



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

“Estudo morfométrico das placentas de ratas submetidas ao consumo crônico de álcool durante a gestação, tratadas ou não com melatonina exógena.”

BRUNO JOSÉ DO NASCIMENTO

RECIFE
2021

BRUNO JOSÉ DO NASCIMENTO

“Estudo morfométrico das placentas de ratas submetidas ao consumo crônico de álcool durante a gestação, tratadas ou não com melatonina exógena.”

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

RECIFE
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244e Nascimento, Bruno José do
Estudo morfométrico das placentas de ratas submetidas ao consumo crônico de álcool durante a gestação, tratadas ou não com melatonina exógena / Bruno José do Nascimento. - 2021.
42 f. : il.
- Orientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Coorientadora: Lais Caroline da Silva Santos.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. alcoolismo . 2. antioxidante. 3. estresse oxidativo. 4. má placentação. I. Teixeira, Alvaro Aguiar Coelho, orient. II. Santos, Lais Caroline da Silva, coorient. III. Título

BRUNO JOSÉ DO NASCIMENTO

“Estudo morfométrico das placentas de ratas submetidas ao consumo crônico de álcool durante a gestação, tratadas ou não com melatonina exógena.”

Comissão Avaliadora:

Profº Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE
Orientador

Profª Drª Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE
Titular

PNPD Ismaela Maria Ferreira de Melo - UFRPE
Titular

Drª Rebeka da Costa Alves - UFRPE
Suplente

AGRADECIMENTOS

No fim, nossas conquistas são resultados dos nossos esforços, mas junto a isto, a presença de pessoas especiais em nossa caminhada é de extrema importância para podermos alcançar o êxito. Por isso acredito que a caminhada é mais importante que a linha de chegada.

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus por sempre estar presente na minha vida, me sustentando em todos os momentos e sempre me abençoando. Além de me presentear com uma mãe maravilhosa. Obrigado a minha mãe por sempre me apoiar nas minhas decisões, por lutar de todas as formas para me criar e me educar da melhor forma possível. Se estou concluindo uma graduação, a senhora é a principal responsável por isto, pois, a senhora é a minha principal fonte de inspiração, sempre me ensinando a correr atrás dos meus objetivos e agir da forma correta. Obrigado também ao meu pai e aos meus familiares por estarem sempre torcendo por mim.

Muito obrigado ao professores Álvaro Aguiar e Valéria Wanderley por toda paciência comigo, orientações, ensinamentos e por acreditarem em mim. Se um dia eu for metade dos professores que vocês são, ficarei extremamente feliz, pois vocês são uma inspiração para mim.

Quero agradecer também à minha coorientadora Laís Caroline por toda a paciência e disponibilidade para fazer as correções necessárias nesta monografia, além de sempre me dar dicas e me ajudar nos procedimentos no laboratório.

Obrigado a Ismaela Melo e Rebeka alves por aceitarem estar na minha banca e por todos os ensinamentos no laboratório. Quase tudo que aprendi durante estes anos no laboratório, foram vocês que me ensinaram. Sou eternamente grato por todos conselhos, ensinamentos e paciência.

Muito obrigado a meus companheiros do LABEMOVI, Ana Cláudia, Anthony, Marina, Paloma e Valeska, Erique Ricardo e Vanessa pelos momentos de ajuda, conversas e descontração que foram fundamentais durante estes anos.

Obrigado aos meus companheiros de turma que durante esses quase 5 anos de graduação estão lutando comigo, em especial aos meus amigos Alexandre, Breno, Isabela, Maxuel, Natália, Patrícia, Paulo, Rodrigo e Yasmim

por estarem presentes na minha vida, me apoiando e torcendo por mim, além de tornarem os momentos difíceis mais leves.

Obrigado aos meus amigos Anderson, Arthur, Djair, Davi, David, Dayana, Erandir, Gabriel Luiz, Gabriel souza, Geovana, Guilherme, Juliana, Kenia, Marcella, Mayara, Renata, Thales e Thiago por sempre me apoiarem e acreditarem em mim mais do que eu mesmo, além de entenderem que as vezes tinha que me ausentar para dar conta das demandas da universidade.

Obrigado a minha dupla de monitores Janaína e Vinícius pelos momentos de parceria e sorrisos durante este tempo que estivemos juntos.

Obrigado a Universidade Federal Rural de Pernambuco (ruralinda) pelo acolhimento e por se tornar minha segunda casa.

Obrigado a todos os meus professores, que contribuíram enormemente para a minha formação profissional e pessoal, em especial a Flávia lins, Flávia Conceição, Mariza Brandão, Nicola Schiel, Paulo Eleutério, Ygor Jacques, Geziel Campos e Douglas Marques. Posso garantir que vou ter grandes exemplos a seguir.

Muito obrigado a coordenadora do meu curso, Elisângela Bezerra, pela disponibilidade e paciência em todos momentos que a procurei para tirar minhas dúvidas.

Gratidão aos bioteristas André, Felipe e Renata.

Posso falar que sou uma pessoa extremamente sortuda por ter todos vocês na minha vida. Saibam que esta monografia teve a contribuição de cada um de vocês, seja direta ou indiretamente. Muito obrigado por tudo!

Sumário

RESUMO.....	8
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
1.1 Alcoolismo	9
1.2 Alcoolismo e Gravidez	10
1.3 Álcool e seus efeitos na placenta	12
1.4 Melatonina	14
1.5 Melatonina e seus efeitos benéficos em placentas expostas ao álcool ..	16
ABSTRACT.....	18
2. INTRODUÇÃO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Obtenção dos Animais.....	22
3.2 Acasalamento dos Animais.....	22
3.3 Administração do Etanol	23
3.4 Tratamento com Melatonina	23
3.5 Análise histopatológica da placenta.....	23
3.6 Análise Morfométrica da placenta.....	24
3.7 Pesagem dos fetos	24
3.8 Análise Estatística	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentuais dos elementos constituintes das zonas do labirinto (ZL) e juncional (ZJ) das placentas das fêmeas dos grupos experimentais.....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da melatonina..... 15

Figura 2: Histologia das placentas das fêmeas do grupo controle. A - Notar disco placentário (P) bem desenvolvido; B - Zona do labirinto contendo vasos maternos (setas curtas), vasos fetais (setas longas) e trofoblasto sincicial (ponta de setas); C - Zona juncional observar trofospongios (T) e células trofoblasticas gigantes (CG). Coloração H.E..... 26

Figura 3: Histologia das placentas das fêmeas do grupo álcool. A - Notar disco placentário (P) pouco desenvolvido; B - Zona do labirinto desorganizada com vasos maternos (setas curtas) e predominância trofoblastos sinciciais (ponta de setas); C - Zona juncional observar trofospongios (T) e células de glicogênio (Cg). Coloração H.E.27

Figura 4: Histologia das placentas das fêmeas do grupo álcool + mel. A - Notar disco placentário (P) bem desenvolvido; B - Zona do labirinto contendo vasos maternos (setas curtas), vasos fetais (setas longas) e trofoblasto sincicial (ponta de setas); C - Zona juncional observar trofospongios (T) e células trofoblasticas gigantes (CG). Coloração H.E.....28

Figura 5: Peso dos fetos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$). ... 29

Figura 6: Peso das placentas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$). ... 29

RESUMO

A taxa global de consumo de álcool durante a gravidez é elevada, correspondendo a 9,8%. A exposição ao etanol durante a gestação prejudica a placentação, restringindo a transformação vascular e reduzindo as células trofoblásticas invasivas. A melatonina é considerada importante para a manutenção da função da placenta e crescimento fetal. Com isto, este trabalho teve como objetivo avaliar se a melatonina exógena administrada durante a gestação pôde prevenir os efeitos deletérios produzidos pelo álcool, nas placentas e fetos de ratas. Utilizou-se 30 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, virgens, com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 250g \pm 30g, procedentes do Biotério Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram formados os seguintes grupos experimentais com 10 animais cada: Grupo I: 5 ratas prenhes que não receberam álcool e eutanasiadas no 20º dia de gestação e 5 ratas que não foram eutanasiadas para análise dos filhotes (controle); Grupo II – 5 ratas prenhes submetidas ao consumo crônico de álcool, eutanasiadas no 20º dia de gestação e 5 ratas que não foram eutanasiadas para análise dos filhotes (álcool) e Grupo III – 5 ratas prenhes submetidas ao consumo crônico de álcool e tratadas simultaneamente com melatonina, eutanasiadas no 20º dia de gestação e 5 ratas que não foram eutanasiadas para análise dos filhotes (álcool + mel). A análise histopatológica e morfométrica do grupo III não demonstraram alterações histológicas significativas, assemelhando-se ao grupo I, caracterizando-se pela observação da região da decídua basal e a região do disco placentário bem desenvolvido, com a zona do labirinto, região mais externa e mais espessa, caracterizada pela presença de vasos maternos e fetais, além de trofoblastos sinciciais. Na zona juncional, também chamada de espongioblastos ou trofospongio observou-se trofoblastos indiferenciados e células trofoblásticas gigantes (binucleadas). Com relação ao peso dos fetos e da placenta, verificou-se redução significativa no grupo que recebeu apenas álcool. Estas alterações não foram observadas no grupo III. Em conclusão, o presente trabalho apresenta o potencial de ação protetora da melatonina contra os danos na decídua, zona juncional e labirinto placentário de ratas gestantes alcoólicas. Deste modo, em casos de mulheres gestantes alcoólatras, a administração da melatonina durante a gestação pode servir como medida preventiva contra possíveis efeitos adversos na gestação e no feto.

Palavras chave: alcoolismo; antioxidante; estresse oxidativo; má placentação.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Alcoolismo

Segundo a *World Health Organization* (WHO) (2018), em 2016, a ingestão exagerada de álcool causou cerca de 3 milhões de mortes no mundo, correspondendo a 5,3% de todas as mortes. A mortalidade atribuída ao consumo deste xenobiótico é maior que a de doenças digestivas (4,5%), diabetes (2,8%), acidentes rodoviários (2,5%), tuberculose (2,3%), HIV/AIDS (1,8%), e hipertensão (1,6%). A ingestão de bebidas alcoólicas está relacionada ao aumento do risco de adquirir hepatite b e c, desenvolver carcinoma hepatocelular, gastrite crônica, pancreatite, danos no sistema nervoso e cardiovascular, lesões hepáticas como esteatose, hepatite alcoólica, cirrose e fibrose perivenular (GED, 2011; LE DARÉ et al., 2019). Além disso, o consumo de etanol (EtOH) interrompe o ciclo menstrual nas mulheres e diminui a fertilidade masculina, incluindo atrofia testicular, diminuição da libido e redução dos níveis de testosterona (LE DARÉ et al., 2019).

O álcool ingerido é absorvido principalmente pelo intestino delgado, e apenas 10% é absorvido pelo estômago (JUNG; NAMKOONG, 2014). Por se tratar de uma molécula pequena, sem carga e solúvel em água, o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), atravessa facilmente as membranas celulares, resultando em um equilíbrio entre as concentrações intra e extracelulares (NORBERG et al., 2003; VONGHIA et al., 2008), que corresponde a 50-60% do peso corporal nos homens e 45-55% nas mulheres. Deste modo, a distribuição do EtOH até os diferentes órgãos e tecidos depende principalmente do fluxo sanguíneo (ZELNER; KOREN, 2013). Segundo Ged (2011), apenas 2-10% de bebidas alcoólicas ingerido não é metabolizado e é excretado inalterado na urina, respiração e suor, sendo o restante oxidado principalmente no fígado, onde está presente a maior quantidade de enzimas capazes de metabolizá-lo.

O fígado é o principal órgão de metabolização do álcool, sendo capaz de metabolizar apenas uma certa quantidade por hora, independente da concentração ingerida (RUNDIO, 2013). O EtOH é metabolizado através de vias oxidativas e não oxidativas (GUPTA; GUPTA, 2016). A metabolização na via oxidativa se dá através de duas etapas, da seguinte forma: o EtOH pode ser convertido em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH), o

34 citocromo P450 2E1 (CYP2E1) do sistema de oxidação de etanol microsomal e
35 a catalase. Como o acetaldeído é um composto altamente reativo, ele é
36 convertido em acetato pelo aldeído desidrogenase (ALDH). Já a metabolização
37 do álcool na via não oxidativa ocorre através de pelo menos, dois caminhos
38 conhecidos. Um leva a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) e
39 o outro a fosfatidiletanol (LAPOSATA, 2003). No fígado estão presentes
40 predominantemente a álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, que são
41 as principais enzimas envolvidas na via de desintoxicação do etanol, onde,
42 oxidam álcoois em ácidos. Enquanto no cérebro o etanol é predominantemente
43 oxidado pela catalase e P450 2E1 (POHANKA, 2016).

44 O P450 2E1 e a catalase produzem acetaldeído a partir do etanol. Deste
45 modo, a enzima acetaldeído desidrogenase oxida o acetaldeído em acetato.
46 Essas reações culminam no aumento da atividade da cadeia respiratória e
47 consequentemente na produção de mais espécies reativas de oxigênio (ERO).
48 Com isto, o álcool pode levar a um desequilíbrio na concentração de ERO e
49 antioxidantes, resultando em dano oxidativo de lipídios, proteínas e DNA
50 (BROCARDI et al., 2011). O EtOH no organismo causa estresse oxidativo,
51 diminuindo os níveis de ATP e NAD⁺/NADP na célula e aumentando as
52 citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e aumento da ativação das
53 células de Kupffer (CEDERBAUM; LU; WU, 2009). Em estudos com roedores,
54 o etanol é conhecido por estimular a iniciação e a progressão de
55 carcinogênese, além de ser um dos agentes teratogênicos mais comuns
56 através do estresse oxidativo (BOSCO; DIAZ, 2012; DOGAN; ANUK, 2019).

57 O álcool não causa toxicidade apenas diretamente, mas também devido
58 aos seus metabólicos, incluindo entre estes as espécies reativas de oxigênio
59 (ERO), que são produzidas durante a sua biotransformação, tornando-se
60 prejudicial (BROCARDI et al., 2011). A metabolização do álcool pelo
61 citocromo P450 2E1 (CYP2E1) acarreta o aumento da produção de radicais
62 hidroxila (OH), consequentemente aumentando os níveis de peroxidação
63 lipídica (BUONOCORE; BRACCI, 2001).

64 **1.2 Alcoolismo e Gravidez**

65 A taxa global de consumo de álcool durante a gravidez é elevada,
66 correspondendo a 9,8% (POPOVA et al., 2017). O consumo materno durante a
67 gestação pode ocasionar direta e indiretamente o desenvolvimento das

68 desordens do espectro alcoólico fetal (DEAF) e a síndrome alcoólica fetal
69 (SAF) (BATHIA et al., 2019; MARIANIAN, 2020). As principais características
70 da SAF são deficiência de crescimento pré e pós natal, atraso no
71 desenvolvimento, baixa estatura, mal formações craniofaciais, microcefalia,
72 fenda palatina, anomalias articulares, defeitos do septo cardíaco e, vincos
73 palmares alterados (ORNOY; ERGAZ, 2010; BOSCO; DIAZ, 2012). De 10.000
74 pessoas na população global, 15 terão SAF, e pelo menos 10% das mulheres
75 grávidas continuam a expor seus bebês em gestação ao álcool. Além disso,
76 uma em cada 67 mulheres que consomem álcool na gestação terá um filho
77 com SAF, o que implica em cerca de 119.000 crianças nascidas com SAF no
78 mundo a cada ano (POPOVA et al., 2017).

79 Em gestantes, o álcool causa adaptações endoteliais uterinas alteradas,
80 relaxamento de vaso dependente de agonista e remodelação da artéria espiral
81 (NAIK et al., 2016), além de chegar até o leite materno, alcançando
82 concentrações semelhantes aos do soro materno (ORNOY; ERGAZ, 2010). O
83 EtOH atravessa facilmente as barreiras placentárias e sanguíneas, o que leva a
84 concentrações de EtOH no sangue fetal semelhantes às encontradas no
85 sangue materno. Além disto, o acetaldeído resultante do metabolismo do álcool
86 também consegue ultrapassar a placenta e a barreira hematoencefálica,
87 porém, sendo encontrado em concentrações menores nos níveis sanguíneos
88 fetais do que os vistos na mãe (BATHIA et al., 2019).

89 Evidências apontam que a exposição embrionária e fetal ao etanol
90 resulta em anomalias morfológicas, neurológicas, comportamentais, além de
91 baixo peso ao nascer, retardo do crescimento intrauterino, redução do QI dos
92 bebês e aumento na taxa de anomalias congênitas (INCE et al., 2019; ORNOY;
93 ERGAZ, 2010). Mesmo em quantidades moderadas, o consumo de álcool está
94 associado ao aumento de risco de abortos espontâneos, principalmente nos
95 primeiros três meses de gestação (KESMODEL, 2002). Estas alterações
96 congênitas têm maior probabilidade de se originar no período organogênico
97 (COLL et al., 2017).

98 A capacidade metabólica fetal é bastante limitada, sendo a transferência
99 do etanol do compartimento fetal para a circulação materna a principal via para
100 reduzir a exposição fetal. Esta eliminação do álcool do compartimento fetal é
101 feita através da reabsorção de volta para a circulação fetal, sendo transferido

102 para a placenta e em seguida para a circulação materna (HELLER; BURD,
103 2014). Estudos em ratas vem demonstrando que mães grávidas apresentam
104 maior depuração e menor concentração de álcool no sangue em relação as
105 não grávidas. O aumento do metabolismo do EtOH pode proteger o feto, pois a
106 exposição ao EtOH é reduzida, porém, pode ocorrer o aumento na formação do
107 metabólito acetaldeído, culminando no aumento da toxicidade fetal se mais
108 acetaldeído atravessar a placenta (BHATIA et al., 2019).

109 Nesse sentido vem sendo proposto que as lesões fetais causadas pela
110 ingestão do álcool ocorram por pelo menos dois mecanismos: a) diretamente
111 por fetotoxicidade do EtOH e/ou acetaldeído; b) indiretamente por lesão
112 placentária induzida pelo EtOH e desnutrição fetal seletiva (BOSCO; DIAZ,
113 2012). Estudos indicam o estresse oxidativo como outro mecanismo que pode
114 contribuir para o efeito prejudicial do álcool no feto. Sendo caracterizado pelo
115 excesso de pró-oxidantes em contrabalanço aos antioxidantes (MARIANIAN,
116 2020). Em seus estudos, Ince e colaboradores (2019), demonstraram que o
117 consumo de álcool durante a gravidez causou danos oxidativos nos tecidos
118 hepáticos e linfoides (timo, baço e nódulos linfáticos) de ratos recém nascidos.
119 Fetos de roedores e recém-nascidos quando expostos ao EtOH apresentam
120 diminuição do peso corporal combinada com diminuições paralelas no coração,
121 fígado e crescimento renal (HENDERSON et al., 1999). A capacidade do feto
122 metabolizar o álcool varia de acordo com período do seu desenvolvimento
123 embrionário. Estudos têm demonstrado que a capacidade do feto metabolizar o
124 EtOH é reduzida devido à baixa atividade do álcool desidrogenase (ADH)
125 hepática no primeiro trimestre (HINES; MCCARVER, 2002).

126 **1.3 Álcool e seus efeitos na placenta**

127 A placenta começa a ser formada no momento da implantação, sendo
128 responsável por estabelecer conexões funcionais críticas para o
129 desenvolvimento embrionário e mediar a passagem de nutrientes do sangue
130 materno para o sangue fetal (CROSS et al., 1994; BOWMAN; KENNEDY,
131 2014). A placentação é crucial para que ocorra a ligação entre mãe feto, assim,
132 possibilitando as trocas necessárias entre eles. Uma etapa importante para que
133 ocorra esta ligação é que os trofoblastos invasivos devem invadir as artérias
134 espirais maternas e, assim, romper e substituir as células endoteliais. Este
135 processo transforma pequenas artérias musculares em distendidas, flácidas, de

136 baixa resistência e com alto fluxo, permitindo as trocas entre mãe e feto através
137 da placenta (GUNDOGAN et al., 2015).

138 A placenta atua na troca de gases e hormônios, na entrega de
139 nutrientes, remoção de dióxido de carbono e resíduos metabólicos, e placentas
140 do tipo hemocorial e endoteliocorial realizam a entrega de anticorpos para o
141 feto, enquanto as sindesmocorial não realizam esta entrega. A placenta de
142 primatas e roedores é do tipo hemocorial, servindo de barreira parcial entre a
143 mãe e o feto, evitando que o sangue fetal se misture com o materno (BOSCO;
144 DIAZ, 2012; COOL et al., 2018; FEITOSA, 1999; BURTON et al., 2006). O
145 fornecimento de nutrientes pela placenta necessita da manutenção do seu
146 desenvolvimento morfológico, atividade metabólica e disponibilidade do
147 transportador. Em casos de alterações nestes determinantes, ocorre a
148 insuficiência placentária (KWAN et al., 2020).

149 Como a placenta é de fundamental importância para o desenvolvimento
150 fetal, alterações causadas por xenobióticos nas suas vias de sinalização
151 podem interromper o desenvolvimento normal do feto, podendo, em casos mais
152 graves, resultar em aborto espontâneo (REPO et al., 2014). Este órgão serve
153 de barreira para algumas substâncias tóxicas, porém, alguns teratógenos,
154 inclusive o álcool, conseguem atravessá-la livremente, causando déficits na
155 sua capacidade de transporte (GUDE et al., 2004).

156 A exposição ao EtOH prejudica a placentação, restringindo a
157 transformação vascular e reduzindo as células trofoblásticas invasivas
158 (GUNDOGAN, 2013). Em estudo *in vitro* com culturas de células derivadas da
159 placenta humana, CLAVE et al. (2014) demonstraram que a exposição ao
160 álcool causa a morte de células trofoblásticas devido a ativação das vias
161 apoptóticas como resultado do dano ao DNA. O álcool provoca a redução da
162 espessura da placenta, alterações na camada labiríntica, somando-se ao
163 aumento nos vasos maternos não transformados, resultando na diminuição do
164 fluxo sanguíneo e conseqüentemente a transferência de nutrientes para o feto.
165 Além disso, pode ocorrer a vasoconstricção placentária e um aumento
166 compensatório na pressão de perfusão, podendo diminuir o fornecimento de
167 oxigênio para o feto (CARTER et al., 2016). Ademais, a exposição pré-natal ao
168 álcool diminui a eficiência da placenta, sendo correlacionada com a

169 desregulação das citocinas, provocando uma intensificação da resposta
170 inflamatória no órgão (KWAN et al., 2020).

171 A ingestão de álcool ocasiona alterações patológicas na placenta que
172 estão associadas à morbidade fetal, pré-eclâmpsia e aumento do risco de
173 desenvolver doenças quando adulto, como diabetes do tipo 2 e doença
174 cardiovascular, além de prejudicar a placentação, o crescimento e a função
175 placentária (DAVIS-ANDERSON et al., 2017; SHANMUGAM et al., 2019). Além
176 disso, o EtOH pode provocar impactos celulares, tais como, alterações nas
177 expressões gênicas da placenta, fatores digestíveis derivados da placenta,
178 fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento
179 semelhante à insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2), serotonina, dopamina, norepinefrina
180 e estresse oxidativo (SHANMUGAM et al., 2019). Segundo Burd et al. (2007), o
181 álcool provoca vasoconstrição placentária, que dura enquanto o EtOH estiver
182 presente. A vasoconstrição dose-dependente ocasionada pelo EtOH provoca o
183 aumento da resistência vascular fetal-placentária e a pressão de perfusão na
184 placenta.

185 Várias enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e
186 glutathione peroxidase podem ser encontradas na placenta humana
187 (MOHAMMED et al., 2020). A placenta saudável gera espécies reativas de
188 oxigênio (ERO) para executar funções fisiológicas específicas, porém, fatores
189 exógenos de estresse oxidativo, como xenobióticos ou inflamação, podem
190 modificar genes ou diminuir a capacidade antioxidante, deste modo,
191 amplificando os níveis de ERO, levando a disfunção placentária
192 (SHANMUGAM et al., 2019). Em seus estudos, Gundogan et al. (2015),
193 observaram que o EtOH reduziu o número de trofoblastos induzidos, e o grau
194 de redução correspondeu a doses crescentes de EtOH. Também relataram que
195 a adesão celular nas células trofoblásticas é prejudicada com a exposição ao
196 álcool.

197

198 **1.4 Melatonina**

199 A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado
200 principalmente pela glândula pineal, mas em vertebrados também é produzida
201 em outros locais extrapineais, incluindo pele, intestino, glândula de Harder e
202 leucócitos (HARDELAN et al., 2006). Ela atua regulando o ciclo circadiano que

203 promove o sono quando prevalece a escuridão ou ajuda a acordar com a luz da
204 manhã (BOTAS, 2014). Sua secreção na corrente sanguínea é regulada pelo
205 ciclo claro/escuro por meio do núcleo supraquiasmático (HARDELAND et al.,
206 2006; OPIE; LECOUR, 2016). Este hormônio pode ser encontrado em
207 bactérias, protozoários, plantas, fungos e invertebrados, além dos vertebrados
208 (HARDELAND; POEGGELER, 2003).

209 Trata-se de uma indolamina pequena e com numerosas ações mediadas
210 dependentes e independentes de receptor. As funções dependentes de
211 receptor estão relacionadas com o controle do ciclo circadiano e sono. Já as
212 independentes de receptor estão relacionadas com a ação antioxidante
213 reduzindo o estresse oxidativo (REITER; TAN; GALANO, 2014). Os dois
214 grupos funcionais desta indolamina (Figura 1) são essenciais para a sua
215 especificidade de ligação ao receptor, anfifilicidade permitindo sua entrada em
216 qualquer célula, compartimento ou fluido corporal, além da sua química de
217 oxidação (HARDELAND et al., 2006). A melatonina age nas células alvos
218 diretamente ou por intermédio de receptores acoplados à proteína G, onde já
219 foram identificados três desses receptores: MT1, MT2 e MT3(GUNATA et al.,
220 2020).

221 **Figura 1:** Estrutura molecular da melatonina

222

223

224

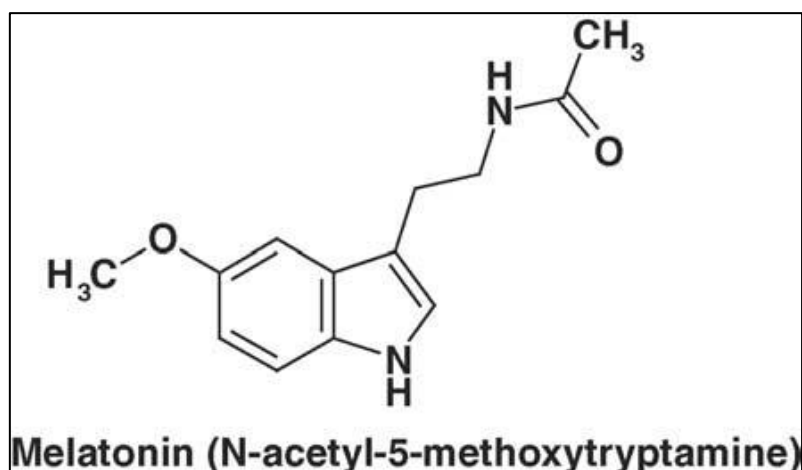
225

226

227

228

229



Fonte: HardeLand et al., 2006.

230 A prevenção de doenças causadas por estresse oxidativo vem
231 avançando nos últimos anos, devido aos estudos no papel dos radicais livres e
232 antioxidantes (NWOZO et al., 2012). O estresse oxidativo é um estresse
233 químico resultante do desequilíbrio entre a produção e consumo de

234 antioxidantes (GALANO; TAN; REITER, 2018). Em 1993 foi descoberta a
235 capacidade antioxidante da melatonina (POEGGELER et al., 1993). Esta
236 biomolécula e seus metabólitos, como AFMK e N1-acetil-5-metoxiquinuramina
237 (AMK), possuem altas propriedades antioxidantes, atuando na eliminação
238 direta de vários radicais livres, como o radical hidroxila (OH), peroxinitrito
239 (ONOO), óxido nítrico (NO) e radical O₂, além das espécies reativas de
240 oxigênio, nitrogênio e enxofre (GUNATA et al., 2020; AMARAL et al., 2019;
241 GALANO et al., 2018). Outro fator importante a se destacar é que a melatonina
242 é 5 vezes mais eficiente que a glutathione, 14 vezes mais que o manitol e mais
243 eficiente que a vitamina E na eliminação do radical hidroxila (SCHENKER et al.,
244 1998). Assim, torna-se interessante a utilização da melatonina em tratamentos
245 contra o estresse oxidativo, pois, a sua toxicidade é muito baixa, já tendo sido
246 demonstrado que sua ingestão por humanos é segura, mesmo em altas doses
247 (até 1g por dia) (GALANO; REITER, 2018; NORDLUND; LERNER, 1977;
248 ANDERSEN, 2016).

249 **1.5 Melatonina e seus efeitos benéficos em placentas expostas ao álcool**

250 A melatonina consegue atravessar facilmente e rapidamente a barreira
251 placentária e hematoencefálica sem sofrer biotransformação, sendo
252 considerada importante para a manutenção da função da placenta, para o
253 crescimento fetal e o desenvolvimento cerebral (SCHENKER et al., 1998; LEE
254 et al., 2019). Esta indolamina supostamente participa de diversas funções a fim
255 de garantir o adequado processo de decidualização, implantação e
256 placentação, deste modo, favorecendo o período gestacional completo até o
257 momento do parto (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2019). A elevada
258 concentração de ERO na placenta desencadeia invasão insuficiente da
259 placenta na parede uterina, culminando no sofrimento fetal e materno (REITER
260 et al., 2014).

261 Os receptores de melatonina MT1 e MT2 estão presentes na placenta,
262 sendo encontradas nas células trofoblásticas vilosas humanas (HELMO et al.,
263 2018; BERBETS et al., 2021). De acordo com Helmo et al., (2018), em estudos
264 experimentais, a administração de melatonina após episódio de isquemia /
265 reperfusão placentária contribui para reverter as alterações na atividade
266 respiratória mitocondrial na placenta de ratas. A administração da melatonina

267 melhora a má perfusão placentária materna, e vem se mostrando relativamente
268 segura para a mãe e o feto (LEE et al., 2019). Em estudos em mamíferos não
269 humanos, este hormônio vem melhorando os danos dos radicais livres à
270 placenta e ao feto (REITER et al., 2014).

271 Acredita-se que a melatonina seja um importante antioxidante na hipóxia
272 placentária. Pois, estudos apontam que a redução de oxigênio acarreta na
273 redução na proporção de controle respiratório mitocondrial e no consumo de
274 oxigênio, e também aumenta a oxidação de lipídios nas células da placenta.
275 Enquanto que a melatonina evita disfunções mitocondriais ao inibir a síntese de
276 ERO e outros indicadores de estresse oxidativo (HELMO et al., 2018). A
277 melatonina também atua reduzindo significativamente a apoptose dos
278 trofoblastos através de sua via dependente de receptor (LANOIX et al., 2012).
279 Os resultados do trabalho de Sagrillo-Fagundes et al., (2018) indicam que o
280 tratamento com melatonina exógena pode proporcionar proteção contra os
281 danos induzidos por hipóxia / reperfusão, assim, aumentando a sobrevivência
282 das células da placenta.

283 Segundo Berbets et al. (2019), a diminuição das concentrações de
284 melatonina no sangue de ratas grávidas foi seguida pela elevação da
285 interleucina-6-pró-inflamatória. Além disso, níveis reduzidos de melatonina em
286 mulheres com síndrome de restrição de crescimento intrauterino do feto, são
287 combinados com a elevação da interleucina-1-pró-inflamatória β , interleucina-6
288 e TNF α . A aplicação da melatonina exógena promove o controle da
289 patogênese das morbidades neonatais e doenças associadas à inflamação,
290 estresse oxidativo e morte celular (DE ALMEIDA CHUFFA, 2019).

291 **ABSTRACT**

292 The overall rate of alcohol consumption during pregnancy is high,
293 corresponding to 9.8%. Exposure to ethanol during pregnancy impairs
294 placentation, restricting vascular transformation and reducing invasive
295 trophoblastic cells. Melatonin is considered important for maintaining placental
296 function and fetal growth. With this in mind, this study aimed to assess whether
297 the exogenous melatonin administered during pregnancy could prevent the
298 harmful effects produced by alcohol, in the placentas and fetuses of rats. Thirty
299 albino rats (*Rattus norvegicus albinus*), of the Wistar lineage, were used, virgin,
300 with 90 days of age, weighing approximately $250\text{g} \pm 30\text{g}$, coming from the
301 Animal Farm Department of Animal Morphology and Physiology, of the Federal
302 Rural University of Pernambuco. The following experimental groups were
303 formed with 10 animals each: Group I: 5 pregnant rats that did not receive
304 alcohol and euthanized on the 20th day of gestation and 5 rats that were not
305 euthanized for analysis of the pups (control); Group II - 5 pregnant rats
306 subjected to chronic alcohol consumption, euthanized on the 20th day of
307 pregnancy and 5 rats that were not euthanized for analysis of the offspring
308 (alcohol) and Group III - 5 pregnant rats subjected to chronic alcohol
309 consumption and treated simultaneously with melatonin, euthanized on the 20th
310 day of pregnancy and 5 rats that were not euthanized for analysis of the
311 puppies (alcohol + honey). The histopathological and morphometric analysis of
312 group III did not show significant histological changes, similar to group I,
313 characterized by the observation of the basal deciduous region and the region
314 of the well-developed placental disc, with the labyrinth area, the outermost
315 region and thicker, characterized by the presence of maternal and fetal vessels,
316 in addition to syncytial trophoblasts. In the junctional zone, also called
317 spongioblasts or troposponges, undifferentiated trophoblasts and giant
318 trophoblastic cells (binucleated) were observed. Regarding the weight of
319 fetuses and placenta, there was a significant reduction in the group that
320 received only alcohol. These changes were not observed in group III. In
321 conclusion, the present work presents the potential for protective action of
322 melatonin against damage to the deciduous, junctional zone and placental
323 labyrinth of alcoholic pregnant rats. Thus, in cases of alcoholic pregnant
324 women, the administration of melatonin during pregnancy can serve as a
325 preventive measure against possible adverse effects on pregnancy and the
326 fetus.

327

328

329 **Keywords:** alcoholism; antioxidant; oxidative stress; poor placentation.

330

331

332

333

334

335

336 2. INTRODUÇÃO

337 Segundo a WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2018), Bebidas
338 alcoólicas são consumidas em todo o mundo. Fatores como gênero, idade,
339 religião e cultura têm influência sobre o consumo do álcool. Cerca de 2,348
340 bilhões de pessoas, ingerem bebidas alcoólicas, o que corresponde a 43% da
341 população, na região das Américas, o número de indivíduos que consomem
342 álcool ultrapassa a metade da população, chegando a 54,1%.

343 Para Anjum (2016), o consumo excessivo de álcool, principalmente entre
344 os jovens, é uma das questões que mais causa preocupação. O excesso de
345 consumo de álcool é definido como a ingestão consecutiva de 5 ou mais doses
346 para homens e quatro ou mais para mulheres em duas horas, sendo a dose
347 equivalente à 330 ml de cerveja, 100 ml de vinho e 30 ml de destilado, o que
348 resulta em uma concentração de álcool no sangue de 0,08 g/dl ou mais
349 (ALCOHOL RESEARCH, 2018; ANDRADE; SIU, 2019). Um paciente não
350 precisa atender os critérios de dependência e abuso de álcool para
351 desenvolver as consequências na saúde devido a este consumo (ANJUM,
352 2016).

353 O etanol (EtOH) compromete quase todos os sistemas do corpo
354 humano. Beber altas quantidades de álcool pode levar ao desenvolvimento de
355 pancreatite aguda, prejuízos na gliconeogênese e a oxidação dos ácidos
356 graxos no fígado, resultando no acúmulo de gordura nas células hepáticas
357 (JUNG; NAMKOONG, 2014). Além disso, o consumo excessivo de bebidas
358 alcoólicas por mulheres pode desregular os níveis dos hormônios sexuais e
359 causar alteração na função ovariana, culminando em amenorréia, infertilidade e
360 aumento do risco de aborto espontâneo (GILL, 2000).

361 Segundo Coelho et al., (2018), a ingestão crônica de álcool durante a
362 gestação é capaz de promover danos no DNA das células sanguíneas e
363 hepáticas das mães e prole, assim como no cérebro dos neonatos. A
364 exposição pré-natal ao EtOH pode resultar no desenvolvimento das desordens
365 do espectro alcoólico fetal (DEAF), onde, é caracterizada por déficit
366 neuroanatômico, cardiovascular, craniofacial, endócrino, metabólico e
367 comportamental. A síndrome do alcoolismo fetal é a mais grave das desordens
368 do espectro alcóolico fetal, representando 10% a 15% de todas DEAF, e é

369 caracterizada pela deficiência do crescimento, anomalias faciais e
370 anormalidades do sistema nervoso central, chegando a incluir déficit intelectual
371 (HELLER; BURD, 2014).

372 Estudos em animais e clínicos em mulheres grávidas têm demonstrado
373 que embora a placenta sirva como uma barreira para algumas substâncias
374 tóxicas, o etanol consegue atravessar livremente a barreira placentária,
375 chegando ao compartimento fetal (GUPTA; GUPTA, 2016). A concentração de
376 etanol é duas vezes menor no líquido amniótico do que sangue venoso
377 materno, porém a taxa de eliminação é mais rápida no sangue da mãe do que
378 líquido amniótico. Deste modo, o etanol pode ser detectado no compartimento
379 fetal após já ter sido eliminado da corrente sanguínea materna, assim, o feto é
380 exposto ao álcool por um período maior (ZELNER; KOREN, 2013; KWAN et al.,
381 2020).

382 Compostos com propriedades antioxidantes vêm sendo utilizados para
383 reduzir o estresse oxidativo e melhorar a atividade antioxidante em cérebros de
384 roedores com DEAF (BROCARD et al., 2011). A melatonina é uma
385 indolamina pequena e com numerosas ações mediadas dependentes e
386 independentes de receptor, podendo atuar no controle do ciclo circadiano, sono
387 e desempenhando ação antioxidante reduzindo o estresse oxidativo (REITER
388 et al., 2014).

389 Segundo Coelho et al., (2018), o tratamento com melatonina nas doses
390 de 10 mg/kg e 15 mg/kg durante todo o período gestacional foi capaz de
391 reduzir os efeitos causados pelo consumo crônico de álcool, demonstrando sua
392 eficácia terapêutica na proteção contra danos genotóxicos produzidos pelo
393 EtOH em mãe e fetos durante o período gestacional. A melatonina é um dos
394 antioxidantes mais potentes, sendo capaz de promover a redução de espécies
395 reativas de oxigênio e nitrogênio, além de atuar mobilizando o sistema
396 enzimático antioxidante intracelular, incluindo as enzimas glutathione peroxidase
397 e glutathione reductase (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018; REITER et al., 2016).
398 O estudo de Sagrillo-Fagundes et al., (2018), demonstrou que a melatonina foi
399 capaz de reduzir a inflamação e autofagia nos trofoblastos placentários em
400 condições de hipóxia e reoxigenação, deste modo, reduzindo os índices de
401 apoptose e aumentando as taxas de sobrevivência celular.

402 Com isto, este trabalho teve como objetivo avaliar se a melatonina
403 exógena administrada durante a gestação pode prevenir os efeitos deletérios
404 produzidos pelo álcool nas placentas de ratas da linhagem Wistar.

405

406

407

408 3. MATERIAL E MÉTODOS

409 O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento
410 de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

411 3.1 Obtenção dos Animais

412 Foram utilizadas 15 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem
413 Wistar, com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 250±30g,
414 procedentes do Biotério do mesmo Departamento, aprovado pelo comitê de ética
415 institucional sob o Nº 041/2019. Os animais foram confinados em gaiolas e
416 mantidos com alimentação e água *ad libitum*, permanecendo no biotério a
417 temperatura de 22°C e iluminação artificial, produzida por lâmpadas fluorescentes
418 (marca Phillips, modelo luz do dia, 40W), estabelecendo o fotoperíodo de 12 horas
419 claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas.

420 Após um período de adaptação de sete dias, foram realizados esfregaços
421 vaginais para a determinação do ciclo estral. As fêmeas que apresentaram três
422 ciclos estrais consecutivos regulares foram selecionadas para o experimento, os
423 quais constaram dos seguintes grupos experimentais com 10 animais cada:

424 Grupo I – 5 ratas prenhes que não receberam álcool e eutanasiadas no 20º
425 dia de gestação (controle);

426 Grupo II – 5 ratas prenhes submetidas ao consumo crônico de álcool e
427 eutanasiadas no 20º dia de gestação (álcool);

428 Grupo III – 5 ratas prenhes submetidas ao consumo crônico de álcool e
429 tratadas simultaneamente com melatonina, eutanasiadas no 20º dia de gestação
430 (álcool + melatonina).

431 3.2 Acasalamento dos Animais

432 As fêmeas dos experimentos foram acasaladas na proporção de um macho
433 para cada três fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). No dia seguinte foram
434 realizados exames colpocitológicos, sempre no período da manhã (06:00h), para a
435 confirmação do acasalamento, tomando-se com parâmetro a presença de
436 espermatozoides. Este dia foi considerado como o primeiro dia gestacional.

437 **3.3 Administração do Etanol**

438 Foi administrado, por gavagem intragástrica, a dosagem de 3 g/Kg de álcool
439 etílico em ratas durante a prenhez (Varlinskaya et al., 2001; Araújo-Filho et al.,
440 2007; Veiga et al., 2007; Scheidt et al., 2015; Marco et al., 2017) diluído em água
441 destilada.

442 **3.4 Tratamento com Melatonina**

443 A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co., St. Louis,
444 USA) foi administrada em injeções diárias de 0,8 mg/Kg, por toda a gestação e
445 lactação. Para tanto, a melatonina foi dissolvida em 0,2 mL de etanol e diluída em
446 0,8mL NaCl a 0,9%. As injeções foram aplicadas via intraperitoneal, sempre no
447 período das 18:00 às 19:00h, durante todo o experimento. Esta dose é comparável
448 a dosagem humana (9 mg/kg), a qual foi convertida com base na área de superfície
449 do corpo (Paget; Barne, 1994; Moustafa et al., 1999; Abd-Allah et al., 2003). Os
450 animais dos grupos I e II receberam o veículo do hormônio.

451 **3.5 Análise histopatológica da placenta**

452 Para coleta da placenta, as matrizes foram anestesiadas com hidrocloridrato
453 de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10,0 mg/kg) por via intramuscular. Em seguida,
454 foi realizada a abertura da cavidade abdominal para a remoção total dos cornos
455 uterinos contendo os fetos e as placentas. Após a coleta das placentas foi realizada
456 a eutanásia com sobredosagem anestésica.

457 As placentas foram mergulhadas em formol tamponado, permanecendo no
458 mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos foram desidratados em álcool
459 etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos
460 em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo do tipo Minot
461 (Leica RM 2035) ajustado para 5µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em
462 lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa
463 regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em
464 sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina -
465 eosina (H. E.), e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e
466 fotografados em microscópio OLYMPUS BX-50.

467 **3.6 Análise Morfométrica da placenta**

468 Para análise morfométrica, foram utilizadas cinco lâminas de cada grupo e
469 as regiões do disco placentário foram analisadas. As medidas foram restringidas as
470 regiões do labirinto, trofospongio, espongiotrofoblasto e células trofoblásticas
471 gigantes. A morfometria de pontos foi analisada pela quantificação, através da
472 gráticula de 110 pontos, das estruturas e células, as quais foram classificadas em:
473 (1) Vascularização materna; (2) Células trofoblásticas pequenas - indiferenciadas
474 (em contato com vasos fetal); (3) Células intermediárias (em contato com vasos
475 maternos); (4) Células trofoblásticas gigantes (binucleadas); (5) Células sinciciais
476 (próximas a região do espongioblasto) e (6) Mesênquima, na região do
477 espongioblastos na região do trofospongio; e na região do labirinto em: (1)
478 Trofoblasto sincicial; (2) Parede de vasos fetais; (3) Lúmen de vasos fetais e (4)
479 Espaço sanguíneo materno Leito vascular labiríntico (vaso materno), sendo
480 analisados na objetiva de 40X, escolhidos aleatoriamente 15 campos por região
481 placentária (Lemos et al., 2014).

482 **3.7 Pesagem dos fetos**

483 No dia 20^o dia de gestação, as mães foram eutanasiadas e os fetos foram
484 pesados em balança analítica

485 **3.8 Análise Estatística**

486 Para a comparação dos dados morfométricos foram realizadas a Análise de
487 Variância, quando significativa esta foi complementada pelo teste de Comparações
488 Múltiplas de Tukey e Kramer. Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($P <$
489 0,05).

490

491

492

493

494

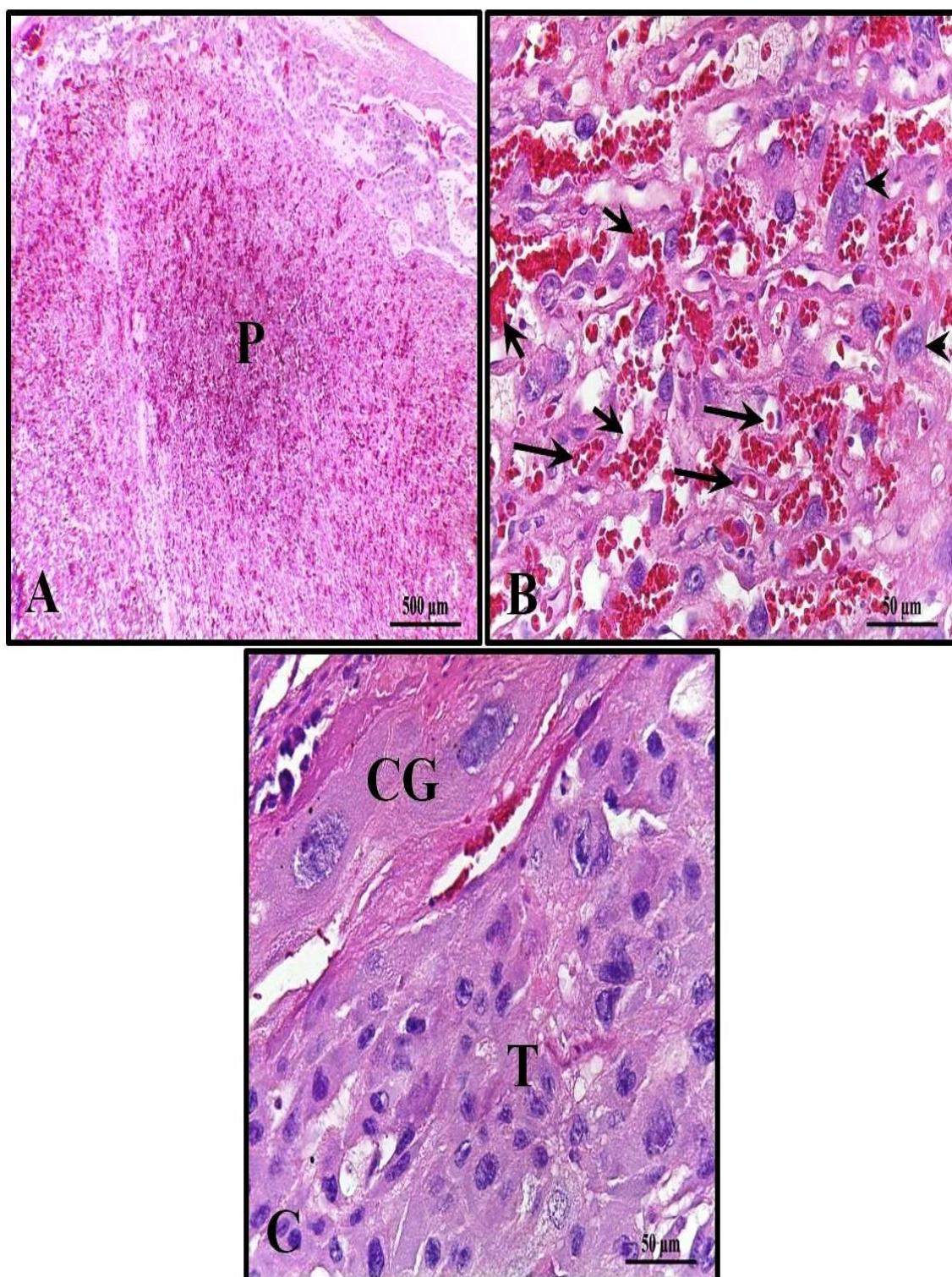
495

496 **4. RESULTADOS**

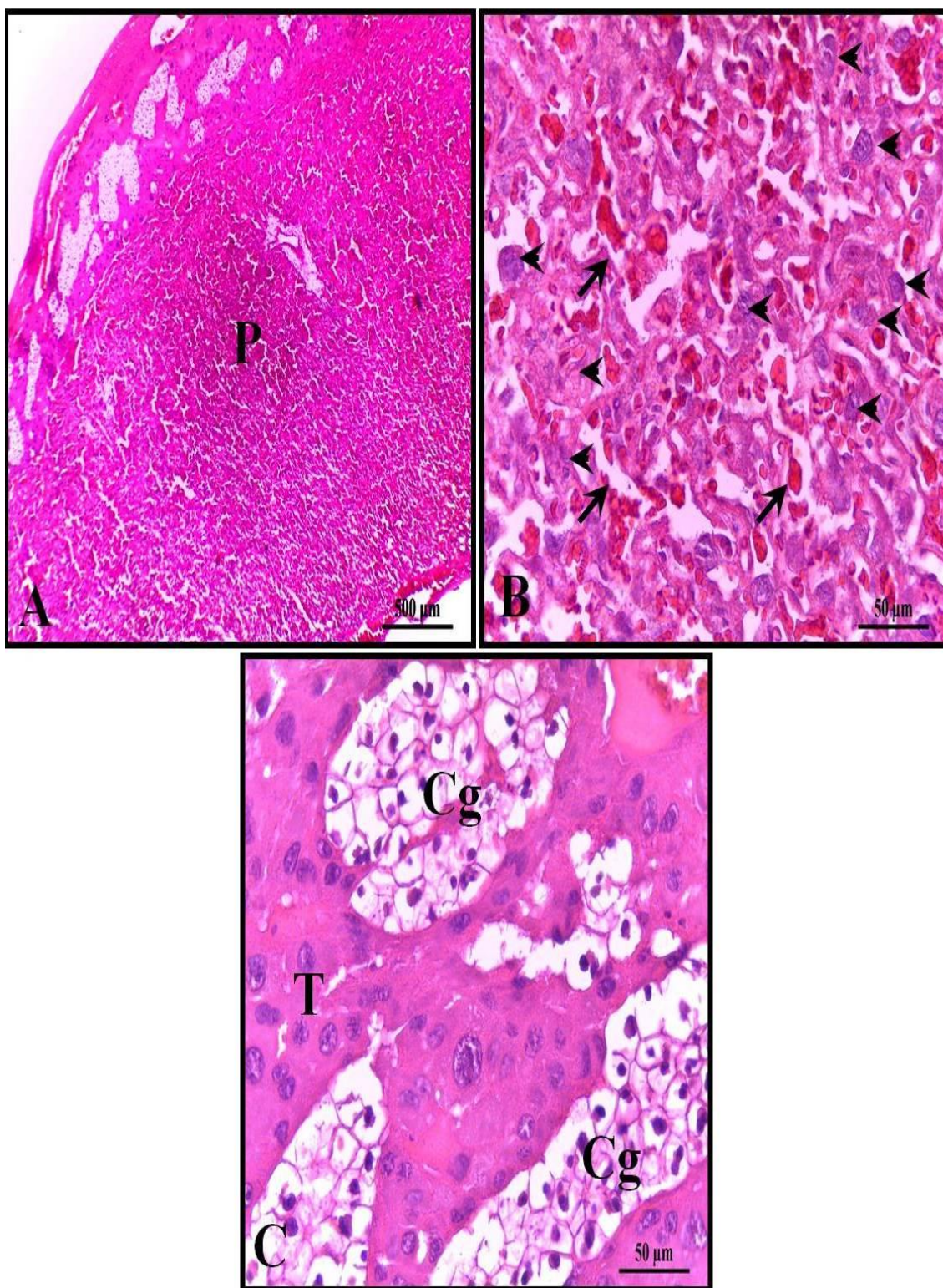
497 As placentas com vinte dias de desenvolvimento, dos grupos experimentais
498 controle e álcool + mel, não mostraram alterações histológicas significativas,
499 caracterizando-se pela observação da região da decídua basal e a região do disco
500 placentário bem desenvolvido, com a zona do labirinto, região mais externa e mais
501 espessa, caracterizada pela presença de vasos maternos e fetais, além de
502 trofoblastos sinciciais (Figs. 2 A-B e 4 A-B). Na zona juncional, também chamada
503 de espongioblastos ou trofospongio observou-se trofoblastos indiferenciados e
504 células trofoblásticas gigantes (binucleadas) (Figs. 2 C e 4 C).

505 A análise histopatológica das placentas do grupo experimental álcool, de
506 modo geral, caracterizaram-se por apresentar região da decídua basal e do disco
507 placentário pouco desenvolvido, com desorganização da zona do labirinto com
508 predominância dos vasos e trofoblastos sinciciais, porém raros vasos fetais (Figs. 3
509 A-B). Na zona juncional, foram observados trofoblastos indiferenciados, numerosos
510 aglomerados de células de glicogênio, porém ausência de células trofoblásticas
511 gigantes (Fig. 3 C).

512 Com relação ao peso dos fetos e da placenta, verificou-se redução
513 significativa no grupo que recebeu apenas álcool (Figs. 5 e 6). Já a análise
514 morfométrica das placentas do grupo álcool mostrou alterações na zona do labirinto
515 e juncional. No labirinto observou-se redução dos vasos maternos e fetais e
516 aumento dos trofoblastos sinciciais nas fêmeas que receberam álcool. Na zona
517 juncional houve redução das células trofoblásticas indiferenciadas e células
518 trofoblásticas gigantes, além de aumento das células de glicogênio. Estas
519 alterações não foram observadas nos outros dois grupos (Tabela 1).

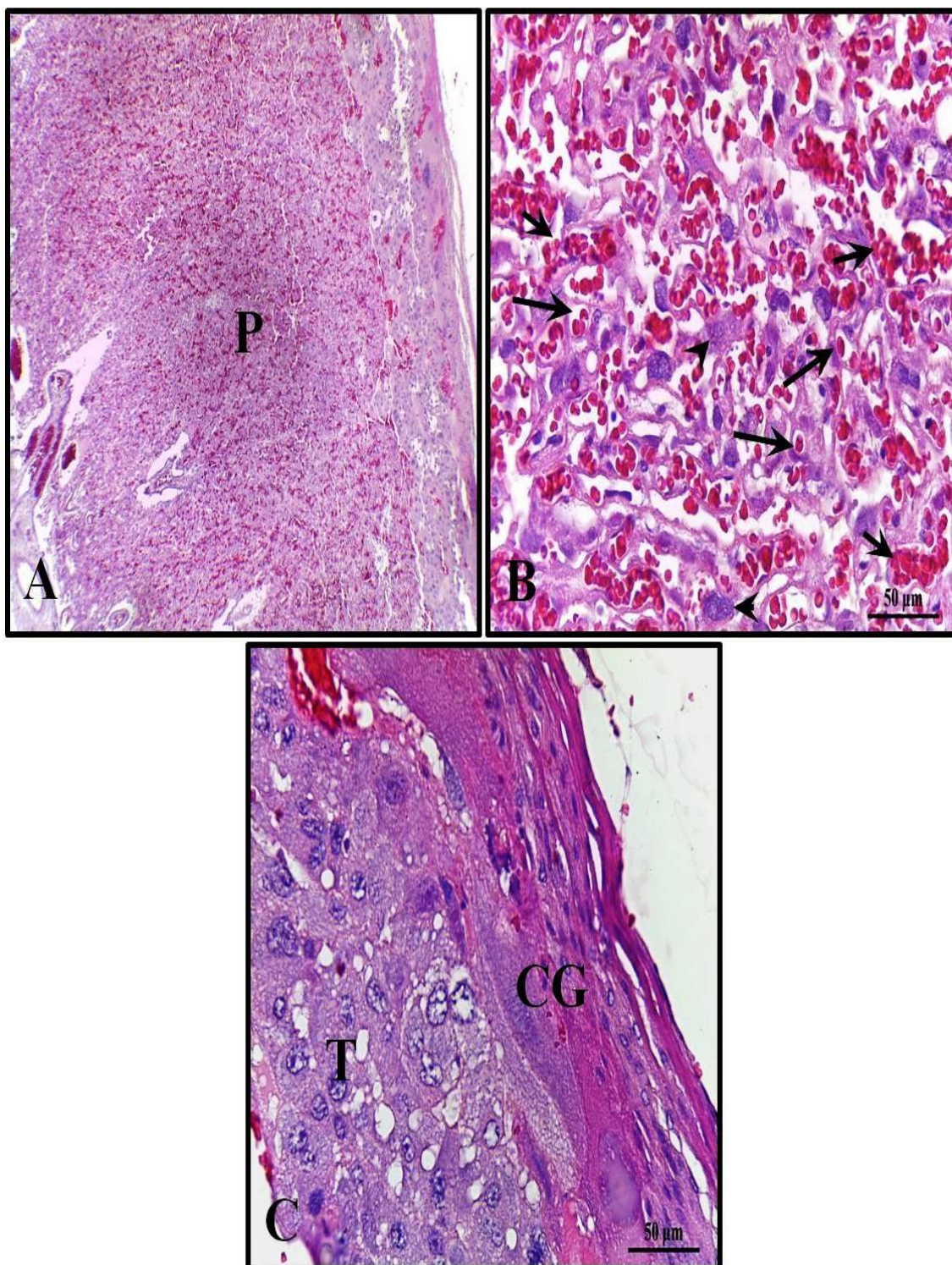


546 **Figura 2:** Histologia das placentas das fêmeas do grupo controle. A - Notar disco
547 placentário (P) bem desenvolvido; B - Zona do labirinto contendo vasos maternos
548 (setas curtas), vasos fetais (setas longas) e trofoblasto sincicial (ponta de setas); C
549 - Zona juncional observar trofospongios (T) e células trofoblasticas gigantes (CG).
550 Coloração H.E.



577 **Figura 3:** Histologia das placentas das fêmeas do grupo álcool. A - Notar disco
578 placentário (P) pouco desenvolvido; B - Zona do labirinto desorganizada com vasos
579 maternos (setas curtas) e predominância trofoblastos sinciciais (ponta de setas); C
580 - Zona juncional observar trofospongios (T) e células de glicogênio (Cg). Coloração
581 H.E.

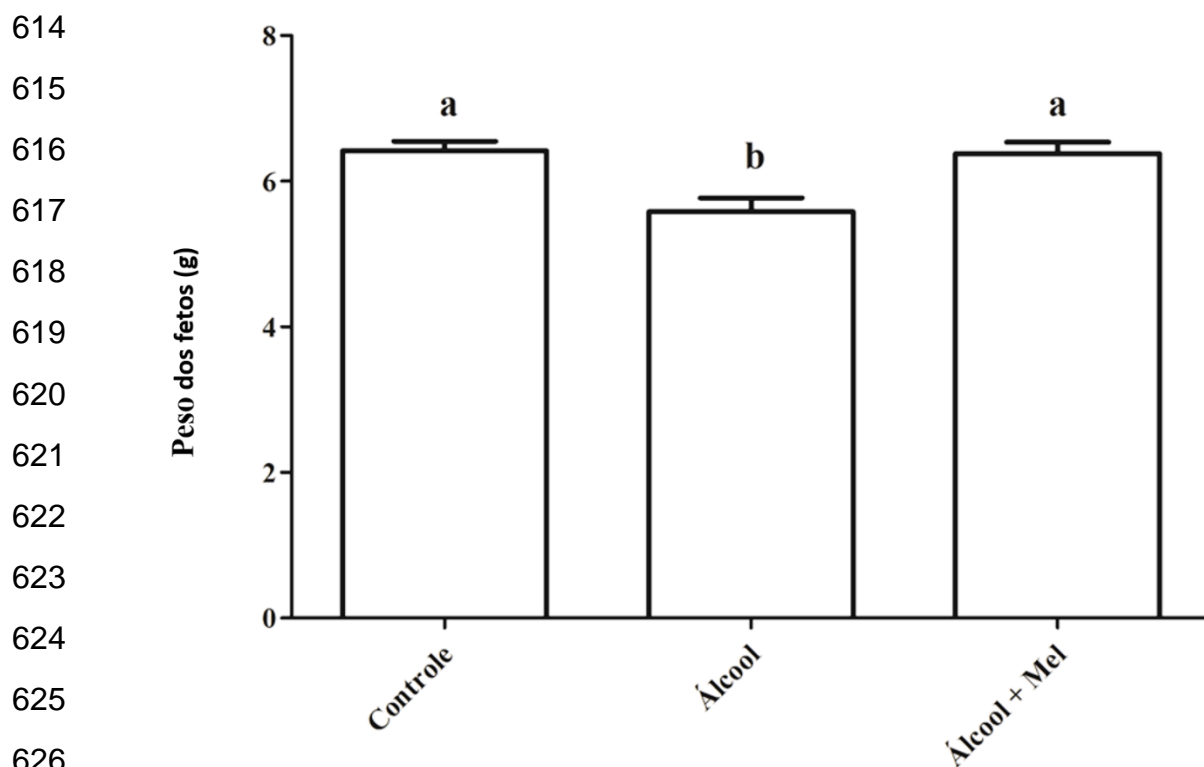
582



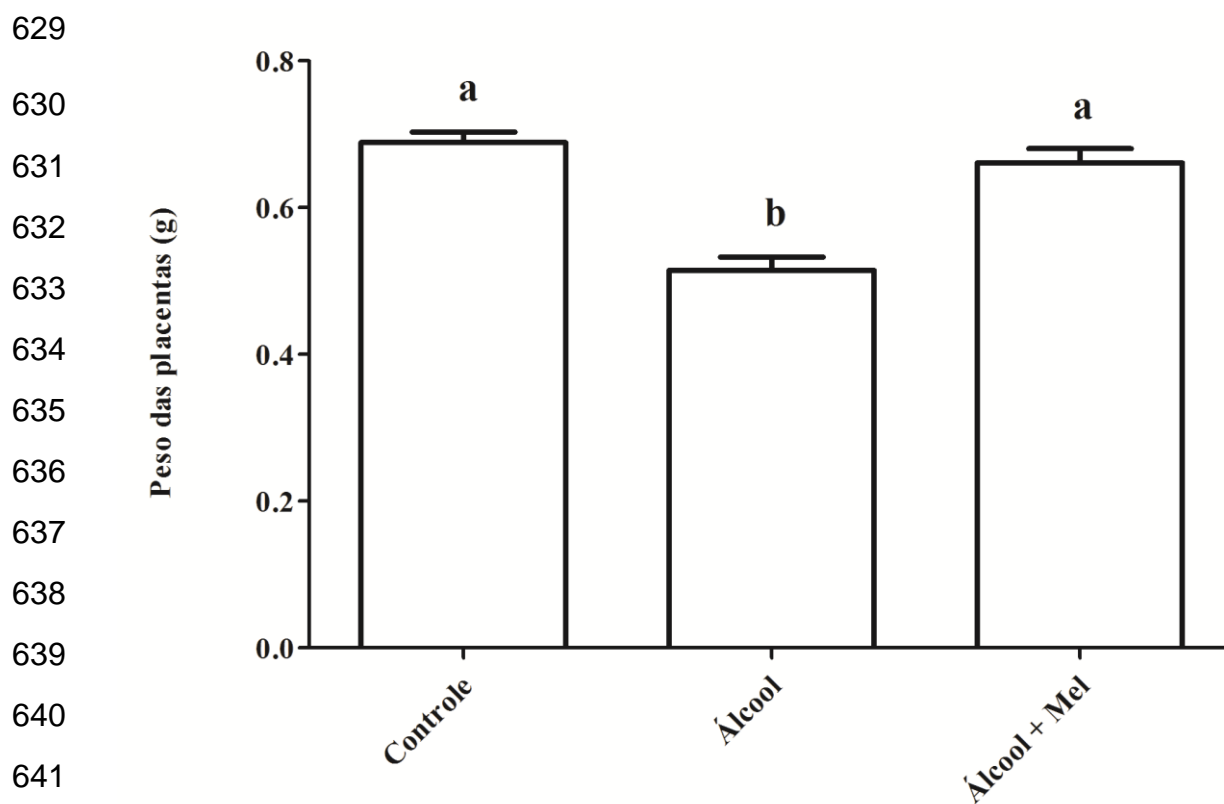
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607

608 **Figura 4:** Histologia das placentas das fêmeas do grupo álcool + mel. A - Notar
609 disco placentário (P) bem desenvolvido; B - Zona do labirinto contendo vasos
610 maternos (setas curtas), vasos fetais (setas longas) e trofoblasto sincicial (ponta de
611 setas); C - Zona juncional observar trofospongios (T) e células trofoblasticas
612 gigantes (CG). Coloração H.E.

613



627 **Figura 5:** Peso dos fetos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
628 significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).



642 **Figura 6:** Peso das placentas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
643 significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

644

645 **Tabela 1:** Percentuais dos elementos constituintes das zonas do labirinto (ZL) e
 646 juncional (ZJ) das placentas das fêmeas dos grupos experimentais.

		Controle	Álcool	Álcool + Mel	P
	VM	52,75 ± 3,61a	45,34 ± 1,02b	54,20 ± 4,78a	0,0197
ZL	VF	36,57 ± 1,68a	30,56 ± 1,42b	34,65 ± 1,24a	0,0002
	TS	10,68 ± 1,13b	24,10 ± 0,86a	11,15 ± 0,97b	0,0078
	CT	49,20 ± 2,09a	40,11 ± 1,03b	48,66 ± 3,49a	0,0125
ZJ	CG	12,76 ± 4,80b	26,32 ± 2,16a	14,01 ± 4,49b	0,0334
	CTG	38,04 ± 3,26a	33,20 ± 1,04b	37,33 ± 2,76a	0,0113

647 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si
 648 pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05). VM = vasos maternos, VF =
 649 vasos fetais, TS = trofoblastos sinciciais, CT = células trofoblásticas
 650 indiferenciadas, CG = células de glicogênio e CTG = células trofoblásticas
 651 gigantes.

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671 5. DISCUSSÃO

672 O consumo materno de álcool durante a gestação ou lactação é prejudicial
673 para o desenvolvimento do feto (SHIRPOOR et al.,2019), podendo ocasionar
674 insuficiência placentária e restrição de crescimento fetal (TSENG et al., 2018).
675 Entretanto, estudos com melatonina vem indicando a capacidade deste hormônio
676 em promover a perfusão placentária, oxigenação fetal e a prevenção da restrição
677 do crescimento intrauterino (HELMO et al., 2018).

678 Neste estudo, o grupo que recebeu apenas álcool apresentou redução do
679 peso fetal e da placenta quando comparado aos grupos controle e
680 álcool+melatonina. Este resultado corresponde com o apresentado no trabalho de
681 Gardebjer et al., (2014), onde, o consumo de álcool no período gestacional
682 ocasionou redução do peso fetal e placentário, além de alterações na morfologia da
683 placenta. A redução dos pesos fetais pode estar relacionada com a restrição do
684 crescimento fetal, onde, é ocasionada pela má formação da placenta (KALISCH-
685 SMITH et al., 2019; TAI et al., 2017), além de poder ser justificada pela redução da
686 transferência através da placenta de nutrientes essenciais para o desenvolvimento
687 fetal. Após a ingestão do álcool, ocorre a geração de estresse oxidativo e uma
688 mudança no fluxo sanguíneo da placenta, o que prejudica a circulação maternal
689 para a placenta (SEBASTIANI et al., 2018). Além disso, a obtenção de nutrientes
690 pelo feto pode ter sido deficiente, assim como a transferência, pois, o consumo de
691 álcool causa vasoconstrição no cordão umbilical, deste modo, prejudicando o fluxo
692 sanguíneo (BURD et al., 2007). Em relação aos pesos fetais e placentários
693 reduzidos no grupo álcool, a melatonina administrada pode ter atuado na
694 manutenção do crescimento fetal e placentário, fazendo a manutenção de seus
695 pesos. Além da melatonina poder elevar a capacidade antioxidante da placenta e
696 aumentar a vasodilatação do leito vascular (UZUN et al., 2018), prevenindo os
697 danos oxidativos nas mitocôndrias placentárias, assim, evitando a restrição de
698 crescimento causada por isquemia / reperfusão, e restaurando as funções
699 placentárias (NAGAI et al., 2008). Pois, já foi demonstrado em um modelo animal
700 que a melatonina reduz a lesão de isquemia / reperfusão na placenta
701 (MARSEGLIA, L. et al., 2016).

702 As análises histopatológicas e morfométricas das placentas de 20 dias do
703 grupo álcool indicaram alterações na região da decídua basal e do disco

704 placentário pouco desenvolvido, com desorganização da zona do labirinto com
705 predominância dos vasos maternos e trofoblastos sinciciais, entretanto, raros vasos
706 fetais. Na zona juncional, foram observados trofoblastos indiferenciados,
707 numerosos aglomerados de células de glicogênio, porém, ausência de células
708 trofoblásticas gigantes. Estes resultados assemelham-se aos observados no
709 trabalho de Turan; Arzu (2005), onde, o grupo exposto ao álcool apresentou
710 achados histológicos, como invasão trofoblástica anormal na decídua, degeneração
711 e distúrbio nuclear nas células trofoblásticas gigantes e espongioblastos e
712 desarranjo denso no labirinto.

713 A análise morfométrica das placentas do grupo álcool mostrou alterações na
714 zona do labirinto e juncional. No labirinto observou-se redução dos vasos maternos
715 e fetais e aumento dos trofoblastos sinciciais. A literatura relata que a exposição ao
716 EtOH prejudica a placentação, podendo inibir a transformação vascular e reduzir as
717 células trofoblásticas invasivas (GARDEBJER et al., 2014). Segundo Salihu et al.,
718 (2011), a placenta cresce e se desenvolve ao longo da gestação, e esse
719 crescimento acompanha o aumento da vasculatura e área de superfície do
720 trofoblasto, com o álcool sendo capaz de interromper estes processos.

721 Também foram observadas alterações na zona juncional, ocorrendo a
722 redução das células trofoblásticas indiferenciadas e células trofoblásticas gigantes,
723 além do aumento das células de glicogênio. No trabalho de Gardebjer et al., (2014),
724 também foi observado o aumento do número de células de glicogênio nas
725 placentas expostas ao EtOH. Estudos com modelos animais levantam a hipótese
726 de que os estoques de glicogênio placentário fornecem uma fonte de glicose para
727 apoiar o crescimento fetal no período final da gestação (COAN et al., 2006), esta
728 hipótese é reforçada pelo fato do glicogênio atuar como principal estoque de
729 energia em animais e ter uma redução considerável no final da gravidez,
730 coincidindo com o período de rápido crescimento fetal (TUNSTER et al., 2020). As
731 células de glicogênio da zona juncional placentária são responsáveis pelo
732 armazenamento de glicogênio e secreção de IGF2 (SHARMA et al., 2019), já tendo
733 sido relatado que a exposição ao etanol pode provocar alterações na expressão
734 gênica de IGF2 na placenta (SHANMUGAM et al., 2019). Deste modo, o aumento
735 do número de células de glicogênio observado neste estudo pode ser um
736 mecanismo da placenta para recompensar a possível redução da transferência de
737 nutrientes para o feto, visto que, a localização das células de glicogênio no entorno

738 das artérias maternas implica no potencial de liberação de glicose no sangue
739 materno, fornecendo nutrientes para a absorção fetal (ROBERTS; TUNSTER,
740 2020)

741 A exposição pré-natal ao EtOH ocasiona restrição do crescimento
742 intrauterino, que geralmente está correlacionada com a redução da sobrevivência
743 das células citotrofoblásticas progenitoras. Uma possível explicação para a má
744 placentação e a restrição do crescimento intrauterino em casos de ingestão de
745 álcool durante a gravidez, é o aumento da apoptose nos citotrofblastos
746 placentários. O aumento da apoptose nas células trofoblásticas da placenta
747 humana contribui para a má placentação, redução no transporte de nutrientes e
748 desenvolvimento de disfunção endotelial (BOLNICK et al., 2014). A presença do
749 álcool na placenta resulta em estresse oxidativo e peroxidação lipídica, ambos
750 relacionados à apoptose e necrose placentária (NOGALES et al., 2017). O estresse
751 oxidativo na placenta e a hipóxia / reoxigenação são indutores potentes de
752 apoptose de sincitiotrofoblasto através da via mitocondrial, por meio do
753 desequilíbrio entre as defesas pró-oxidante e antioxidante (LANOIX et al., 2013).

754 As placentas dos grupos controle e álcool + mel não apresentaram
755 alterações histológicas significativas. Deste modo, pode-se afirmar que a
756 melatonina foi capaz de prevenir as alterações histológicas nas placentas
757 observadas no grupo II. Já foi relatado na literatura que a placenta humana e de
758 ratos possuem receptores de melatonina, MT1 e/ou MT2, e que a melatonina
759 promove a sobrevivência das células placentárias através da ligação com esses
760 receptores (LANOIX, 2012; UZUN et al., 2018), além de eliminar os radicais livres
761 presentes na placenta, e, deste modo, reduzir o dano oxidativo no órgão,
762 aumentando as enzimas antioxidantes e reduzindo a peroxidação lipídica
763 (MILCZAREK et al., 2010). A morte celular por apoptose ocasiona respostas
764 inflamatórias, como a elevação dos níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α . Enquanto que a
765 melatonina vem demonstrando seu efeito antiinflamatório por conseguir reduzir os
766 níveis destes marcadores da inflamação (YILMAZ et al., 2020; CRUVINEL et al.,
767 2010). Segundo Lanoix et al., (2013), a melatonina é capaz de diminuir a apoptose
768 dependente de mitocôndria através das vias ativadas pelo estresse oxidativo,
769 sendo capaz de reduzir a perda dos citotrofblastos vilosos. Assim, podendo atuar
770 na manutenção e/ou na restauração da atividade placentária.

771

772 6. CONCLUSÃO

773 Assim, o presente trabalho apresenta o potencial de ação protetora da
774 melatonina contra danos na decídua, zona juncional e labirinto placentário de
775 ratas gestantes alcoólicas. Atuando sobre a diferenciação dos trofoblastos na
776 zona do labirinto e evitando a redução de vasos maternos e fetais na zona
777 juncional, ao mesmo tempo que manteve o peso placentário e dos fetos de
778 ratas submetidas ao tratamento exógeno de melatonina associada ao consumo
779 crônico álcool durante a gestação. Desta forma, em casos de mulheres
780 gestantes alcoólatras, a administração da melatonina durante a gestação pode
781 servir como medida preventiva contra possíveis efeitos adversos na gestação e
782 no feto.

783

784

785 **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 786 ALCOHOL RESEARCH: Current Reviews Editorial, Drinking Patterns and Their
787 Definitions, **Alcohol Research**, v. 39, n. 1, p. 17 – 18, 2018.
- 788 AMARAL, F. G., CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal
789 hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472–
790 479, ago. 2018.
- 791 AMARAL, F. G., JÉSSICA, ANDRADE-SILVA, J., KUWABARA, W. M. T.,
792 CIPOLLA-NETO, J. New insights into the function of melatonin and its role in
793 metabolic disturbances. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v.
794 14, n. 4, p. 293–300, 4 jul. 2019.
- 795 ANDERSEN, L. P. H; GOGENUR, I; ROSENBERG, J; REITER, R. J. The Safety of
796 Melatonin in Humans. **Clinical Drug Investigation**, v. 36, n. 3, p. 169 - 175,
797 mar. 2016.
- 798 ANDRADE, A. G; SIU, E. R. Álcool e a Saúde dos Brasileiros: Panorama 2019.
799 **Centro de informações sobre saúde e álcool**. p. 104, 2019.
- 800 ANJUM, A. Alcoholism. **The Medical Basis Of Psychiatry**, [S.L.], p. 247-269,
801 2016. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2528-5_14.
- 802 BERBETS, A. M., DAVYDENKO, I. S., BARBE, A. M., KONKOV, D. H., ALBOTA,
803 O. M., YUZKO, O. M. Melatonin 1A and 1B Receptors' Expression Decreases
804 in the Placenta of Women with Fetal Growth Restriction. **Reproductive**
805 **Sciences**, v. 28, n. 1, p. 197–206, jan. 2021.
- 806 BERBETS, A. M., KOVAL, H., BARBE, A. M., ALBOTA, O. M., YUZKO, O.
807 Melatonin decreases and cytokines increase in women with placental
808 insufficiency. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 34, n.
809 3, p. 373–378, 2019.
- 810 BHATIA, S., DRAKE, D. M., MILLER, L., WELLS, P. G. Oxidative stress and DNA
811 damage in the mechanism of fetal alcohol spectrum disorders. **Birth Defects**
812 **Research**, v. 111, n. 12, p. 714–748, 15 jul. 2019.
- 813 BOLNICK, J. M., KARANA, R., CHIANG, P. J., KILBURN, B. A., ROMERO, R.
814 Apoptosis of Alcohol-Exposed Human Placental Cytotrophoblast Cells is
815 Downstream of Intracellular Calcium Signaling. **Alcoholism: Clinical and**
816 **Experimental Research**, v. 38, n. 6, p. 1646–1653, jun. 2014.
- 817 BOSCO, C., DIAZ, E. Placental Hypoxia and Foetal Development Versus Alcohol
818 Exposure in Pregnancy. **Alcohol and Alcoholism**, v. 47, n. 2, p. 109–117, 1
819 mar. 2012.
- 820 BOTAS, F. M. C. O Papel da Melatonina. p. 68, 2014.
- 821 BOWMAN, Z. S. Sonographic Appearance of the Placenta. **Current Problems**
822 **Diagnostic Radiology**, v.43, n. 6, p. 356 - 373, 2014.
- 823 BROCARD, P. S., GIL-MOHAPEL, J., CHRISTIE, B. R. The role of oxidative
824 stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Research Reviews**, v. 67,
825 n. 1–2, p. 209–225, 2011. Disponível em:
826 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017311000142>>.

- 827 BUONOCORE, G., BRACCI, S. P. R. Free Radicals and Brain Damage in the
828 Newborn. **Biol Neonate**, p. 180-186, 2001.
- 829 BURD, L., ROBERTS, D., OLSON, M., ODENDAAL, H. Ethanol and the Placenta: A
830 Review. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 20, n. 5, p.
831 361–375, jan. 2007.
- 832 BURTON, G. J; KAUFMANN, P; HUPPERTZ, B. Anatomy and Genesis of the
833 Placenta. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 189 - 243,
834 2006.
- 835 CARTER, R. C., WAINWRIGHT, H., MOLTENO, C. D., GEORGIEFF, M. K.,
836 DODGE, N. C. Alcohol, Methamphetamine, and Marijuana Exposure Have
837 Distinct Effects on the Human Placenta. **Alcoholism: Clinical and**
838 **Experimental Research**, v. 40, n. 4, p. 753–764, abr. 2016.
- 839 CEDERBAUM, A. I., LU, Y., WU, D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver
840 injury. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 519–548, jun. 2009.
- 841 COAN, P. M; CONROY, N; BURTON, G. J; FERGUSON-SMITH, A. C. Origin and
842 Characteristics of Glycogen Cells in the Developing Murine Placenta.
843 **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 12, p. 3280 - 3294, dez. 2006.
- 844 COLL, T. A., CHAUFAN, G., PÉREZ-TITO, L. G., VENTUREIRA, M. R., RÍOS DE
845 MOLINA, M. C., CEBRAL, E. Cellular and molecular oxidative stress-related
846 effects in uterine myometrial and trophoblast-decidual tissues after
847 perigestational alcohol intake up to early mouse organogenesis. **Molecular**
848 **and Cellular Biochemistry**, v. 440, n. 1–2, p. 89–104, mar. 2018.
- 849 CROSS, J.; WERB, Z.; FISHER, S. Implantation and the placenta: key pieces of the
850 development puzzle. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1508–1518, 2 dez. 1994.
- 851 CRUVINEL, W. DE M; MESQUITA, J. D; ARAÚJO, J. A. P; CATELAN, T. T. T;
852 SOUZA, A. W. S. Sistema Imunitário: Parte I. Fundamentos da Imunidade
853 Inata com Ênfase nos Mecanismos Moleculares e Celulares da Resposta
854 Inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434 - 447,
855 ago. 2010.
- 856 DAVIS-ANDERSON, K. L., BERGER, S., LUNDE-YOUNG, E. R., NAIK, V. D.,
857 SEO, H. Placental Proteomics Reveal Insights into Fetal Alcohol Spectrum
858 Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 41, n. 9, p.
859 1551 - 1558, 2017.
- 860 DE ALMEIDA CHUFFA, L. G., LUPI, L. A., CUCIELO, M. S., SILVEIRA, H. S.,
861 REITER, R. J., SEIVA, F. R. F. Melatonin Promotes Uterine and Placental
862 Health: Potential Molecular Mechanisms. **International Journal of Molecular**
863 **Sciences**, v. 21, n. 1, p. 300, 31 dez. 2019.
- 864 DOGAN, A., ANUK, O. O. Investigation of the phytochemical composition and
865 antioxidant properties of chinar (*Platanus orientalis* L.) leaf infusion against
866 ethanol-induced oxidative stress in rats. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n.
867 3, p. 3049–3061, jun. 2019.
- 868 FEITOSA, F. L. F. Importância da transferência da imunidade passiva para a
869 sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada em**
870 **Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 2, n. 3, p. 17–22, 1 dez.
871 1999.

- 872 GALANO, A., REITER, R. J. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From
873 individual actions to collective protection. **Journal of Pineal Research**, v. 65,
874 n. 1, p. e12514, ago. 2018.
- 875 GALANO, A., TAN, D.X., REITER, R. J. Melatonin: A Versatile Protector against
876 Oxidative DNA Damage. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 530, 27 fev. 2018.
- 877 GÅRDEBJER, E. M., CUFFE, JS., PANTALEON, M., WLODEK, ME., Moritz, KM.
878 Periconceptional alcohol consumption causes fetal growth restriction and
879 increases glycogen accumulation in the late gestation rat placenta. **Placenta**,
880 v.35, n. 1, p. 8, 2014.
- 881 GED gastroenterol. **endosc.dig**, v. 30, p.152-162, 2011.
- 882 GILL, J. The Effects of Moderate Alcohol Consumption on Female Hormone Levels
883 and Reproductive Function. **Alcohol and Alcoholism**, v. 35, n. 5, p. 417–423,
884 2000. Disponível em: <[https://academic.oup.com/alcalc/article-
885 lookup/doi/10.1093/alcalc/35.5.417](https://academic.oup.com/alcalc/article-lookup/doi/10.1093/alcalc/35.5.417)>.
- 886 GUDE, N. M., ROBERTS, C. T., KALIONIS, B., KING, R. G. Growth and function of
887 the normal human placenta. Thrombosis. **Research**, v. 114, n. 5–6, p. 397–
888 407, jan. 2004.
- 889 GUNATA, M., PARLAKPINAR, H., ACET, H. A. Melatonin: A review of its potential
890 functions and effects on neurological diseases. *Revue Neurologique*, v. 176, n.
891 3, p. 148–165, mar. 2020.
- 892 GUNDOGAN, F. Dual Mechanisms of Ethanol-Impaired Placentation: Experimental
893 Mode. **Journal of Clinical & Experimental Pathology**, v. 3, n. 02, 2013.
- 894 GUNDOGAN, F., GILLIGAN, F., QI, W., CHEN, E., NARAM, R., DE LA MONTE, S.
895 M. Dose effect of gestational ethanol exposure on placentation and fetal
896 growth. **Placenta**, v. 36, n. 5, p. 523–530, maio 2015.
- 897 GUPTA, K. K., GUPTA, V. K., SHIRASAKA, T. An Update on Fetal Alcohol
898 Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment. **Alcoholism: Clinical and
899 Experimental Research**, v. 40, n. 8, p. 1594–1602, ago. 2016.
- 900 HARDELAND, R., PANDI-PERUMAL, S. R., CARDINALI, D. P. Melatonin. **The
901 International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 3, p. 313–
902 316, mar. 2006.
- 903 HARDELAND, R., POEGGELER, B. Non-vertebrate melatonin: Non-vertebrate
904 melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 4, p. 233–241, 26 mar.
905 2003.
- 906 HELLER, M., BURD, L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination
907 from the fetal compartment: Fetal Alcohol Exposure. **Birth Defects Research
908 Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 4, p. 277–283, abr.
909 2014.
- 910 HELMO, F. R., ETCHEBEHERE, R. M., BERNARDES, N., MEIRELLES, M. F.,
911 PETRINI, C. G., ROCHA, L. P., MONTEIRO, M. L. G. R., GUIMARÃES, C. S.
912 O., TEIXEIRA, V. P. A., REIS, M. A., MACHADO, J. R., CORRÊA, R. R. M.
913 Melatonin Treatment in Fetal and Neonatal Diseases. **Pathology – research
914 and practice**, v. 214, n. 12, p. 1940 - 1951, dez. 2018.

- 915 HENDERSON, G. I., CHEN, J., SCHENKER, S. ETHANOL, Oxidative Stress,
916 Reactive Aldehydes, And The Fetus. **oxidative stress**, p. 10, 15 jun. 1999.
- 917 HINES, R. N., MCCARVER, D. G. The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing
918 Enzymes: Phase I Oxidative Enzymes: Table 1. **Journal of Pharmacology
919 and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 355–360, 1 fev. 2002.
- 920 İNCE, E., CURABEYOĞLU, F., AKYOL, S. Oxidative stress in lymphoid tissues and
921 complement activation in alcoholic mother rats and their newborns. **General
922 physiology and biophysics**, v. 38, n. 01, p. 91–100, 2019.
- 923 JUNG, Y-C., NAMKOONG, K. Alcohol. In: Handbook of Clinical Neurology. [s.l.]:
924 Elsevier, 2014, v. 125, p. 115–121. Disponível em:
925 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444626196000070>>.
- 926 KALISCH-SMITH, J. I., STEANE, S. E., SIMMONS, D. G., PANTALEON, M.,
927 ANDERSON, S. T. Periconceptional Alcohol Exposure Causes Female-
928 specific Perturbations to Trophoblast Differentiation and Placental Formation
929 In The Rat. **Development**, v. 146, n. 11, 1 jun. 2019.
- 930 KESMODEL, U. MODERATE ALCOHOL INTAKE IN PREGNANCY AND THE RISK
931 OF SPONTANEOUS ABORTION. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, n. 1, p.
932 87–92, 1 jan. 2002.
- 933 KWAN, S. T. C., KEZER, C. A., HELFRICH, K. K., SAINI, N., HUEBNER, S. M.,
934 FLENTKE, G. R., KLING, P. J., SMITH, S. M. Maternal iron nutriture
935 modulates placental development in a rat model of fetal alcohol spectrum
936 disorder. **Alcohol**, v. 84, p. 57–66, maio 2020.
- 937 LANOIX, D. Melatonin: The smart killer: The human trophoblast as a model.
938 **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 11, 2012.
- 939 LANOIX, D., LACASSE, A-A., REITER, R. J., VAILLANCOURT, C. Melatonin: The
940 smart killer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 1–11,
941 jan. 2012.
- 942 LANOIX, D., LACASSE, A-A., REITER, R. J., VAILLANCOURT, C. Melatonin: The
943 watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/reoxygenation-
944 induced oxidative stress and apoptosis. **Molecular and Cellular
945 Endocrinology**, v. 381, n. 1–2, p. 35–45, dez. 2013.
- 946 LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters toxic non-oxidative metabolites of ethanol
947 and markers of ethanol intake. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, n. 5, p. e202-
948 217, 2003. Disponível em:
949 <<https://www.bioscience.org/2003/v8/e/931/list.htm>>.
- 950 LE DARÉ, B., LAGENTE, V., GICQUEL, T. Ethanol and its metabolites: update on
951 toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. **Drug Metabolism
952 Reviews**, v. 51, n. 4, p. 545–561, 2 out. 2019.
- 953 LEE, J. Y., LI, S., SHIN, M. E., NA, Q., DONG, J., JIA, B., JONES-BEATTY, K.,
954 MCLANE, M. W., OZEN, M., LEI, J., BURD, I. Melatonin for prevention of
955 placental malperfusion and fetal compromise associated with intrauterine
956 inflammation-induced oxidative stress in a mouse model. **Journal of Pineal
957 Research**, v. 67, n. 3, out. 2019.
- 958 MARIANIAN, A., ATALYAN, A., BOHORA, S., DARENSKAYA, M., GREBENKINA,
959 L., KOLESNIKOVA, L., MIKHAYLEVICH, I., PROTOPOPOVA, N.,

- 960 STOCKETT, M., YAMAOKA, Y., BALACHOVA, T. The effect of low alcohol
961 consumption during pregnancy on the lipid peroxidation-antioxidant defense
962 system of women, their alcohol-exposed infants, and growth, health, and
963 developmental outcomes. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 1, p. 40–53, jan.
964 2020.
- 965 MARSEGLIA, L; D'ANGELO, G; MANTI, S; REITER, R. J; GITTO, E. Potential
966 Utility of Melatonin in Preeclampsia, Intrauterine Fetal Growth Retardation,
967 and Perinatal Asphyxia. **Reproductive Sciences**, v. 23, n. 8, p. 970–977, ago.
968 2016.
- 969 MILCZAREK, R; HALLMANN, A; SOKOLOWSKA, E; KALETHA, K; KLIMEK, J.
970 Melatonin Enhances Antioxidant Action of α -tocopherol and Ascorbate Against
971 NADPH- and Iron-dependent Lipid Peroxidation in Human Placental
972 Mitochondria: Antioxidant Action of Melatonin in Human Placenta. **Journal of**
973 **Pineal Research**, maio 2010.
- 974 MOHAMMED, A. M., HUUSKONEN, P., JUVONEN, R., SAHLMAN, H., REPO, J.,
975 MYOHANEN, K., MYLLYNEN, P., WOO, C-S. J., KARTTUNEN, V.,
976 VAHAKANGAS, K. Activities of metabolizing enzymes in human placenta.
977 **Toxicology Letters**, v. 326, p. 70–77, jun. 2020.
- 978 NAGAI, R., WATANABE, K., WAKATSUKI, A., HAMADA, F., SHINOARA, K.,
979 HAYASHI, Y., IMAMURA, R., FUKAYA, T. Melatonin preserves fetal growth in
980 rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative
981 mitochondrial damage in the placenta. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n.
982 3, p. 271–276, out. 2008.
- 983 NAIK, V. D., LUNDE-YOUNG, E. R., DAVIS-ANDERSON, K. L., ORZABAL, M.,
984 IVANOV, I., RAMADOSS, J. Chronic binge alcohol consumption during
985 pregnancy alters rat maternal uterine artery pressure response. **Alcohol**, v.
986 56, p. 59–64, nov. 2016.
- 987 NOGALES, F., OJEDA, M. L., JOTTY, K., MURILLO, M. L., CARRERAS, O.
988 Maternal ethanol consumption reduces Se antioxidant function in placenta and
989 liver of embryos and breastfeeding pups. **Life Sciences**, v. 190, p. 1–6, dez.
990 2017.
- 991 NORBERG, A., JONES, A. W., HAHN, R. G., GABRIELSSON, J. L. Role of
992 Variability in Explaining Ethanol Pharmacokinetics: Research and Forensic
993 Applications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 1–31, 2003.
994 Disponível em: <[http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342010-](http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342010-00001)
995 [00001](http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342010-00001)>.
- 996 NORDLUND, J. J; LERNER, A. B. The Effects of Oral Melatonin on Skin Color and
997 on the Release of Pituitary Hormones. **The Journal of Clinical**
998 **Endocrinology & Metabolism**, v. 45, n. 4, p. 768–774, out. 1977.
- 999 NWOZO, S., AJAGBE, A., OYINLOYE, B. Hepatoprotective effect of <i>Piper
1000 guineense</i> aqueous extract against ethanol-induced toxicity in male
1001 rats. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 71,
1002 2012.
- 1003 OPIE, L. H., LECOUR, S. Melatonin has multiorgan effects. **European Heart**
1004 **Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy**, v. 2, n. 4, p. 258–265, out.
1005 2016.

- 1006 ORNOY, A., ERGAZ, Z. Alcohol Abuse in Pregnant Women: Effects on the Fetus
1007 and Newborn, Mode of Action and Maternal Treatment. **International Journal**
1008 **of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 2, p. 364–379, 27
1009 jan. 2010.
- 1010 POEGGELER, B., REITER, R. J., TAN, D-X. CHEN, L-D., MANCHESTER, L. C.
1011 Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A
1012 hypothesis. **Journal of Pineal Research**, v. 14, n. 4, p. 151–168, maio 1993.
- 1013 POHANKA, M. Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current
1014 view. **Biomedical Papers**, v. 160, n. 1, p. 54–63, 30 mar. 2016.
- 1015 POPOVA, S., LANGE, S., PROBST, C., GMEL, G., REHM, J. Estimation of
1016 national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and
1017 fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**
1018 **Global Health**, v. 5, n. 3, p. e290–e299, mar. 2017.
- 1019 REITER, R. J., MAYO, J. C., TAN, D-X., SAINZ, R. M., ALATORRE-JIMENEZ, M.,
1020 QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers.
1021 **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, out. 2016.
- 1022 REITER, R. J., TAN, D-X., KORKMAZ, A., ROSALES-CORRAL, S. A. Melatonin
1023 and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal
1024 physiology. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 293–307, 1 mar.
1025 2014.
- 1026 REITER, R. J., TAN, D-X., TAMURA, H., CRUZ, M. H. C., FUENTES-BROTO, L.
1027 Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review.
1028 **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 2, p. 83–89, fev. 2014.
- 1029 REITER, R. J., TAN, D-X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations.
1030 **Physiology**, v. 29, n. 5, p. 325–333, set. 2014.
- 1031 REPO, J., PESONEN, M., MANNELLI, C., VAHAKANGAS, K., LOIKKANEN, J.
1032 Exposure to ethanol and nicotine induces stress responses in human placental
1033 BeWo cells. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 2, p. 264–271, jan. 2014.
- 1034 ROBERTS, G. A. G; TUNSTER, S. J. Characterising the Dynamics of Placental
1035 Glycogen Stores in the Mouse. **Placenta**, v. 99, p. 131 - 140, set. 2020.
- 1036 RUNDIO, A. Understanding Alcoholism. **Nursing Clinics of North America**, v. 48,
1037 n. 3, p. 385–390, set. 2013.
- 1038 SAGRILLO-FAGUNDES, L., ASSUNÇÃO SALUSTIANO, E. M., RUANO, R.,
1039 MARKUS, R. P., VAILLANCOURT, C. Melatonin modulates autophagy and
1040 inflammation protecting human placental trophoblast from
1041 hypoxia/reoxygenation. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 4, p. e12520,
1042 nov. 2018.
- 1043 SALIHU, H. M., KORNOSKY, J. L., LYNCH, O., ALIO, A. P., AUGUST, E. M.,
1044 MARTY, P. J. Impact of prenatal alcohol consumption on placenta-associated
1045 syndromes. **Alcohol**, v. 45, n. 1, p. 73–79, fev. 2011.
- 1046 SCHENKER, S., YANG, Y., PEREZ, A., ACUFF, R. V., PAPAS, A. M.,
1047 HENDERSON, G., LEE, M. P. Antioxidant transport by the human placenta.
1048 **Clinical Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 159–167, ago. 1998.

- 1049 SEBASTIANI, G., BORRÁS-NOVELL, C., CASANOVA, M. A., PASCUAL
1050 TUTUSAUS, M., FERRERO MARTINEZ, S., GÓMEZ ROIG, M. D., GARCÍA-
1051 ALGAR, O. The Effects of Alcohol and Drugs of Abuse on Maternal Nutritional
1052 Profile during Pregnancy. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1008, 2 ago. 2018.
- 1053 SHANMUGAM, S., PATEL, D., WOLPERT, J. M., KESHVANI, C., LIU, X.,
1054 BERGESON, S. E., KIDAMBI, S., MAHIMAINATHAN, L., HENDERSON, G. L.,
1055 NARASIMHAN, M. Ethanol Impairs NRF2/Antioxidant and Growth Signaling in
1056 the Intact Placenta In Vivo and in Human Trophoblasts. **Biomolecules**, v. 9, n.
1057 11, p. 669, 30 out. 2019.
- 1058 SHARMA, A; LACKO, L. A; ARGUETA, L. B; GLENDINNING, M. D; STUHLMANN,
1059 H. miR-126 Regulates Glycogen Trophoblast Proliferation and DNA
1060 Methylation in the Murine Placenta. **Developmental Biology**, v. 449, n. 1, p.
1061 21 - 34, maio 2019.
- 1062 SHIRPOOR, A., GADERI, R., NADERI, R. Ethanol exposure in prenatal and early
1063 postnatal induced cardiac injury in rats: involvement of oxidative stress,
1064 Hsp70, ERK 1/2, JNK, and apoptosis in a 3-month follow-up study. **Cell**
1065 **Stress and Chaperones**, v. 24, p. 10, 2019.
- 1066 SOUSA COELHO, I. D. D., LAPA NETO, C. J. C., SOUZA, T. G. S., SILVA, M. A.,
1067 CHAGAS, C. A., SANTOS, K. R. P., WANDERLEY, T. V., TEIXEIRA, A. A. C.
1068 Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the
1069 genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during
1070 pregnancy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental**
1071 **Mutagenesis**, v. 832–833, p. 52–60, ago. 2018.
- 1072 TAI, M., PISKORSKI, A., KAO, J. C. W., HESS, L. A., M. DE LA MONTE, S.,
1073 GUNDOGAN, F. Placental Morphology in Fetal Alcohol Spectrum Disorders.
1074 **Alcohol and Alcoholism**, v. 52, n.2, p. 138 - 144, 2017.
- 1075 TSENG, A. M., MAHNKE, A. H., WELLS, A. B., SALEM, N. A., ALLAM, A. M.,
1076 ROBERTS, V. HJ., NEWMAN, N., WALTER, N. AR., KROENKE, C. D.,
1077 GRANT, K. A., AKISON, L. K., MORITZ, K. M., CHAMBERTS, C. D.,
1078 MIRANDA, R. C. Maternal circulating miRNAs that predict infant FASD
1079 outcomes influence placental maturation. **Life science alliance**, v. 2, p. 22,
1080 2019.
- 1081 TUNSTER, S. J; WATSON, E. D; FOWDEN, A. L; BURTON, G. J. Placental
1082 Glycogen Stores and Fetal Growth: Insights From Genetic Mouse Models.
1083 **Reproduction**, v. 159, n. 6, p. R213 - R235, jun. 2020.
- 1084 TURAN AKAY, M., ARZU KOÇKAYA, E. The effects of alcohol on rat placenta. **Cell**
1085 **Biochemistry and Function**, v. 23, n. 6, p. 435–445, nov. 2005.
- 1086 UZUN, M., GENCER, M., TURKON, H., OZTOPUZ, R. O., DEMIR, U., OVALI, M.
1087 A. Effects of Melatonin on Blood Pressure, Oxidative Stress and Placental
1088 Expressions of TNFa, IL-6, VEGF and sFlt-1 in RUPP Rat Model of
1089 Preeclampsia. **Archives of Medical Research**, p. 7, 2018.
- 1090 VONGHIA, L., LEGGIO, L., FERRULLI, A., BERTINI, M., GASBARRINI, G.,
1091 ADDOLORATO, G. Acute alcohol intoxication. **European Journal of Internal**
1092 **Medicine**, v. 19, n. 8, p. 561–567, 2008. Disponível em:
1093 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953620508000745>>.

- 1094 WORLD HEALTH ORGANIZATION; MANAGEMENT OF SUBSTANCE ABUSE
1095 TEAM; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol**
1096 **and health 2018.** [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em:
1097 <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/>.
- 1098 YILMAZ, S. GOÇMEN, A. Y; ARIKAN, E. S; AKYUZ, E; TOKPINAR, A; NISARI, M;
1099 UNUR, E; YAY, A. H; YALÇIN, B; YILMAZ, H; ERTEKIN, T; GULER, H;
1100 SABITALIYEVICH, U. Y. The Protective Role of Melatonin Against the Effects
1101 of Different Doses of Caffeine on the Fetus. **Cellular and Molecular Biology**,
1102 v. 66, n. 5, p. 169, 31 jul. 2020.
- 1103 ZELNER, I; KOREN, G. PHARMACOKINETICS OF ETHANOL IN THE
1104 MATERNAL-FETAL UNIT. **Journal of Population Therapeutics & Clinical**
1105 **Pharmacology**, v. 20, p. 7, 2013.