption among college freshman. *J. Alcohol Drug Educ.* 54 (2010) 17.
- [62] J. Rehm, B. Taylor, S. Mohapatra, H. Irving, D. Baliunas, J. Patra, M. Roerecke, Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis, *Drug Alcohol Rev.* 29 (2010) 437-445, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1465-3362.2009.00153.x>.
- [63] P.A. Costa, J.H.Z. Poli, N.D.M. Sperotto, D.J. Moura, J. Saffi, M.S. Nin, H.M.T. Barros, Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats, *Psychopharmacology* 232 (2015) 3623-3636. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-015-4015-x>.
- [64] R. Kido, I. Sato, S. Tsuda, Detection of in vivo DNA damage induced by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *J. Vet. Med. Sci.* 68 (2006) 41-47. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.68.41>.

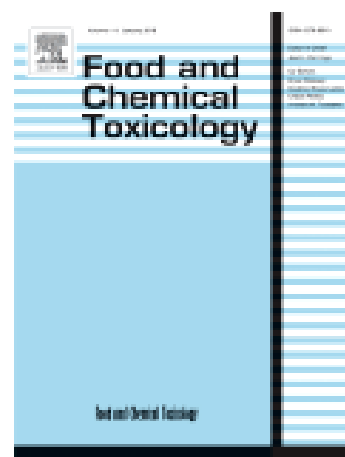
- [65] N.C.D. Oliveira, M.S. Sarmento, E.A. Nunes, C.M. Porto, D.P. Rosa, S.R. Bona, G.Rodrigues, N.P. Marroni, P. Pereira, J.N. Picada, A.B.F. Ferraz, F.V. Thiesen, J.Silva. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 1208-1214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.028>.
- [66] A.K. Fowler, A. Hewetson, R.G. Agrawal, M. Dagda, R. Moaddel, S. Balbo, M. Sanghvi, Y. Chen, R.J. Hogue, S.E. Bergeson, G.I. Henderson, I.I. Kruman, Alcohol-induced one-carbon metabolism impairment promotes dysfunction of DNA base excision repair in adult brain. *J Biol Chem.* 287 (2012) 43533-43542. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.401497>.
- [67] L. Guo, L.H. Wang, B. Sun, J.Y. Yang, Y.Q. Zhao, Y.X. Dong, M.I. Spranger, C.F. Wu, Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in mouse brain cells, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5881-5891. <http://dx.doi.org/10.1021/jf070440a>.
- [68] M.P. Miguel, L.B. Menezes, E.G. Araújo, Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (Caryocar brasiliense), *Encicl. Biosf.* 8 (2012) 1960-1976.
- [69] N.P. Singh, H. Lai, A. Khan, Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells, *Mutat. Res./Genet. Toxicol.* 345 (1995) 191-196. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90054-3](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(95)90054-3).
- [70] E. Cemeli, A. Baumgartner, D. Anderson, Antioxidants and the Comet assay, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 681 (2009) 51-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.002>.
- [71] O. Pechanova, L. Paulis, F. Simko, Peripheral and central effects of melatonin on blood pressure regulation, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17920-17937. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms151017920>.
- [72] G. Testino, P. Borro, O. Ancarani, A. Sumberaz, Human carcinogenesis and alcohol in hepato-gastroenterology, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16 (2012) 512-518.

- [73] A.K. Fowler, J. Thompson, L. Chen, M. Dagda, J. Dertien, K.S.S. Dossou, R. Moaddel, S. E. Bergeson, I.I. Kruman, Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity, *PloS one* 9 (2014) e106945. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106945>.
- [74] M.E. Calderón-Segura, J.A.M. Rojas, M.G.M. Brito, M. Teccab, M.C. Calderón-Ezquerro, S. Gómez-Arroyo, Genotoxicity of the Neonicotinoid Insecticide Poncho (Clothianidin) on CD1 Mice Based on Alkaline Comet and Micronucleus Assays, in: M.L. Larramendy, S. Soloneski (Eds.), *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*, 2015, p.p. 113-125. <http://dx.doi.org/10.5772/61174>.
- [75] L.M. Zapata, B.C. Bock, L.Y. Orozco, J.A. Palacio, Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127 (2016) 108-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>.
- [76] A. Azqueta, A.R. Collins, The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair, *Arch Toxicol.* 87 (2013) 949-968. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>.
- [77] S. Bonassi, R. El-Zein, C. Bolognesi, M. Fenech, Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies, *Mutagenesis* 26 (2011) 93-100. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq075>.

CAPÍTULO III

Ação da melatonina exógena sobre o fígado da prole de ratas submetidas à exposição crônica ao álcool durante a prenhez: um estudo morfométrico, histoquímico e imunohistoquímico

Artigo a ser submetido à revista:
Food and Chemical Toxicology



AÇÃO DA MELATONINA EXÓGENA SOBRE O FÍGADO DA PROLE DE RATAS
SUBMETIDAS À EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ÁLCOOL DURANTE A PRENHEZ: UM
ESTUDO MORFOMÉTRICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO

Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho^{a,*}; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a; Carolline
Guimarães D`Assunção^a; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^b; Katharine Raquel
Pereira dos Santos^b; Cristiano Aparecido Chagas^b; Valéria Wanderley Teixeira^a; Álvaro
Aguiar Coelho Teixeira^a

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE, Brasil

^b Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de Vitória, Universidade
Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, 55608-680, Bela Vista, Vitória de
Santo Antão - PE, Brasil

***Autor para correspondência:**

Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho (I.D.D.S. Coelho), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900. Telefone: +55 81 99506-4612.
E-mail: ilkadayane@hotmail.com

RESUMO

O consumo de álcool na gestação constitui uma das questões mais preocupantes, visto que a indução do estresse oxidativo e o acúmulo de acetaldeído estão fortemente relacionados às desordens embriológicas e fetais provocadas pela exposição intrauterina ao etanol. Sabe-se que a melatonina é um hormônio antioxidante, apontado como modulador da inflamação e da lesão celular em diversos órgãos, inclusive no fígado. O objetivo desse estudo foi analisar a ação da melatonina exógena sobre o fígado da prole de ratas submetidas à exposição crônica ao álcool durante a prenhez, numa perspectiva morfológica, histoquímica e imunohistoquímica. Utilizou-se 20 ratas prenhes, divididas nos grupos: Controle – Ratas que

receberam água destilada; Álcool – Ratas que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia); Mel 10mg – Ratas que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia) e melatonina (10 mg/kg/dia); Mel 15mg – Ratas que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia) e melatonina (15 mg/kg/dia). Seis neonatos (três machos e três fêmeas) de cada grupo foram anestesiados, medidos e pesados. Em seguida, o fígado foi removido e processado para posteriores análises morfológicas, histoquímicas (quantificação de glicogênio e colágeno) e imunohistoquímicas (TNF- α e IL-6). A exposição intrauterina ao etanol provocou redução significativa no comprimento e peso dos neonatos do grupo álcool. No fígado desses animais, observou-se redução no número de hepatócitos, na sua área nuclear, com aumento da área citoplasmática, diminuição do teor de glicogênio e elevação das citocinas TNF- α e IL-6. Contudo, o número de megacariócitos e a deposição de colágeno não foram alterados. Os tratamentos com melatonina a 10 e a 15 mg/kg durante a gestação protegeram os neonatos contra as injúrias provocadas pelo consumo materno de álcool. Assim, sugerimos que a terapia com melatonina exógena é uma estratégia eficiente na proteção da prole contra danos induzidos pela exposição pré-natal ao álcool. No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhor avaliar seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Etanol; Hepatócito; Imunohistoquímica; Melatonina; Morfometria; Neonato.

ABSTRACT

Consumption of alcohol during gestation is one of the most worrying issues, since the induction of oxidative stress and the accumulation of acetaldehyde are strongly related to the embryological and fetal disorders caused by the intrauterine exposure to ethanol. In this context, it is known that melatonin is an antioxidant hormone, aimed at modulating inflammation and cell damage in various organs, including the liver. The objective of this study was to analyze the action of exogenous melatonin on the liver of the offspring of rats submitted to chronic exposure to alcohol during pregnancy, in a morphometric, histochemical and immunohistochemical perspective. Twenty pregnant rats were used and divided into the groups: Control - Rats receiving distilled water; Alcohol - Rats receiving ethyl alcohol (3 g/kg/day); Mel 10mg - Rats receiving ethyl alcohol (3 g/kg/day) and melatonin (10 mg/kg/day); Mel 15mg - Rats receiving ethyl alcohol (3 g/kg/day) and melatonin (15 mg/kg/day). Six neonates (three males and three females) from each group were anesthetized, measured and weighed. The liver was then removed and processed for further morphometric, histochemical (quantification of glycogen and collagen) and immunohistochemical analyzes

(TNF- α and IL-6). Intrauterine exposure to ethanol caused a significant reduction in the length and weight of neonates from group Alcohol. In the liver, was observed a reduction in the number of hepatocytes, from the nuclear area, with an increase in cytoplasmic area, a decrease in glycogen content and elevation of TNF- α and IL-6 cytokines. However, the number of megakaryocytes and collagen deposition were not altered. Treatments with melatonin at 10 and 15 mg/kg during pregnancy protected the neonates against injuries caused by maternal consumption of alcohol. Thus, we suggest that exogenous melatonin therapy is an effective strategy for protecting offspring from prenatal exposure to alcohol. However, further studies should be performed to better evaluate its mechanism of action.

Keywords: Ethanol; Hepatocyte; Immunohistochemistry; Melatonin; Morphometry; Neonate.

1. Introdução

O alcoolismo materno constitui um dos problemas mais preocupantes decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas, pois a exposição pré-natal ao etanol está associada a graves complicações que incluem abortos espontâneos, partos prematuros, anormalidades físicas e cognitivas permanentes e irreversíveis aos recém-nascidos. Esse conjunto de condições que podem ocorrer devido ao consumo de álcool durante a gravidez é denominado de Desordens do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) (May et al., 2014; Mishra et al., 2015).

A Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) constitui a consequência mais severa da FASD, abrangendo dismorfias faciais características, atraso nos crescimentos pré e/ou pós-natal, anormalidades estruturais e distúrbios neurológicos, podendo a criança apresentar outras malformações congênitas, dificuldades de aprendizagem e de memória, problemas funcionais, emocionais e de comportamento (Jones; Smith, 1973; May et al., 2014). A prevalência média mundial para o diagnóstico da SAF é variável. No entanto, estima-se uma média de 1-2 a cada 1.000 nascidos vivos ao ano. Esta incidência tende a aumentar quando são incluídos os casos de crianças que apresentam características parciais da SAF (Roozen et al., 2016).

O álcool ingerido pela mãe cruza facilmente a barreira placentária por difusão simples e se distribui de forma rápida pelo líquido amniótico, atingindo os tecidos fetais (Heller; Burd, 2014). Como a placenta possui capacidade limitada para a metabolização do etanol e a função hepática fetal ainda não está totalmente desenvolvida, as concentrações sanguíneas de álcool são mais elevadas no feto, onde seu efeito tóxico é exacerbado (Burd et al., 2007).

Embora os mecanismos moleculares da toxicidade do etanol no feto não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que o acetaldeído e a indução do estresse oxidativo estejam fortemente relacionados ao desequilíbrio do estado redox intracelular e contribua para as desordens observadas nos modelos de FASD (Dong et al. 2010; Leung; Nieto, 2013). As moléculas de acetaldeído e de espécies reativas geradas durante o metabolismo do álcool são altamente tóxicas às células, em especial, aos neurônios e hepatócitos, pois são capazes de reagir e lesionar macromoléculas essenciais como lipídios, proteínas e DNA, levando à disfunção ou morte celular (Louvét; Mathurin, 2015; Kruman; Fowler, 2014; Suzanne; Kril, 2014). Além disso, a ingestão materna de álcool pode causar alterações na migração e na diferenciação celular, interferindo no processo de organogênese (Siegenthaler; Miller, 2004; Zhou et al., 2011).

Alguns estudos têm sugerido o tratamento com antioxidantes na prevenção contra os efeitos causados pela exposição intrauterina ao álcool (Chen et al., 2013; Reimers et al., 2006). A melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal durante a fase de escuro, responsável pela regulação dos ritmos circadiano e sazonal (Claustrat; Leston, 2015). Porém, mais recentemente, estudos têm demonstrado sua importância na modulação da inflamação, na lesão celular e como um potente antioxidante, mostrando seus benefícios na redução do estresse oxidativo em diversos órgãos, inclusive no fígado (El-Sokkary et al., 2010; Kang et al., 2011; Reiter et al., 2016; Shin et al., 2015). No entanto, pouco se sabe acerca do seu efeito protetor no desenvolvimento do fígado de neonatos de mães alcoólicas. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a ação da melatonina exógena sobre a morfometria, histoquímica e imunohistoquímica do fígado da prole de ratas submetidas à exposição crônica ao álcool durante a prenhez.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizadas 20 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200 ± 30 g. Os animais foram oriundos da colônia do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Durante todo o experimento, as fêmeas foram acondicionadas em caixas de polipropileno adequadas, com alimentação e água *ad*.

libitum, mantidas à temperatura controlada de 22 ± 1 °C e expostas a um ambiente de ciclo claro-escuro de 12 horas (luminosidade entre 7:00 e 19:00 horas). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (CEUA – UFRPE), com licença de número 009/2016.

2.2. Acasalamento

Para o acasalamento, as ratas foram colocadas nas caixas, na proporção de três fêmeas para cada macho da mesma linhagem, sempre no início da noite (18:00 horas). No dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos, sempre no período da manhã (06:00 horas), para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de células descamativas e espermatozoides ao exame microscópico. Este foi considerado como o primeiro dia de prenhez.

2.3. Grupos experimentais

Após a confirmação do acasalamento, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, contendo cinco animais cada: Controle – Ratas prenhes que receberam apenas água destilada; Álcool – Ratas prenhes que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia); Mel 10mg – Ratas prenhes que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia) e melatonina (10 mg/kg/dia); Mel 15mg – Ratas prenhes que receberam álcool etílico (3 g/kg/dia) e melatonina (15 mg/kg/dia).

2.4. Administração do etanol

As matrizes dos grupos Álcool, Mel 10mg e Mel 15mg receberam diariamente álcool etílico absoluto P.A. (Vetec[®]), na dosagem de 3 g/kg de peso corporal, diluído em água destilada, com volume final de 3,8 ml, via oral, através de gavagem intragástrica, durante todo o período gestacional. As ratas do grupo Controle receberam diariamente 3,8 mL de água destilada, via oral, por gavagem intragástrica, durante toda a prenhez (Araújo-Filho et al., 2007; Veiga et al., 2007).

2.5. Tratamentos com melatonina

A administração de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) foi realizada diariamente nas ratas grupos dos Mel 10mg e Mel 15mg, durante toda a prenhez, nas concentrações de 10 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. Para tanto, a melatonina foi dissolvida em um valor mínimo de álcool etílico absoluto P.A. e depois diluída na água de beber, com concentração final de 0,07% (p/v) de etanol. As garrafas de água foram envolvidas com papel alumínio para proteção contra a luz (Agil et al., 2013).

2.6. Análises do peso e tamanho dos neonatos, morfometria e histoquímicas do fígado

Após o nascimento da prole, no primeiro dia, seis neonatos (três machos e três fêmeas) de cada grupo experimental foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intraperitoneal, pesados utilizando-se balança eletrônica de precisão e medidos com auxílio de um paquímetro. Em seguida, tiveram o fígado removido. Os fígados coletados foram imersos em formol tamponado a 10%, permanecendo por 24 horas. Em seguida, esses materiais foram processados, seguindo a técnica histológica de rotina e incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados à espessura de 4 μm e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação morfométrica. Para a análise histoquímica foram utilizados os corantes: ácido periódico de Schiff (PAS) para a quantificação de glicogênio hepático e o picrosirius red para a detecção do colágeno.

Para a morfometria dos fígados dos neonatos, as lâminas histológicas foram fotografadas através do programa Motic[®] Imagens Plus 2.0, utilizando-se uma câmera de captura digital (Moticam 2300) de 3.0 megapixels, acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-200). Foram obtidas 15 fotomicrografias por animal, em aumento total de 400x. Para as mensurações morfométricas foi usado o software *ImageJ*, versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Foram considerados o número de hepatócitos (NH), o número de megacariócitos (NMC), a área citoplasmática dos hepatócitos (ACH) e a área nuclear dos hepatócitos (ANH). Um total de 100 hepatócitos foi utilizado por animal para a mensuração das áreas citoplasmática e nuclear. As medidas de áreas foram mensuradas em micrômetros quadrados (μm^2) (Marinho et al., 2017).

Para as técnicas de coloração pelo ácido periódico de Schiff e picrosirius red foram obtidas seis fotomicrografias por grupo, com a mesma ampliação, através de um microscópio

Olympus® BX50 acoplado a uma câmera de vídeo Sony®. As imagens foram quantificadas em pixels utilizando-se o software de imagem *Gimp* 2.6 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) (Lemos et al., 2014).

2.7. *Imunohistoquímica do fígado (IL6 e TNF α)*

Para avaliar a expressão da interleucina-6 (IL6) e do fator de necrose tumoral (TNF α) no fígado dos neonatos, foram obtidos cortes de 3 μ m aderidos a lâminas silanizadas, inicialmente desparafinizados e hidratados em concentrações decrescentes de álcool até a água destilada. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica, utilizando-se uma solução de tampão citrato (pH 8.0), em micro-ondas, a alta potência, por 5 minutos. Após resfriamento, as lâminas foram incubadas em PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 30 minutos. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação dos cortes em albumina sérica bovina (BSA) 5% em PBS, durante uma hora. Os anticorpos primários (IL6 e TNF α) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% e aplicados sobre os cortes, permanecendo *overnight*. Em seguida, os cortes foram incubados com HistoFine® por 30 minutos. A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, Dako Cytomation™) até os cortes ficarem escuros, sendo contracolorados com hematoxilina. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas. As fotomicrografias foram capturadas através de uma câmera de vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® BX50.

As imagens foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.6 para quantificação através do programa Histograma RGB (Red-Green-Blue), baseado na intensidade de luminescência, onde os tons dos pixels das imagens variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255 representa o branco absoluto (maior luminescência) (Lee et al., 2001; Oberholzer et al., 1996).

2.8. *Análise estatística*

Os dados sobre o peso e o comprimento dos filhotes, as mensurações dos parâmetros morfométricos, a quantificação do glicogênio e do colágeno hepáticos e das

imunohistoquímicas (IL-6 e TNF- α) foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Análise do peso e comprimento dos filhotes

De acordo com a análise estatística, constatou-se uma redução significativa no peso e no comprimento dos filhotes pertencentes ao grupo álcool quando comparados aos demais grupos experimentais (Figuras 1 e 2).

3.2. Análise morfológica

Os resultados da análise morfológica demonstraram que houve uma diminuição significativa na quantidade de hepatócitos e na área nuclear dessas células, com aumento significativo na área citoplasmática dos hepatócitos dos filhotes do grupo Álcool quando comparados aos dos grupos Controle, Mel 10 mg e Mel 15 mg. Os tratamentos com melatonina exógena a 10 mg/kg e a 15 mg/kg foram eficazes contra os efeitos causados pela exposição intrauterina ao álcool. No entanto, o número de megacariócitos não foi significativamente alterado (Tabela 1).

3.3. Histoquímicas (PAS e Picrosirius Red)

A avaliação do glicogênio hepático foi realizada pela técnica do PAS (Figuras 3 e 4). Os neonatos do grupo Álcool apresentaram menor quantidade de glicogênio quando comparado aos demais grupos experimentais. Com relação à quantificação de colágeno utilizando-se o picrosirius red, constatou-se que não houve variação significativa entre os grupos experimentais comparados (Figuras 5 e 6).

3.4. Imunohistoquímicas (IL6 e TNF α)

A imunomarcção para a expressão das citocinas IL-6 e TNF- α no fígado demonstrou que os neonatos de matrizes que receberam apenas álcool etílico durante a prenhez (grupo Álcool) apresentaram um aumento nos níveis dessas citocinas, diferenciando-se significativamente dos neonatos dos grupos Controle, Mel 10mg e Mel 15mg (Figuras 7, 8, 9 e 10). A administração de melatonina exógena a 10 mg/kg e a 15 mg/kg nos grupos Mel 10mg e Mel 15mg, respectivamente, promoveu um padrão de marcação similar ao apresentado pelos neonatos do grupo controle tanto para a IL-6, quanto para o TNF- α .

4. Discussão

O uso de bebidas alcoólicas pela mãe durante a gestação pode afetar o desenvolvimento fetal e levar a transtornos cognitivos, comportamentais e físicos, conhecidos coletivamente como Desordens do Espectro Alcoólico Fetal (FASD) (Dorrie et al., 2014). Seu efeito teratogênico é decorrente da desregulação de vias intracelulares induzida pelo álcool que resulta em toxicidade e morte celular. O aumento da produção de ROS e acetaldeído é apontado como um dos principais contribuintes para essas injúrias (Joya et al., 2015). A melatonina é um poderoso antioxidante bem estabelecido pela literatura, por isso, alguns estudos têm sugerido seu uso na prevenção contra os prejuízos causados pelo álcool na gravidez (Bagheri et al., 2015; Soleimani et al., 2017).

O presente estudo demonstrou que o comprimento e o peso corporal médios dos neonatos do grupo álcool foram significativamente inferiores quando comparados aos demais grupos experimentais. O etilismo materno está fortemente ligado ao risco de prematuridade, um dos fatores que conduzem ao baixo peso ao nascer (Brocardo et al., 2011; Patra et al., 2011; Silva et al., 2011), devido aos efeitos adversos sobre a morfologia e função da placenta, comprometendo o transporte de nutrientes essenciais ao crescimento fetal (Ferdous et al., 2017; Gundogan et al., 2015; Shabtai; Fainsod, 2017).

A administração da melatonina nas dosagens estudadas foi eficaz contra os prejuízos causados pela exposição intrauterina ao álcool sobre o crescimento e o peso ao nascer, provavelmente, devido às suas propriedades antioxidantes que são capazes de reduzir o estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de radicais livres, ademais, possui ação antiapoptótica, protege e melhora as funções celulares, reduzindo as complicações neonatais (Gitto et al., 2009).

A hepatotoxicidade do álcool está intimamente relacionada ao seu metabolismo. O acetaldeído e as ROS gerados agem diretamente e danificam macromoléculas cruciais ao desempenho celular, tais como proteínas, lipídios e DNA, favorecendo a morte celular por necrose e/ou apoptose (Ceni et al., 2014), o que pode justificar a redução no número de hepatócitos no fígado dos neonatos do grupo Álcool. O aumento na área citoplasmática do hepatócito observado no fígado dos neonatos do grupo Álcool é compatível com a característica balonamento de hepatócitos evidenciado na esteatohepatite (Lefkowitz, 2005; Lieber, 2004; Monma et al., 2015; Rubin et al., 1968). Entretanto, esses efeitos não foram observados no fígado dos neonatos dos grupos tratados com melatonina, reforçando a sua capacidade de eliminar radicais livres de oxigênio, protegendo as células e os tecidos de danos oxidativos (Farez et al., 2016; Reiter et al., 2016; Tan et al., 2015).

A avaliação do glicogênio hepático mostrou que os neonatos do álcool apresentaram menor acúmulo de glicogênio quando comparados aos demais grupos experimentais. Nas reações do metabolismo do etanol mediadas pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase ocorrem a doação de íons de hidrogênio do álcool para o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) que é transformado na sua forma reduzida (NADH) no citoplasma do hepatócito (Zakhari, 2013). O excesso de NADH altera a homeostase celular e diminui a conversão de lactato em piruvato, consequentemente, reduzindo a síntese e o acúmulo do glicogênio hepático, causando hipoglicemia (Tsai et al., 2014). Mokuda et al. (2003) demonstraram que o etanol estimulou a glicogenólise e inibiu as vias de glicogênese e gliconeogenese hepática em ratos. Assim como em outros estudos, nossos resultados demonstram que o tratamento com melatonina exógena foi capaz de preservar os níveis de glicogênio hepático (Kaya et al., 2010; Mazepa et al., 1999).

A fibrose é uma lesão histológica comum na doença hepática alcoólica, induzida pelas células estreladas (células de Ito) que, quando ativadas, transformam-se em miofibroblatos produtores de colágeno do tipo I e outros componentes da matriz extracelular. As células estreladas são ativadas geralmente por citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ e, principalmente, $\text{TGF-}\beta$ (Fator de Transformação do Crescimento beta) (Klironomos et al., 2014; Pellicoro et al., 2014). Contudo, também podem ser ativadas diretamente pelo acetaldeído, especialmente em baixos níveis de glutathione (Setshedi et al., 2010). Em nossos resultados não foram observadas variações significativas em relação à quantidade de colágeno hepático entre os grupos experimentais comparados. Isso pode ter ocorrido porque o desenvolvimento e a continuidade da fibrose hepática ocorrem de forma lenta e contínua (Mentink-Kane et al., 2011).

Possivelmente o tempo de exposição ao etanol não foi suficiente para que o acúmulo de colágeno se tornasse aparente.

Quanto à resposta inflamatória, nossos resultados mostraram que as imunomarcações para as citocinas TNF- α e IL-6 foram significativamente mais intensas no fígado dos animais do grupo álcool e que a administração de melatonina em ambas as dosagens promoveu um padrão de marcação semelhante ao apresentado pelos neonatos do grupo controle, tanto para o TNF- α quanto para a IL-6. O estresse oxidativo nos hepatócitos e as endotoxinas (lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias gram-negativas do intestino) são estímulos fundamentais para a secreção de TNF- α pelas células de Kupffer que, por sua vez, podem desenvolver uma resposta inflamatória que favorece o surgimento da inflamação hepática (Cichoż-Lach; Michalak, 2014; Kawaratani et al., 2013; Tanno; Ferretti, 2005).

O consumo abusivo e prolongado de etanol favorece a produção de ROS, aumento na quantidade de NADH⁺ e redução de antioxidantes como a glutathione, levando ao estresse oxidativo. As ROS em excesso reagem e provocam lesões no DNA, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e estimulam nas células de Kupffer o fator nuclear kappa B (NF- κ B), aumentando a síntese de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, podendo levar a necrose ou apoptose celular (Ambade et al., 1995).

O álcool e o acetaldeído parecem estar relacionados a disfunções das junções de oclusão do epitélio intestinal, aumentando sua permeabilidade à translocação de endotoxinas de bactérias que colonizam o intestino (Suzuki, 2013; Szabo, 2015). Essas endotoxinas atingem o fígado pela circulação portal e são capazes de desencadear uma resposta imune, estimulando as células de Kupffer à produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 (Szabo; Bala, 2010). Alguns estudos têm reportado aumento na produção de TNF- α em modelos humanos e animais acometidos por doenças hepáticas alcoólicas, apontando esta citocina como crucial no desenvolvimento de injúrias hepáticas (Ji et al., 2004). Wan et al. (2014) demonstraram um aumento significativo na IL-6 hepática em ratos submetidos ao consumo de álcool, sugerindo que essa citocina pode estar envolvida na patogênese das doenças hepáticas alcoólicas.

A melatonina é um poderoso antioxidante, importante na redução do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (Farez et al., 2016; Tan et al., 2015). Isso pode justificar o fato de os neonatos expostos ao álcool e simultaneamente tratados com melatonina a 10 mg/kg e a 15 mg/kg apresentarem um padrão de marcação para as citocinas semelhante aos do grupo controle. A melatonina pode ter reduzido os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e

IL-6 e, conseqüentemente, a resposta inflamatória, por atenuar os danos oxidativos, ativar mecanismos anti-inflamatórios e ser capaz de modificar a expressão do RNAm desses marcadores pró-inflamatórios (Cuesta et al., 2010). Além disso, esse hormônio pode reduzir a ligação de NF-kB ao DNA, provavelmente impedindo sua translocação para o núcleo, fator crucial para a produção das citocinas pró-inflamatórias (Korkmaz et al., 2009; Reiter et al., 2000). Embora alguns estudos sobre o efeito anti-inflamatório da melatonina tenham sido realizados, os mecanismos de atuação ainda não estão claros. Hu et al. (2009) demonstraram que o tratamento com melatonina exógena atenuou os níveis de citocinas inflamatórias, a peroxidação lipídica, a infiltração de neutrófilos e inibiu a apoptose de hepatócitos no fígado de camundongos expostos ao álcool. Esses mesmos autores ainda mostraram que as células de Kupffer isoladas dos animais que receberam etanol produziram grandes quantidades de ROS e TNF- α , enquanto que as células de Kupffer daqueles tratados com melatonina apresentaram menor nível dessas citocinas.

Em conclusão, sugerimos que a melatonina pode evitar possíveis efeitos teratogênicos provocados pelo etanol, certamente, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, representando, assim, um agente terapêutico eficiente na proteção contra os danos induzidos pela exposição intrauterina ao álcool. No entanto, outras investigações são necessárias para melhor conhecimento sobre seus mecanismos de ação.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Agil, A., Reiter, R.J., Jiménez-Aranda, A., Ibán-Arias, R., Navarro-Alarcón, M., Marchal, J.A., Adem, A., Fernández-Vázquez, G., 2013. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* 54, 381-388. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12012>.

Ambade, A., Mandrekar, P., 2012. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *Int. J. Hepatol.* 2012: 853175. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/853175>.

Araújo-Filho, J.L.S., Melo-Júnior, M.R., Veiga, R.K.A., Machado, M.C.F.P., Patu, V.J.R.M., Pontes-Filho, N.T., 2007. Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. *Rev. Ciên. Méd. Biol.* 6, 17-25.

Bagheri, F., Goudarzi, I., Lashkarbolouki, T., Salmani, M.E., 2015. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. *Behav. Brain Res.* 287, 215-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.022>.

Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R., 2011. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res. Rev.* 67, 209-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.001>.

Burd, L., Roberts, D., Olson, M., Odendaal, H., 2007. Ethanol and the placenta: a review. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 20, 361-375. <http://dx.doi.org/10.1080/14767050701298365>.

Ceni, E., Mello, T., Galli, A., 2014 Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J. Gastroenterol.* 20, 17756. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17756>.

Chen, X., Liu, J., Chen, S.Y., 2013. Sulforaphane protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in neural crest cells by the induction of Nrf2-mediated antioxidant response. *Br. J. Pharmacol.* 169, 437-448. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12133>.

Cichoż-Lach, H., Michalak, A., 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 20, 8082. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>.

Claustrat, B., Leston, J., 2015. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 61, 77-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>.

Cuesta, S., Kireev, R., Forman, K., García, C., Escames, G., Ariznavarreta, C., Vara, E., Tresguerres, J.A.F., 2010. Melatonin improves inflammation processes in liver of

senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Exp. Gerontol.* 45, 950-956. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.016>.

Dong, J., Sulik, K.K., Chen, S., 2010. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol. Lett.* 193, 94-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.012>.

Dörrie, N., Föcker, M., Freunscht, I., Hebebrand, J., 2014. Fetal alcohol spectrum disorders. *Eu. Child Adolesc. Psychiatry* 23 863-875. <http://dx.doi.org/10.1007/s00787-014-0571-6>.

El-Sokkary, G.H., Nafady, A.A., Shabash, E.H., 2010. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 456-463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.014>.

Farez, M.F., Calandri, I.L., Correale, J., Quintana, F.J., 2016. Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis. *Bioessays* 38, 1016-1026. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201600018>.

Ferdous, J., Mukherjee, R., Ahmed, K.T., Ali, D.W., 2017. Retinoic acid prevents synaptic deficiencies induced by alcohol exposure during gastrulation in zebrafish embryos. *Neurotoxicology* 62, 100-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.05.011>.

Gitto, E., Pellegrino, A., Gitto, P., Barberi, I., Reiter, R.J., 2009. Oxidative stress of the newborn in the pre-and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J. Pineal Res.* 46, 128-139. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00649.x>.

Gundogan, F., Gilligan, J., Qi, W., Chen, E., Naram, R., De la Monte, S.M., 2015. Dose effect of gestational ethanol exposure on placentation and fetal growth. *Placenta* 36, 523-530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.010>.

Heller, M., Burd, L., 2014. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 100, 277-283. <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.23232>.

Hu, S., Yin, S., Jiang, X., Huang, D., Shen, G., 2009. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 616, 287-292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.044>.

Ji, C., Deng, Q., Kaplowitz, N., 2004. Role of TNF- α in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 40, 442-451. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20309>.

Jones, K.L., Smith, D.W., 1973. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 3, 999-1001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)91092-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91092-1).

Joya, X., Garcia-Algar, O., Salat-Batlle, J., Pujades, C., Vall, O., 2015. Advances in the development of novel antioxidant therapies as an approach for fetal alcohol syndrome prevention. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 103, 163-177. <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.23290>.

Kang, J.W., Koh, E.J., Lee, S.M., 2011. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J. Pineal Res.* 50, 403-411. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00858.x>.

Kawaratani, H., Tsujimoto, T., Douhara, A., Takaya, H., Moriya, K., Namisaki, T., Noguchi, R., Yoshiji, H., Fujimoto, M., Fukui, H., 2013. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/495156>.

Kaya, O., Kilic, M., Celik, I., Baltaci, A.K., Mogulkoc, R., 2010. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23, 241-244.

- Klironomos, S., Notas, G., Sfakianaki, O., Kiagiadaki, F., Xidakis, C., Kouroumalis, E., 2014. Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF- α , TGF- β and PDGF in activated rat hepatic stellate cells. *Regul. Pept.* 188, 5-12 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2013.11.002>.
- Korkmaz, A., Reiter, R.J., Topal, T., Manchester, L.C., Oter, S., Tan, D.X., 2009. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol. Med.* 15, 43. <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2008.00117>.
- Kruman, I.I., Fowler, A.K., 2014. Impaired one carbon metabolism and DNA methylation in alcohol toxicity. *J. Neurochem.* 129, 770-780. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12677>.
- Lee, E.S., Kim, J.H., Im, S., Lee, K.B., Sohn, S., Kang, W.H., 2001. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *Int. J. Dermatol.* 40, 45-49. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-4362.2001.00084.x>.
- Lefkowitch, J.H., 2005. Morphology of alcoholic liver disease. *Clin. Liver Dis.* 9, 37-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2004.11.001>.
- Lemos, A.J.J.M., Peixoto, C.A., Teixeira, A.A.C., Luna, R.L.A., Rocha, S.W.S., Santos, H.M.P., Silva, A.K.S., Nunes, A.K.S., Wanderley-Teixeira, V., 2014. Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 159-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.015>.
- Leung, T., Nieto, N., 2013. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 58, 395-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.018>.
- Lieber, C.S., 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34, 9-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.008>.

Louvet, A., Mathurin, P., 2015. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 231-242. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.35>.

Marinho, K.S.N., Antonio, E.A., Silva, C.V.N.S., Silva, K.T., Teixeira, V.W., Aguiar Júnior, F.C.A., Santos, K.R.P., Silva, N.H., Santos, N.P.S., 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *C. ladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1073-1084. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160650>.

May, P.A., Gossage, J.P., 2001. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome: A summary. *Alcohol Res. Health* 25, 159-167.

May, P.A., Baete, A., Russo, J., Elliott, A.J., Blankenship, J., Kalberg, W.O., Buckley, D., Brooks, M., Hasken, J., Abdul-Rahman, O., Adam, M.P., Robinson, L.K., Manning, M., Hoyme, H.E., 2014. Prevalence and characteristics of fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics* 134, 855-866.

Mazepa, R.C., Cuevas, M.J., Collado, P.S., González-Gallego, J., 1999. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* 66, 153-160. [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00573-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00573-1).

Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., Wilson, M.S., Madala, S.K., Beers, L.M., Ramalingam, T.R., Wynn, T.A., 2011. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology* 141, 2200-2209. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.008>.

Mishra, S., Rani, A., Srivastava, A., Rani, A., 2015. Embryotoxic Effects of Alcohol on Pregnancy. *Int. J. Clin. Toxicol.* 3, 1-5.

Mokuda, O., Tanaka, H., Hayashi, T., Ooka, H., Okazaki, R., Sakamoto, Y., 2004. Ethanol stimulates glycogenolysis and inhibits both glycogenesis via gluconeogenesis and from

exogenous glucose in perfused rat liver. *Ann. Nutr. Metab.* 48, 276-280. <http://dx.doi.org/10.1159/000080463>.

Monma, C.A., Silva, N.N., Neotti, T., Coutinho, V.A.C.; Brito, R.B.; Domingues, R.J.S., Ribeiro, N.A.B., 2015. Estudo piloto: análise do fígado de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental e tratados com *Morinda citrifolia* (noni). *Rev. Panamazonica Saude* 6, 11-18. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232015000400002>.

Oberholzer, M., Östreicher, M., Christen, H., Brühlmann, M., 1996. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell Biol.* 105, 333-355.

Patra, J., Bakker, R., Irving, H., Jaddoe, V.W.V., Malini, S., Rehm, J., 2011. Dose-response relationship between alcohol consumption before and during pregnancy and the risks of low birthweight, preterm birth and small for gestational age (SGA)-a systematic review and meta-analyses. *BJOG* 118, 1411-1421. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.03050.x>.

Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., Fallowfield, J.A., 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 181-194. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3623>.

Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J., Tanguay, R.L., 2006. Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 497-508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2006.05.007>.

Reiter, R.J., Calvo, J.R., Karbownik, M., Qi, W., Tan, D.X., 2000. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 376-386. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05402.x>.

Reiter, R.J., Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, S.M., Alatorre-Jimenez, M., Qin, L., 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 61, 253-278. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12360>.

Roozen, S., Peters, G.J.Y., Kok, G., Townend, D., Nijhuis, J., Curfs, L., 2016. Worldwide prevalence of fetal alcohol spectrum disorders: A systematic literature review including meta-analysis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 18-32. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12939>.

Rubin, E., Hutterer, F., Lieber, C.S., 1968. Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. *Science* 159, 1469-1470. <http://dx.doi.org/10.1126/science.159.3822.1469>.

Setshedi, M., Wands, J. R., Monte, S.M., 2010. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, p. 178-185. <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.3.12288>.

Shabtai, Y., Fainsod, A., 2017. Competition between ethanol clearance and retinoic acid biosynthesis in the induction of Fetal Alcohol Syndrome. *Biochem. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1139/bcb-2017-0132>.

Shin, I.S., Shin, N.R., Park, J.W., Jeon, C.M., Hong, J.M., Kwon, O.K., Kim, J.S., Lee, I.C., Kim, J.C., Oh, S.R., Ahn, K.S., 2015. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling. *J. Pineal Res.* 58, 50-60. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12192>.

Siegenthaler, J.A., Miller, M.W., 2004. Transforming growth factor β 1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb. Cortex* 14, 791-802. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhh039>.

Silva, I., Quevedo, L.A., Silva, R.A., Oliveira, S.S., Pinheiro, R.T., 2011. Associação entre abuso de álcool durante a gestação e o peso ao nascer. *Rev. Saude Publica* 45, 864-869.

Soleimani, E., Goudarzi, I., Abrari, K., Lashkarbolouki, T., 2017. Maternal administration of melatonin prevents spatial learning and memory deficits induced by developmental ethanol and lead co-exposure. *Physiol. Behav.* 173, 200-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.012>.

Suzanne, M., Kril, J.J., 2014. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 127, 71-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1233-3>.

Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 631-659. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>.

Szabo, G., Bala, S., 2010. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J. Gastroenterol.* 16, 1321. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i11.1321>.

Szabo, G., 2015. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 148, 30-36. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.042>.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Esteban-Zubero, E.E., Zhou, Z., Reiter, R.J., 2015. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules* 20, 18886-18906. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201018886>.

Tanno, D.M.E., Ferretti, S. Injuria hepática por alcohol. Aspectos fisiopatológicos.

Tsai, W., Matsumura, S., Liu, W., Phillips, N.G., Sonntag, T., Hao, E., Lee, S., Haic, T., Montminy, M., 2015. ATF3 mediates inhibitory effects of ethanol on hepatic gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2699-2704. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1424641112>.

Veiga, R.K.A., Melo-Júnior, M.R., Araújo-Filho, J.L.S., Mello, L.A., Pontes-Filho, N.T., 2007. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de Peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. *Rev. Eletronica Farm.* 4, 32-42. <http://dx.doi.org/10.5216/ref.v4i1.2119>.

Zakhari, S., 2013. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res.* 35, 6-16.

Zhou, F.C., Balaraman, Y., Teng, M.X., Liu, Y., Singh, R., Nephew, K.P., 2011. Alcohol alters DNA methylation patterns and inhibits neural stem cell differentiation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 735-746. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01391.x>.

Tabela 1: Média $\pm$ desvio padrão do número de hepatócitos (NH), área citoplasmática dos hepatócitos (ACH), área do núcleo dos hepatócitos (ANH) e número de megacariócitos (NM) nos neonatos dos grupos experimentais.

	Grupos			
	Controle	Álcool	Mel 10mg	Mel 15 mg
NH	159,10 $\pm$ 5,70 ^a	133,12 $\pm$ 3,88 ^b	164,70 $\pm$ 8,71 ^a	163,94 $\pm$ 8,49 ^a
ACH (μm^2)	33,75 $\pm$ 5,06 ^b	44,46 $\pm$ 3,25 ^a	36,29 $\pm$ 2,53 ^b	34,20 $\pm$ 2,12 ^b
ANH (μm^2)	7,63 $\pm$ 0,32 ^a	6,26 $\pm$ 0,11 ^b	8,16 $\pm$ 1,03 ^a	8,18 $\pm$ 1,16 ^a
NM	0,60 $\pm$ 0,26 ^a	0,42 $\pm$ 0,20 ^a	0,63 $\pm$ 0,22 ^a	0,50 $\pm$ 0,16 ^a

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$).

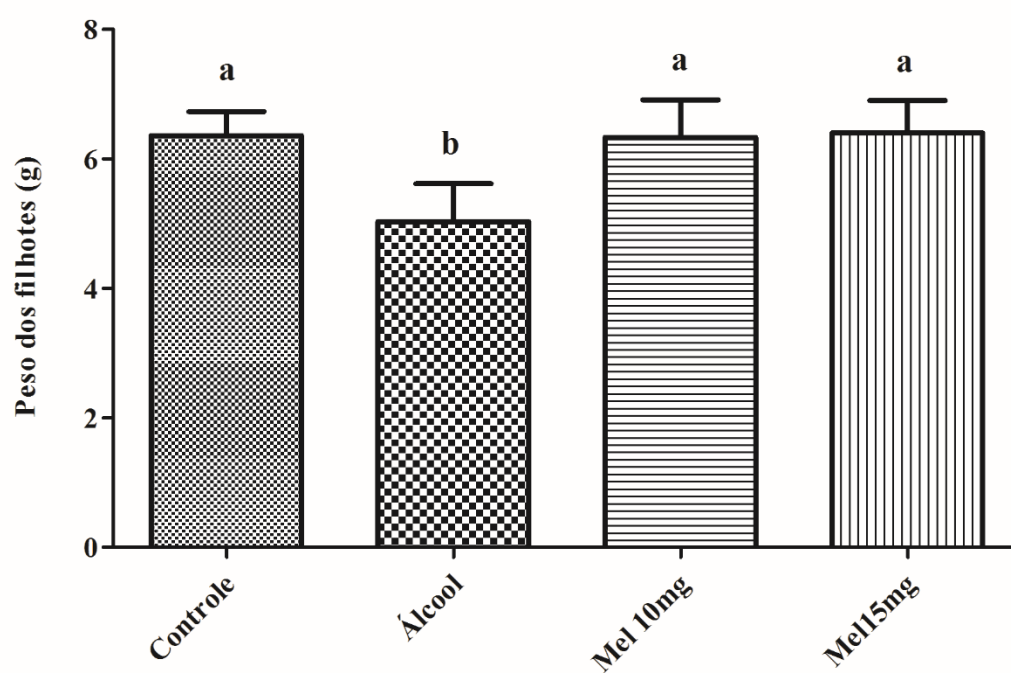


Figura 1: Peso dos filhotes dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

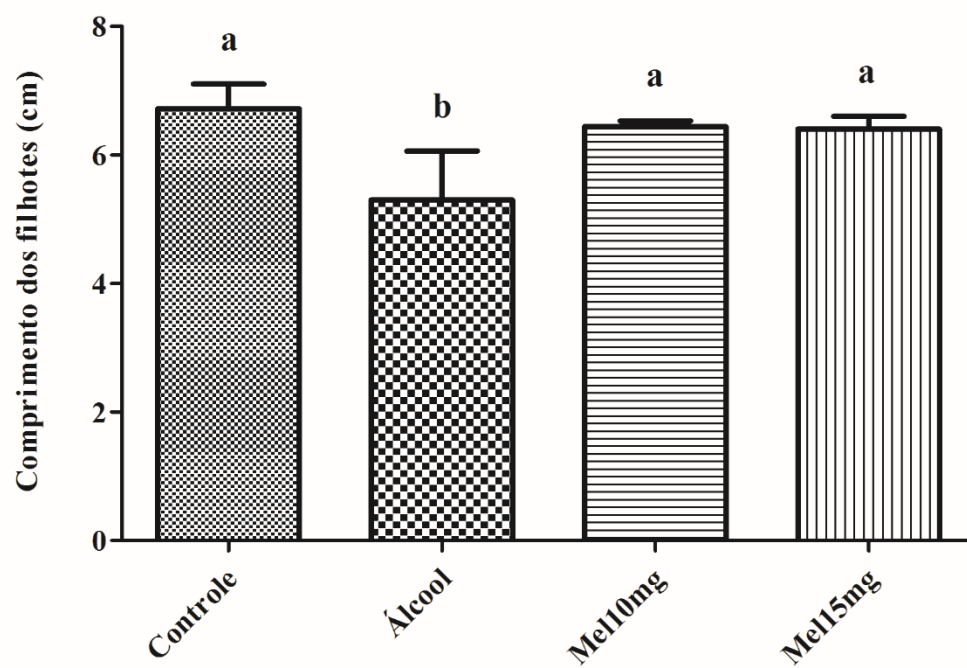


Figura 2: Comprimento dos filhotes dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

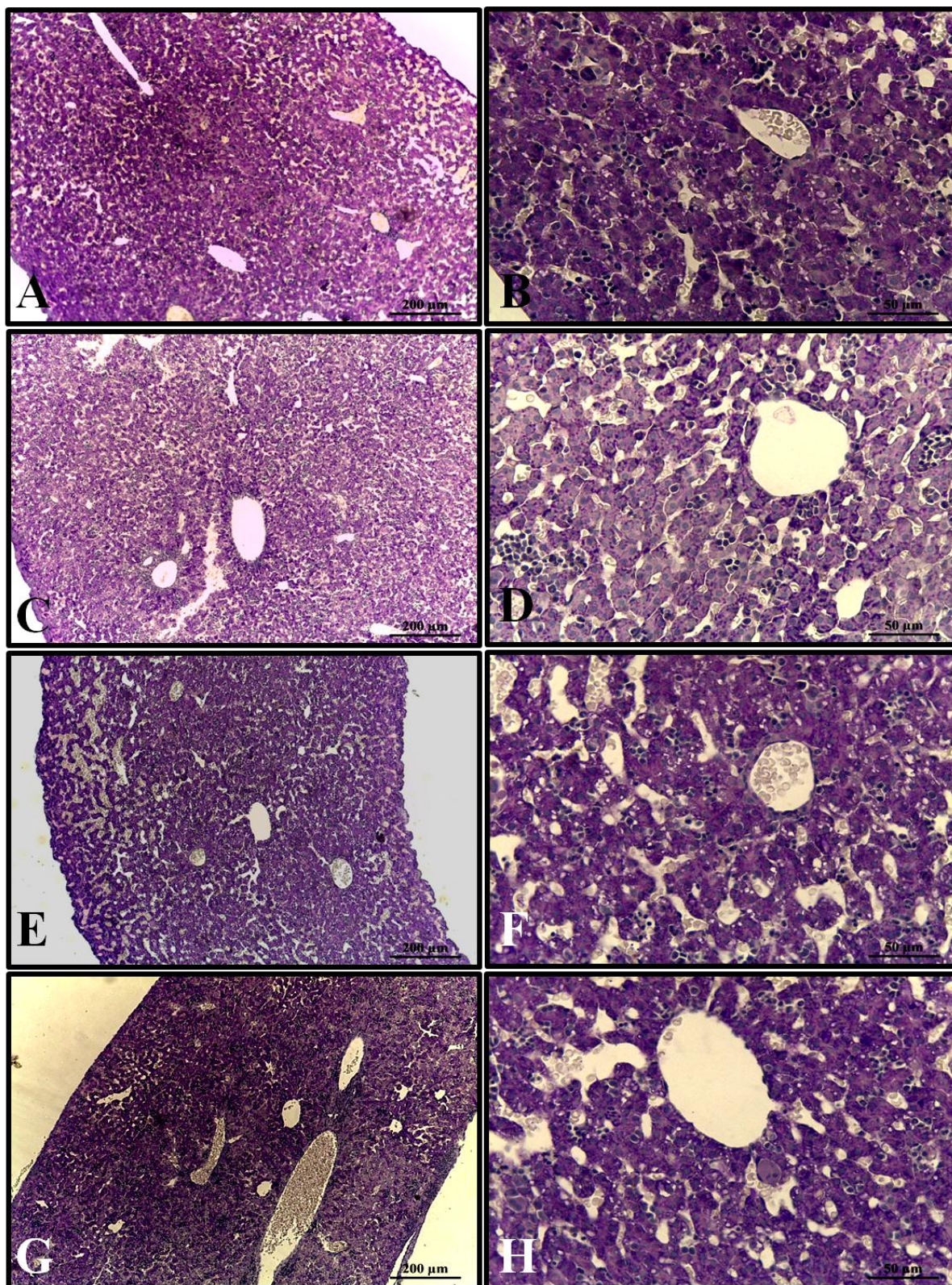


Figura 3: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais evidenciando o glicogênio hepático corado pelo Ácido Periódico de Schiff. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.

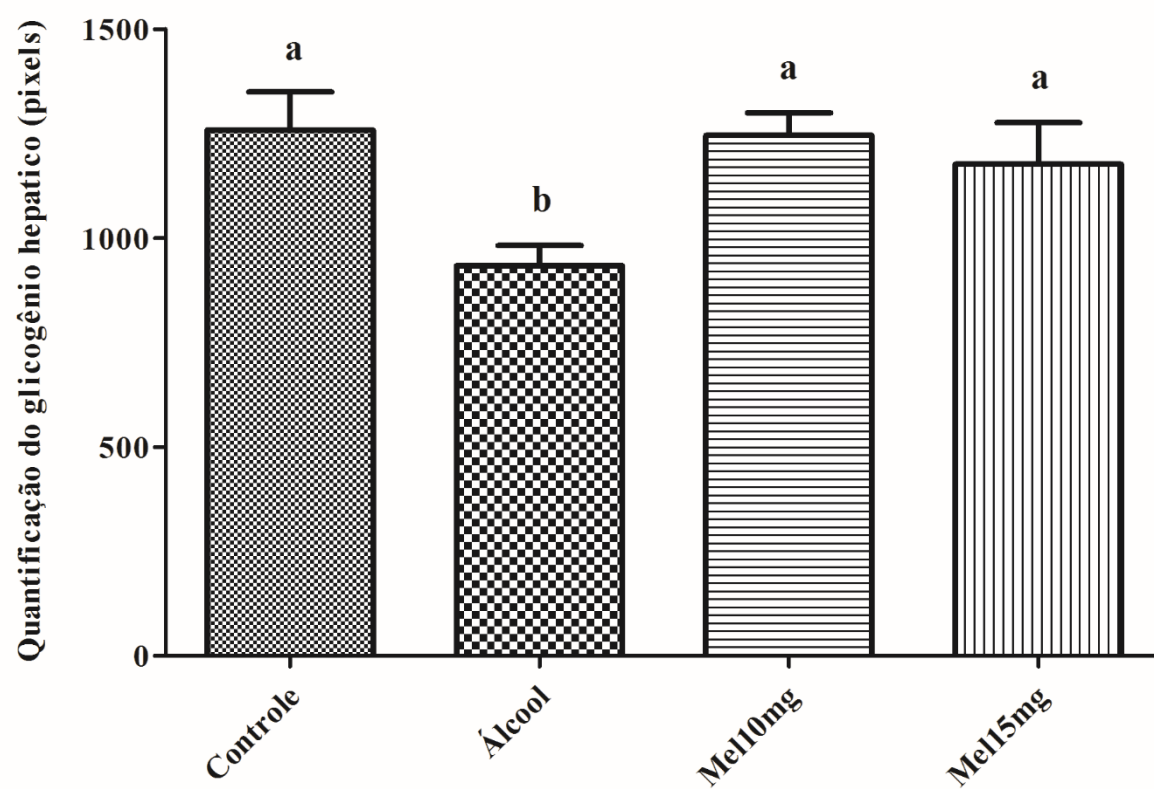


Figura 4: Quantificação de glicogênio hepático. Coloração Ácido Periódico de Schiff. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

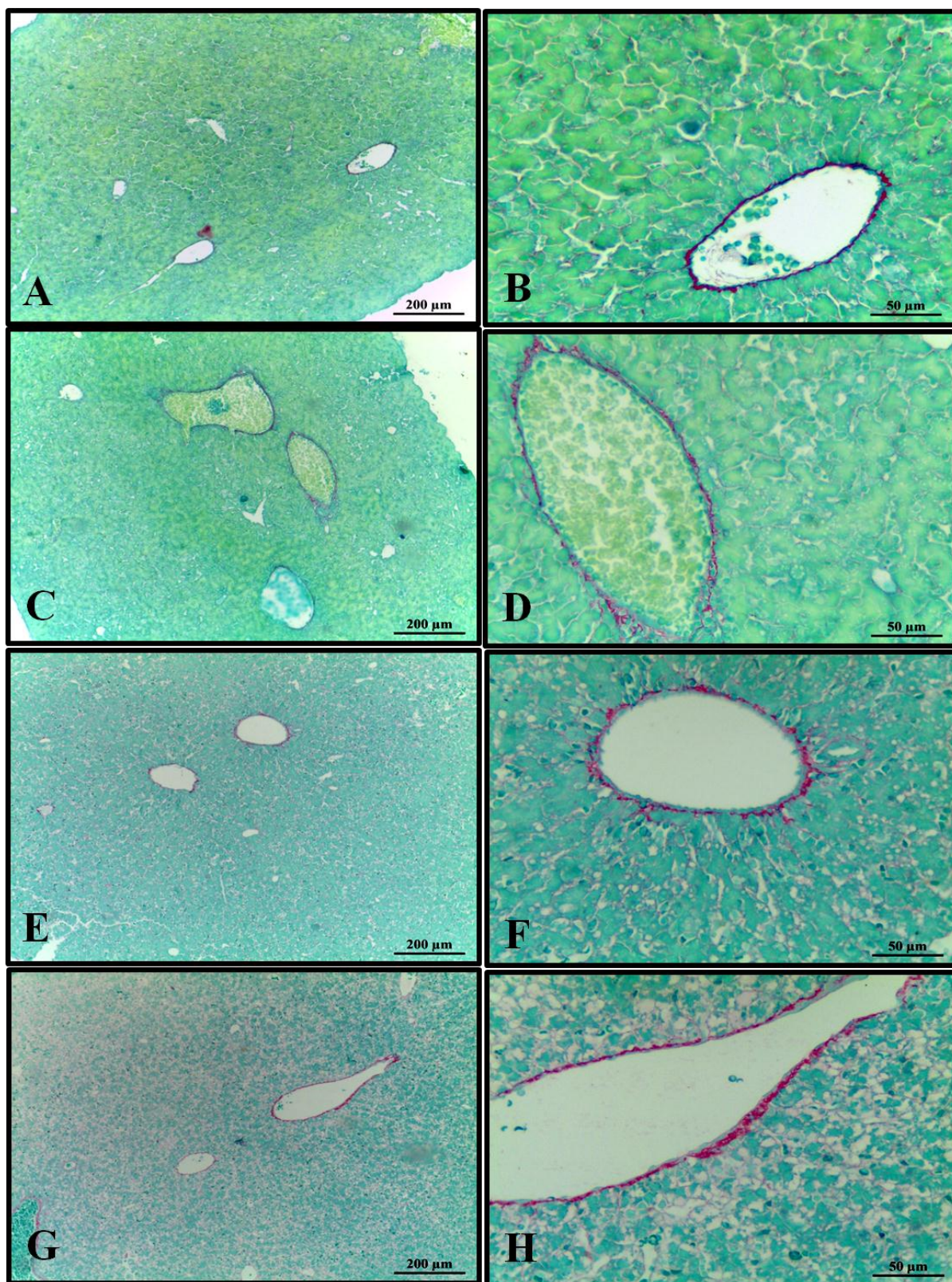


Figura 5: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais mostrando a deposição de colágeno corada pelo Picrosirius Red. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.

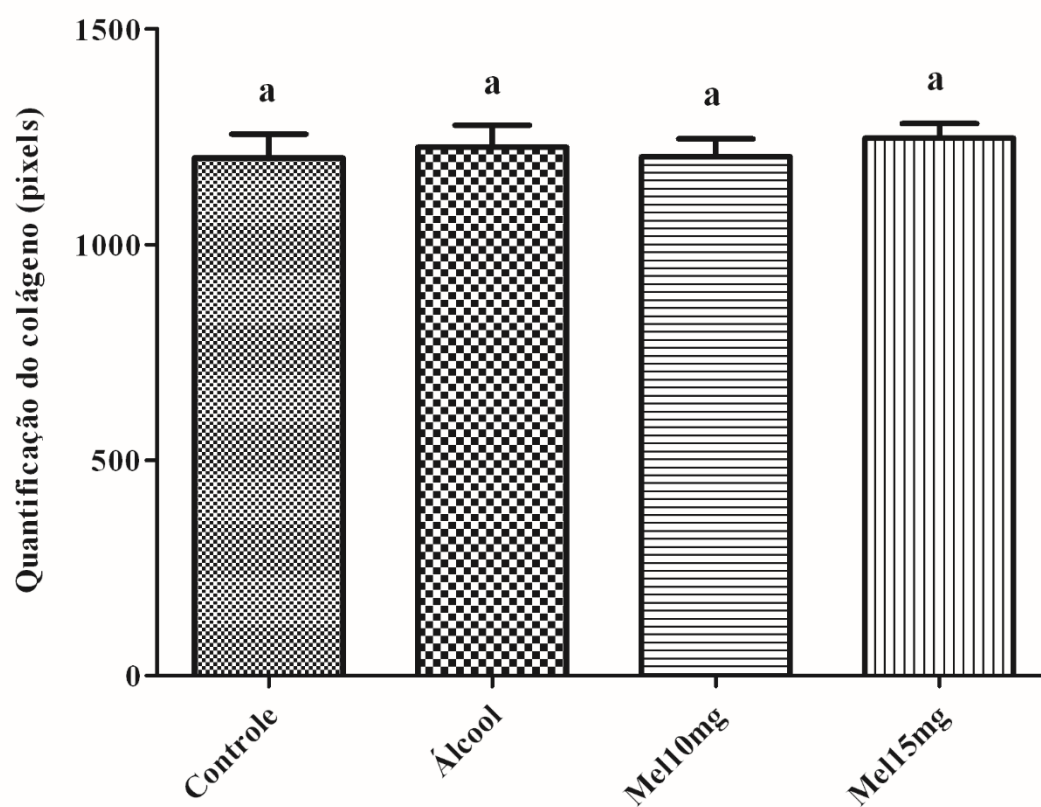


Figura 6: Quantificação do colágeno. Coloração Picrosirius Red. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

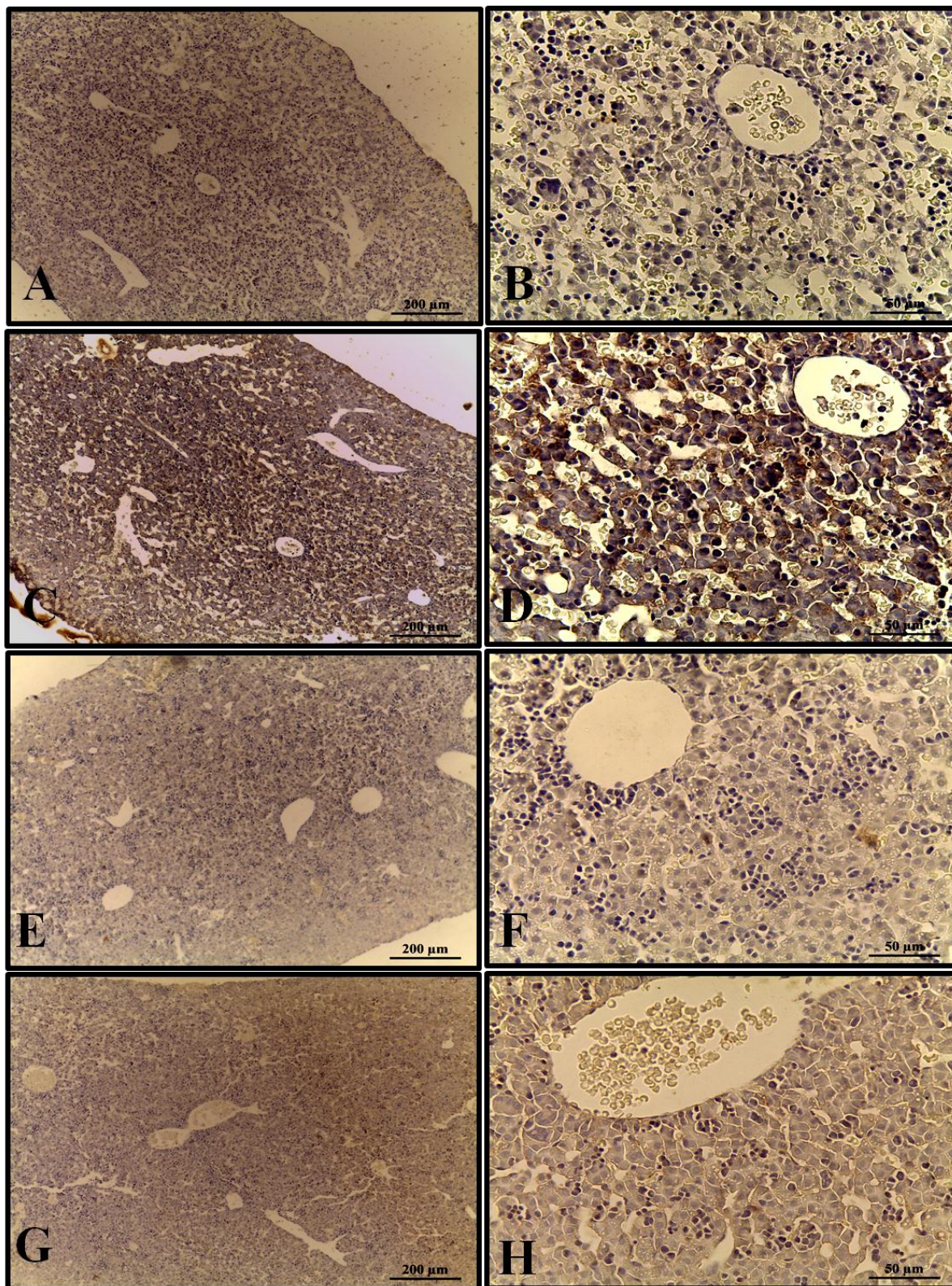


Figura 7: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. Imunohistoquímica para IL-6. A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.

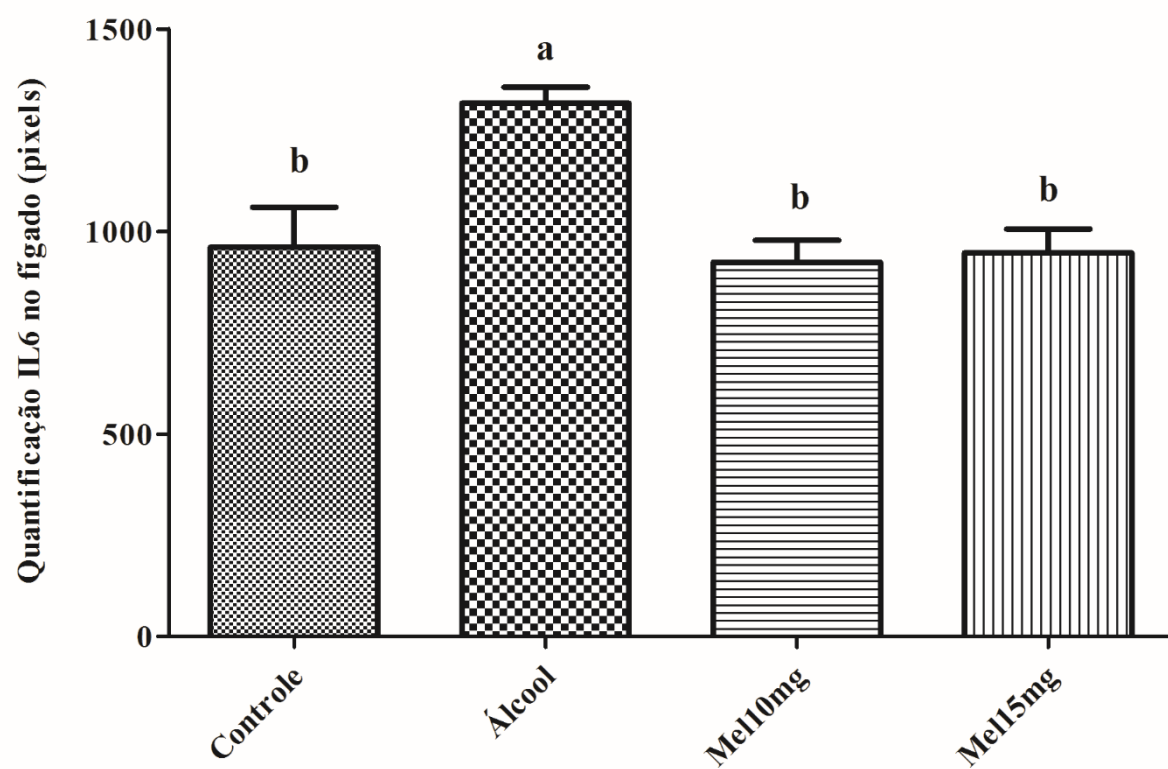


Figura 8: Quantificação de IL-6 no fígado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

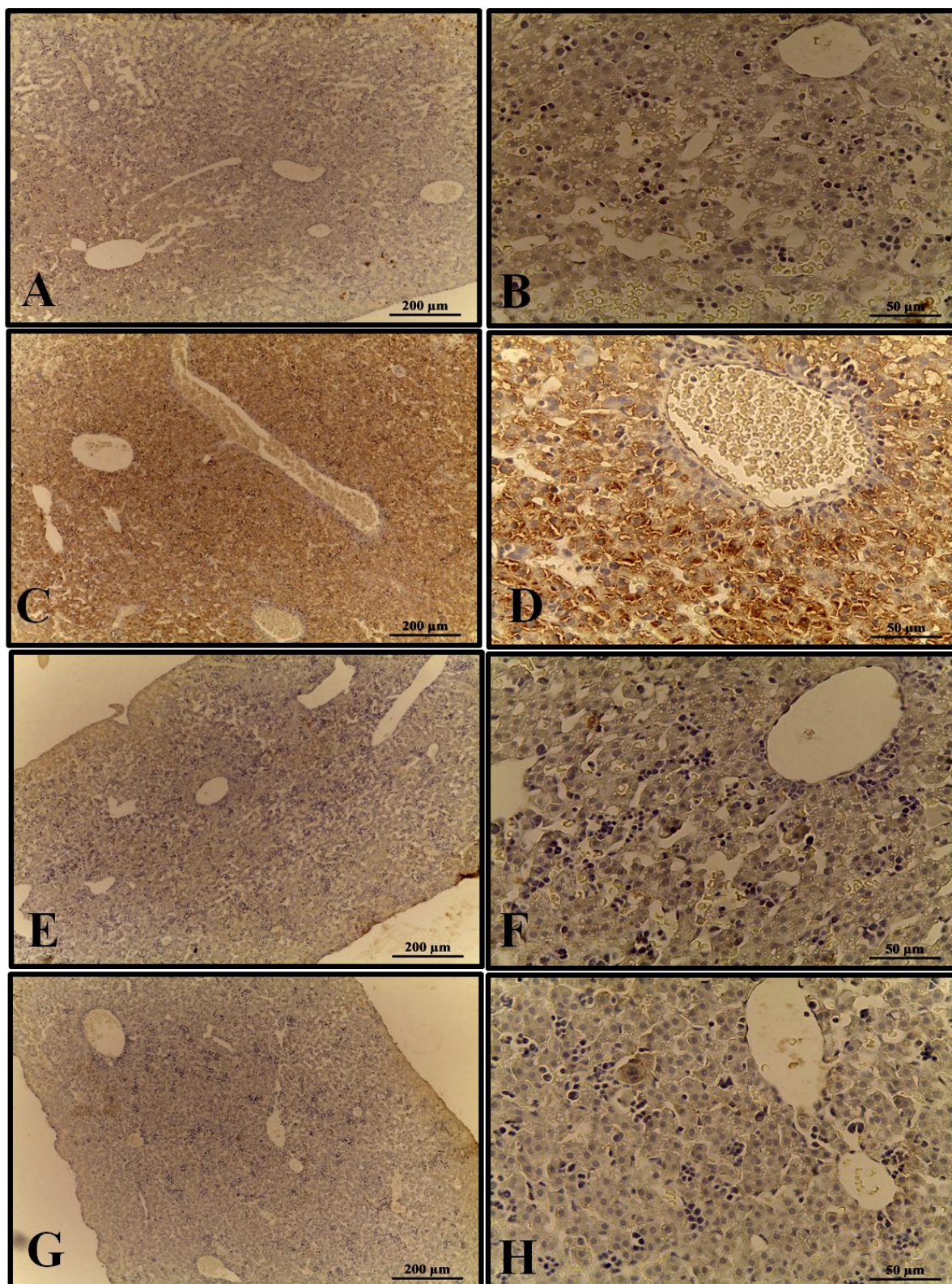


Figura 9: Fotomicrografias do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. Imunohistoquímica para TNF- α . A-B: Controle, C-D: Álcool, E-F: Álcool + Melatonina 10 mg e G-H: Álcool + Melatonina 15 mg.

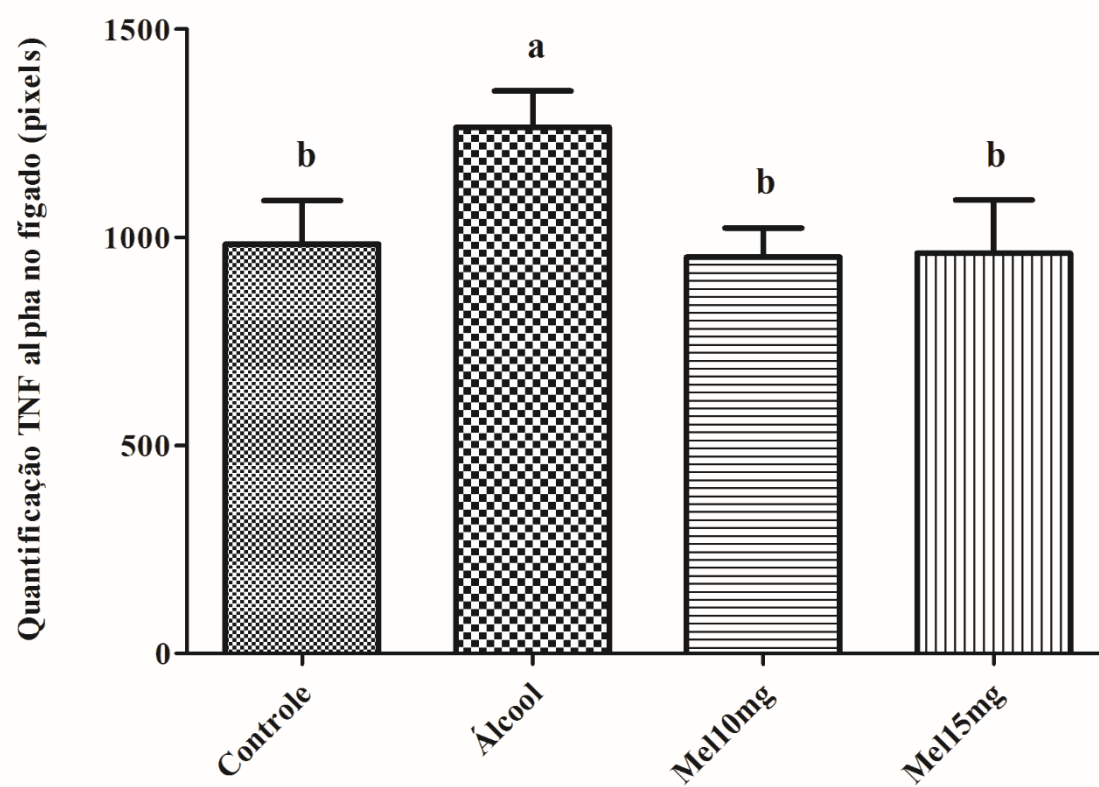


Figura 10: Quantificação de TNF- α no fígado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

ANEXOS

Successfully received: submission PROTECTIVE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN IN RATS AND THEIR OFFSPRING ON THE GENOTOXIC RESPONSE INDUCED BY THE CHRONIC CONSUMPTION OF ALCOHOL DURING PREGNANCY for Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental...

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis <EviseSupport@elsevier.com>

ter 19/12/2017 09:15

Para:ilkadayane@hotmail.com <ilkadayane@hotmail.com>;

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: MUTGEN_2017_289

Title: PROTECTIVE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN IN RATS AND THEIR OFFSPRING ON THE GENOTOXIC RESPONSE INDUCED BY THE CHRONIC CONSUMPTION OF ALCOHOL DURING PREGNANCY

Journal: Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Mrs. Duarte de Sousa Coelho,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MUTGEN and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.



MUTATION RESEARCH - GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS

A section of Mutation Research

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 1383-5718

DESCRIPTION

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Environmental Scientists, Occupational Health Researchers, Mutageneticists, Toxicologists

IMPACT FACTOR

2016: 2.133 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Chemical Abstracts
EMBiology
BIOSIS
Current Contents/Life Sciences
EMBASE
MEDLINE®
PASCAL M
Reference Update
Scopus

EDITORIAL BOARD

Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

EDITORS:

P.D. Josephy, Dept. of Molecular & Cellular Biology, College of Biological Science, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G 2W1, Canada, Fax: +1 519 837 1802

S. Knasmueller, Inst. of Cancer Research; Environmental Toxicology Group; Medical University Vienna, Inner Medicine I, Borschkegasse 8a, A-1090, Vienna, Austria

FOUNDING EDITOR:

F.H. Sobels

EDITORIAL BOARD

D. Averbek, Orsay Cedex, France

C. Bolognesi, Genoa, Italy

S. Burgaz, Ankara, Turkey

J. Cao, Chongqing, China

W.N. Choy, Lafayette, New Jersey, USA

A.R. Collins, Oslo, Norway

J. da Silva, Canoas, Brazil

A.K. Dhawan, Ahmedabad, Gujarat, India

S.H. Doak, Swansea, Wales, UK

Y.E. Dubrova, Leicester, UK

M. Dusinska, Kjeller, Norway

D.A. Eastmond, Riverside, California, USA

P.A. Escobar, West Point, Pennsylvania, USA

C.S. Farabaugh, Skokie, Illinois, USA

S.C. Garcia, Porto Alegre, Brazil

K.P. Glover, Newark, Delaware, USA

S. Halappanavar, Ottawa, Ontario, Canada

S. Hamada, Kamisu-shi, Ibaraki-ken, Japan

M.P. Hande, Singapore

A. Hartmann, Basel, Switzerland

J. He, Hangzhou, China

C.A. Hobbs, Research Triangle Park, North Carolina, USA

Y. Ibuki, Suruga-ku, Shizuoka-Shi, Japan

M. Isidori, Caserta, Italy

G. Jenkins, Swansea, Wales, UK

A.N. Jha, Plymouth, UK

B. Kaina, Mainz, Germany

O. Kovalchuk, Lethbridge, Alberta, Canada

M.G. Manjanatha, Jefferson, Arkansas, USA

M. Mišák, Vienna, Austria

M. Moretti, Perugia, Italy

T. Morita, Tokyo, Japan

K. Mortelmans, Menlo Park, California, USA

A. Noda, Hiroshima, Japan

T. Nohmi, Minato-ku, Tokyo, Japan
S. Oikawa, Mie, Japan
A.M. Richard, Research Triangle Park, North Carolina, USA
E. Rojas del Castillo, Ciudad de México, Mexico
J. Rueff, Lisbon, Portugal
S.L. Smith-Roe, Research Triangle Park, North Carolina, USA
H. Stopper, Würzburg, Germany
T. Takamura-Enya, Kanagawa, Japan
V. Thybaud, Vitry sur Seine Cedex, France
J. Topinka, Prague, Czech Republic
Y. Totsuka, Tokyo, Japan
M. Valverde, Ciudad de México, Mexico
M.Z. Vasquez, Morrisville, North Carolina, USA
Vijayalaxmi, San Antonio, Texas, USA
K.L. Witt, Research Triangle Park, North Carolina, USA
L.J. Wu, Hefei, Anhui, China
B. Žegura, Ljubljana, Slovenia

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

Current Topics in Genotoxicity Testing

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Any submissions that report the results of studies on extracts or complex mixtures (e.g., solvent extracts of herbal preparations; soil, air, or water samples) will receive preliminary review by an Editor. Unless such manuscripts offer significant new insight, such as the chemical identification of previously unknown mutagens or anti-mutagens, they will be returned to the authors without being sent for further review. For further clarification of this journal policy please refer to the [Editorial](#) published in *Mutation Research* 391 (1997) 1.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports the results of molecular epidemiology studies.

(i) As with any studies involving human subjects, approval by an appropriately constituted ethics review board and informed consent by participants are required.

(ii) Authors are advised to collaborate with qualified epidemiologists with respect to study design and interpretation.

(iii) In studies of the potential genotoxic effects of exposure to environmental agents, it is strongly recommended that quantitative evidence of exposure (such as analysis of personal monitoring devices or measurement of urinary biomarkers, for example) be obtained.

Manuscripts which do not conform to these requirements will be returned to the authors without being sent for further review.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

A Chinese version of the submission instructions for MUTGEN can be found [here](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3400**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries:

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: <http://www.who.int/hinari/en/>

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see

also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if

essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-muta>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be

applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. [More information](#).

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web and in print, or to be reproduced in color on the Web and in black-and-white in print. There are no color charges for Web and/or print reproduction
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0278-6915

DESCRIPTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, that publishes original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals and humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived** products, and **nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. **Studies should address at least one of the following:** Adverse physiological/biochemical, or pathological changes induced by **specific defined** substances New techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability

Authors must **clearly and briefly identify what novel toxic effect (s) or toxic mechanism (s)** of the chemical are being reported and what their **significance** is in the abstract. Furthermore, sufficient doses should be included in order to provide information on NOAEL/LOAEL values.

Manuscripts describing research involving the following areas will not be considered: materials/substances of only local interest materials/substances for which the chemical composition is not clearly defined only pharmacological properties, or potentially beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems chemical analyses of toxins in foods without addressing the toxic implication to humans [risk assessment should be included] unrealistic human doses, inappropriate route of exposure, or *in vitro* experiments that do not reflect serum levels in humans

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the manuscript is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Co-authors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers. All authors must declare any potential conflict of interest and all financial support.

Benefits to authors

We provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see the [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Food scientists, toxicologists, chemists and researchers working in the pharmaceutical industry.

IMPACT FACTOR

2016: 3.778 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
Analytical Abstracts
Aqualine Abstracts
BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Chemical Hazards in Industry
Current Contents/BIOMED Database
Current Contents/Science Citation Index
Current Contents/SciSearch Database
EMBASE
Health and Safety Science Abstracts
MEDLINE®
International Packaging Abstracts
Research Alert
Toxicology Abstracts
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

José L. Domingo, Lab.Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Catalonia, Spain

Co-Editors

Michael Aschner, Dept. of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York, NY 10461, USA

Bryan Delaney, Research Fellow – Toxicology, DuPont Pioneer, Global Industry Affairs and Regulatory, 7100 NW 62nd Avenue, Johnston, Iowa, 50131, USA

Siegfried Knasmüller, Inst. of Cancer Research, Environmental Toxicology Group, Medical University Vienna, Inner Medicine I, Borschkegasse 8a, A-1090, Vienna, Austria

Chada Reddy, Dept. of Biomedical Sciences, University of Missouri, E102 Veterinary Medical Building, 1600 Rollins, Columbia, Missouri, 65211, USA

RIFM Guest Editor

Aristides Tsatsakis, Dept. of Forensic Sciences and Toxicology, University of Crete, 71409, Heraklion, Greece

Associate Editors

Silvia Berlanga de Moraes Barros, School of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-000 São Paulo, Brazil

Qasim Chaudhry, DEFRA Central Science Laboratory, The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK

Roger Clemens, University of Southern California School of Pharmacy, Los Angeles, California, USA

Mark Feeley, Bureau of Chemical Safety, Chemical Hazard Assessment Division, Health Canada, Tunney's Pasture, Ottawa, K1A 0L2, Ontario, Canada

Swaran Jeet Singh Flora, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, Shree Bhawani Paper Mill Road - ITI compound, 229010, Raebareli, India

Guillermína Font, Fac. of Pharmacy, Dept. of Preventive Medicine, Universitat de València, Avda Vicent Andres Estelles s/n, Burjassot, , 46100, Valencia, Spain

Milen Georgiev, Inst. of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, 139 Ruski Boulevard, 4000, Plovdiv, Bulgaria

Salmaan Inayat-Hussain, Group Health, Safety and Environment Division, Head, Global Toxicology, Petrolam Nasional Berhad, Level 45, Tower 1, PETRONAS Twin Towers, KLCC, 50088, Kuala Lumpur, Malaysia

Demetrios Kouretas, Dept. of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

Claire L. Kruger, Director of Health Sciences, Spherix Incorporated, 6430 Rockledge Dr., Westmoreland Bldg. #503, Bethesda, MD 20817, USA

Byung-Mu Lee, College of Pharmacy, Div. of Toxicology, Sungkyunkwan University (SKKU), Cheoncheon-dong 300, 440-746, Suwon, Gyeonggi-do, The Republic of Korea

Palma Ann Marone, Toxicology and Pathology Associates, LLC, Pharmacology and Toxicology, Virginia Commonwealth University, School of Medicine

Yeonhwa Park, Dept. of Food Science, University of Massachusetts at Amherst, Amherst, Massachusetts, MA, USA

Ivonne M.C.M. Rietjens, Sectie Toxicologie, Agrotechnologie en voedingswetenschappen (AFSG), Wageningen Universiteit, Postbus 8000, Bodenummer 92, 6700 EA, Wageningen, Netherlands

Saura Sahu, Office of Applied Research and Safety Assessment, FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 8301 Muirkirk Road, Laurel, Maryland, 20708, USA

Dieter Schrenk, Dept. of Food Chemistry and Environmental Toxicology, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Str. 52, D-67663, Kaiserslautern, Germany

Emeritus Editors

Alan R. Boobis, Experimental Medicine and Toxicology, Div. of Investigative Science, Imperial College London, Hammersmith Campus, Du Cane Road, W12 0NN, London, UK

Joseph F. Borzelleca, President, Toxicology & Pharmacology, Inc., 8718 September Drive, Richmond, Virginia, VA 23229-7319, USA

A. Wallace Hayes, Dept. of Environmental Health, Harvard T.H. Chan School of Public Health, 300 Longwood Ave., Boston, Massachusetts, MA 02115-5747, USA

Hans Verhagen, Centre for Nutrition and Health (PB84), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, Netherlands

Founding Editor

The late Leon Golberg

International Editorial Board

M.A. Abdelmegeed, Bethesda, Maryland, USA

N. Arora, New Delhi, India

S.M. Barlow

A. Bartholomaeus, Canberra, Australia

N. Basaran, Sıhhiye, Ankara, Turkey

M. Battino, Ancona, Italy

A. Braeuning, Berlin, Germany

F. Carvalho, Porto, Portugal

M. Clift, Swansea, UK

T.F.X. Collins, Chevy Chase, Maryland, USA

A. Covaci, Wilrijk, Belgium

D. Dandekar, Stilwell, Kansas, USA

M. Das, Lucknow, India

B. Delclos, Jefferson, Arkansas, USA

D. Doerge, Jefferson, Arkansas, USA

M. Dusinska, Kjeller, Norway

M. Ferrante, Catania, Italy

I.C.F.R Ferreira, Bragança, Portugal

M. Filipic, Ljubljana, Slovenia

K. S. Golokhvast, Vladivostok, Russian Federation

K. Kuca, Hradec Kralove, Czech Republic

P. Magee, Coleraine Co., Londonderry, Northern Ireland, UK
H.I. Maibach, San Francisco, California, USA
A. Mantovani, Rome, Italy
A.I. Nikiforov, Charlottesville, Virginia, USA
A. Tsakalof, Larissa, Greece
P. White, Ottawa, Ontario, Canada
J. Xiao, Taipa, Macau, China

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, aspires to publish original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived** products, and **nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following: Physiological, biochemical, or pathological changes induced by specific substances Techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability

Manuscripts concerning materials/substances of only local interest for which the chemical composition of the material/substance is **not clearly defined** will **not** be considered. Manuscripts addressing only pharmacological properties, or only potentially beneficial effects using in *in vitro* or *in vivo* systems, are not within the scope of the journal.

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the paper is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Papers pending in other journals will not be considered. Co-authors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers.

Types of paper

The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Short Communications will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. All Letters to the Editor should be submitted to the Editor in Chief, Jose L. Domingo through the online submission system of the Journal.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address

- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of interest

Food and Chemical Toxicology follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects (i.e. animals and human subjects), and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are required to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Please amend your research highlights so that they consist of 3 to 5 brief bullet points which convey the core findings of your work. Please ensure EACH bullet point does NOT exceed 125 characters (including spaces). An example is given below:

RESEARCH HIGHLIGHTS EXAMPLE:

* Research highlights are a mandatory field of a submitted paper & therefore should not exceed 85 characters including spaces.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to by their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-and-chemical-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>