

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

ANTHONY MARCOS GOMES DOS SANTOS

"ATUAÇÃO DA MELATONINA SOBRE RECEPTORES DE ANDRÓGENOS E SEU REFLEXO NA HISTOFISIOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADOLESCENTES INDUZIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO"

RECIFE

1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
2	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
3	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL
4	•
5	ANTHONY MARCOS GOMES DOS SANTOS
6	
7	
8	
9 10	
11	
12 13	"ATUAÇÃO DA MELATONINA SOBRE RECEPTORES DE ANDRÓGENOS E SEU REFLEXO NA HISTOFISIOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADOLESCENTES INDUZIDOS AO ALCOOLISMO
13 14	CRÔNICO"
15	
16 17	
17 18	
19	
20	Dissertação apresentada ao Programa de Pós
21 22	Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito
23	para a obtenção do grau de Mestre em Biociência
24	Animal, Área de Morfofisiologia.
25	
26	Orientador:
27	Prof ^a . Dr ^a . Álvaro Aguiar Coelho Teixeira
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	RECIFE
37	2022

38	
39	ANTHONY MARCOS GOMES DOS SANTOS
40	
41 42 43 44 45	"ATUAÇÃO DA MELATONINA SOBRE RECEPTORES DE ANDRÓGENOS E SEU REFLEXO NA HISTOFISIOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADOLESCENTES INDUZIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO"
46	
47	
48	Comissão Avaliadora:
49	
50	
51	
52	
53	
54	Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE – DMFA
55	Orientador
56	
57	
58	Prof ^a Dr ^a Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE – DMFA
59	Titular
60	
61	
62	
63	Dra Ismaela Maria Ferreira de Melo – UFRPE – DMFA
64	Titular
65	
66	
67	
68	RECIFE
69	2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos orixás, aos bons espíritos e todas as boas vibrações que me ajudaram a concluir este trabalho em meio a uma pandemia. Agradeço imensamente o apoio da minha família: minha mãe Marcia, minha irmã Evellyn, meu cunhado Lucio, meu namorado Jonnas, e meu grande amigo Marcos. Muito obrigado por estarem comigo. A Jonnas deixo meu carinho e meu agradecimento por noite a noite, dia a dia, segurar a minha mão e não me deixar desistir e me impulsionar sempre a fazer o meu melhor. A Marcos que passou por essa caminhada junto comigo, agradeço pelas conversas juntos que sempre aliviaram as tensões do trabalho, pelos chás e pelas risadas. Eu amo vocês.

Faltariam palavras para agradecer aos meus parceiros de caminhada, amigos que me ajudaram no dia a dia no laboratório. Todas as vezes em que pensei que não seria possível concluir experimento no meio de lockdowns em sequência, quantidade de trabalho e as dificuldades do percurso eu me deparei com o apoio e ajuda inestimável dessas pessoas. A Ismaela, Érique, Laís, Aninha, Bruno, Yasmin, Marina, Valeska, Vanessa e a todos que fazem o LABEMOVI meu muito obrigado. Sem vocês esse mestrado não teria chegado ao fim. Serei eternamente grato.

Em especial, deixo meus agradecimentos a Vanessa que se tornou uma amiga muitíssimo querida durante o mestrado e que foi meu apoio emocional, a parceira que aliviava os dias difíceis durante essa caminhada. A Ismaela eu agradeço por toda a calma, paciência e pelos ensinamentos tão valiosos que eu carregarei na minha vida profissional por onde eu esteja. Agradeço também aos meus orientadores, o professor Álvaro e a professora Valéria pelo suporte e por estarem comigo durante esse mestrado atípico. Desde as disciplinas a toda orientação, muito obrigado, professores.

Agradeço a todos os amigos que torceram por mim, se importaram e estiveram presentes durante esse tempo, ouvindo meus desabafos e dizendo que tudo vai ficar bem. A Pablo, Antony, Vick, JJ e Leo, obrigado por serem amigos tão perfeitos. Agradeço também a todos que indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, que torceram por mim e vibraram coisas boas.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal (PPGBA) da UFRPE na pessoa da Professora Tatiana Porto por toda a atenção e suporte. Agradeço aos

101	bioteristas do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) que são agentes
102	essenciais para que a ciência continue caminhando. Agradeço também a todos os técnicos
103	do DMFA e do PPGBA por toda a atenção sempre.
104	Agradeço também a (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
105	Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos.
106	
107	
108	
109	
109	
110	
111	
112	
113	
114	
115	
116	
117	
440	
118	

119	
120	
121	
122	
123	
124	
125	
126	
127	
128	
129	
130	
131	
132	
133	
134	
135	Orí olóore ori jè o (A cabeça do vencedor, vencerá)
136	Oríkì (saudação) a Orí

RESUMO

137 138 139

140

141

142143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153154

155

156

157

158 159

160

161

162

163

164

165

166

167168

169

170

171

172173

A licitude do álcool, fatores culturais e sociais têm normalizado cada vez mais o consumo de álcool por adolescentes. Os indivíduos do sexo masculino são a maioria entre os bebedores ativos, sendo quase o dobro em relação as mulheres que consomem álcool no Brasil. O alcoolismo é uma doença crônica multifatorial caracterizada pelo consumo continuo de álcool. Tal doença traz diversos efeitos a saúde física e mental especialmente durante a adolescência, onde diversos processos fisiológicos de maturação acontecem. O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da administração de melatonina exógena sobre receptores de andrógeno, aspectos morfométricos, hormonais e imunohistoquímicos nos testículos de ratos jovens induzidos ao alcoolismo crônico. Foram utilizados 30 ratos Wistar com 40 dias de idade, divididos nos seguintes grupos: I: (controle): ratos sem tratamento com álcool; II: ratos submetidos ao consumo crônico de solução hidroalcoólica a 25%; III: ratos submetidos ao consumo crônico de solução hidroalcoólica a 25% e tratados simultaneamente com melatonina. A indução ao alcoolismo foi feita utilizando o modelo de consumo semivoluntário de etanol, onde a única dieta líquida disponível é solução hidroalcoólica a 25%. Os animais do grupo II e III passaram por um período de adaptação de quatro semanas onde foi oferecida solução hidroalcóolica em concentrações crescentes de álcool (5, 10, 15 e 20%). Ao final do período de adaptação, receberam solução hidroalcoólica a 25% durante o período 8 semanas. A melatonina foi administrada via intraperitoneal, numa dose de 10 mg/kg da quinta semana à oitava semana do experimento apenas para o grupo III. Os testículos dos animais foram submetidos a análises histopatológicas, hormonais, morfométricas e imunohistoquímicas para receptor de andrógeno. As dosagens hormonais revelaram redução significativa da testosterona sérica nos animais do grupo álcool, quando comparado aos demais grupos experimentais. A análise histopatológica dos testículos dos animais do grupo II apresentou desorganização do epitélio seminífero adquirido um aspecto de degeneração tecidual, enquanto o grupo III apresentou epitélio seminífero íntegro com elementos celulares bem definidos. Houve redução do peso corporal, dos testículos e do índice organossomático nos animais que receberam álcool em relação ao controle e os que foram tratados com melatonina. Os receptores de andrógeno apresentaram marcação positiva nas células do testículo dos animais do grupo III, tal como no controle. O grupo II apresentou menor porcentagem de células marcadas em comparação aos demais grupos, o que sugere o potencial protetor da melatonina contra os efeitos deletérios do alcoolismo crônico nos testículos de ratos adolescentes. Concluímos que a administração de melatonina em etilistas crônicos adolescentes pode auxiliar na manutenção da saúde dos testículos, melhorando parâmetros hormonais, morfológicos, histopatológicos e a expressão de receptores de andrógenos.

174 175 176

PALVRAS-CHAVE: Alcoolismo; testículos, melatonina, reprodução, ratos Wistar.

177178

179

180

ABSTRACT

183 184 185

186

187

188

189

190

191

192

193 194

195 196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209 210

211

212213

214

215

216

217

The legality of alcohol, cultural and social factors have increasingly normalized alcohol consumption by adolescents. Males are the majority among active drinkers, almost twice as many as women who consume alcohol in Brazil. Alcoholism is a multifactorial chronic disease characterized by the continuous consumption of alcohol. This disease has several effects on physical and mental health, especially during adolescence, where several physiological processes of maturation take place. The present study aimed to analyze the effects of exogenous melatonin administration on androgen receptors, morphometric, hormonal and immunohistochemical aspects in the testes of young rats induced by chronic alcoholism. Thirty 40-day-old Wistar rats were used, divided into the following groups: I: (control): rats without alcohol treatment; II: rats submitted to chronic consumption of 25% hydroalcoholic solution; III: rats submitted to chronic consumption of 25% hydroalcoholic solution and treated simultaneously with melatonin. Induction of alcoholism was performed using the model of semi-voluntary ethanol consumption, where the only available liquid diet is a 25% hydroalcoholic solution. The animals in groups II and III underwent an adaptation period of four weeks where they were offered a hydroalcoholic solution in increasing concentrations of alcohol (5, 10, 15 and 20%). At the end of the adaptation period, they received a 25% hydroalcoholic solution for 8 weeks. Melatonin was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg from the fifth to eighth week of the experiment only for group III. The testes of the animals were submitted to histopathological, hormonal, morphometric and immunohistochemical analysis for androgen receptor. Hormonal dosages revealed a significant reduction in serum testosterone in the animals in the alcohol group, when compared to the other experimental groups. The histopathological analysis of the testes of the animals of group II showed disorganization of the seminiferous epithelium, acquired an aspect of tissue degeneration, while group III presented intact seminiferous epithelium with well-defined cellular elements. There was a reduction in body weight, testes and organosomatic index in animals that received alcohol compared to control and those treated with melatonin. Androgen receptors showed positive labeling in testis cells of group III animals, as in the control. Group II had a lower percentage of labeled cells compared to the other groups, which suggests the protective potential of melatonin against the deleterious effects of chronic alcoholism in the testes of adolescent rats. We conclude that the administration of melatonin in adolescent chronic alcoholics can help in the maintenance of testis health, improving hormonal, morphological, histopathological parameters and the expression of androgen receptors.

218219220

KEYWORDS: Alcoholism; testes, melatonin, reproduction, Wistar rats.

221 222

223224

225

226 227

229 SUMÁRIO

230		
231	RESUMO	7
232	ABSTRACT	8
233	LISTA DE FIGURAS	11
234	LISTA DE TABELAS	12
235	LISTA DE ABREVIATURAS	13
236	CAPÍTULO 1	14
237 238	Potencial terapêutico da melatonina sobre os efeitos adversos causados pelo alcoo	
239	RESUMO	18
240	ABSTRACT	18
241	MATERIAL E MÉTODOS	19
242	1. INTRODUÇÃO	20
243 244	2. MELATONINA E CONSUMO DE ÁLCOOL DURANTE A GESTAÇÃO: EFEITOS NA PROLE	
245	3.1 EFEITOS DA MELATONINA NO FÍGADO DE ETILISTAS	22
246	3.2 EFEITOS DA MELATONINA NO CÉREBRO DE ETILISTAS	23
247	3.3 EFEITOS DA MELATONINA NO RIM DE ETILISTAS	24
248	3.4 EFEITOS DA MELATONINA NO CORAÇÃO DE ETILISTAS	25
249 250	3.5 PERFIL HEMATOLÓGICO, CONSUMO DE ÁLCOOL E TRATAMEN COM MELATONINA	
251 252	3.6 MELATONINA, MEMBRANAS BIOLÓGICAS E CONSUMO DE ÁLC	OOL
253	3.7 EFEITOS DA MELATONINA NO OVÁRIO DE ETILISTAS	
254	4. DISCUSSÃO	26
255	5. CONCLUSÃO	28
256	6. REFERÊNCIAS	28
257	CAPÍTULO 2	35
258 259	Aspectos morfométricos, imunohistoquímicos e hormonais dos testículos de ratos induzidos ao alcoolismo crônico e tratados com melatonina	35
260	1. INTRODUÇÃO	36
261	2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
262	2.1 Indução ao alcoolismo e tratamento com melatonina	37

263	2.2 Dosagem hormonal	38
264	2.3 Histopatologia	39
265	2.4 Índice organossomático	39
266	2.5 Morfometria	40
267	2.6 Imunohistoquímica (receptor de andrógeno)	40
268	2.7 Análise estatística	41
269	3. RESULTADOS	41
270	4. DISCUSSÃO	50
271	5. CONCLUSÃO	52
272	5. REFERÊNCIAS	53
273		
274		
275		
275		
276		
277		
278		
2,0		
279		
280		
281		
282		
283		

284	LISTA DE FIGURAS
285 286	Capítulo II
287 288 289 290	Figura 1: Linha do tempo da indução ao alcoolismo utilizando o modelo de consumo semivoluntário de etanol39
291 292 293	Figura 2: Níveis de testosterona nos animais dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer (P>0,05)40
294 295 296 297	Figura 3: Fotomicrografia dos testículos dos animais dos grupos experimentais. A-B controle; C-D Álcool e E-F Álcool + Mel. H.E. Setas curtas – espermátides; Setas longas – espermatócitos; Espm – Espermátides; Esp – Espermatozoides — 41
298 299 300	Figura 4: Imunohistoquímica para receptor de andrógeno nos testículos dos animais dos grupos experimentais. A) Controle; B) Álcool e C) Álcool + Mel. D) Percentual de receptores
301	
302 303	
304	
305	
306 307	
308	
309	
310	
311 312	
313	
314	
315	
316	
317 318	
319	
320	
321	
322	
323	

324	LISTA DE TABELAS
325	
326	Capítulo II
327	
328	Tabela 1. Médias dos dados morfométricos dos testículos dos animais dos grupo
329	experimentais42
330	
331	
332	
333	
334	
335	
336	
337	
338	
339	
340	
341	
342	
343	
344	
345	
346	
347	
348	
349	
350	
351	
352	
353	
354	
355	
356	
357	
358	
359	
360	

361 362	LISTA DE ABREVIATURAS
363	EROS – Espécies reativas de oxigênio
364	MEL - Melatonina
365	CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
366	UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
367	CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
368	H. E - Coloração de hematoxilina e eosina
369	ELISA - Enzyme Linked Immunosorbet Assay
370	
371	
372	
373	
374	
375	
376	
377	
378	
379	
380	
381	
382	
383	
384	
385	
386	
387	
388	

CAPÍTULO I

DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do nosso Conselho Editorial, o artigo intitulado "POTENCIAL TERAPÉUTICO DA MELATONINA SOBRE OS EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS PELO ALCOOLISMO" de autoria de "ANTHONY MARCOS GOMES DOS SANTOS, MARIA VANESSA DA SILVA, ÉRIQUE RICARDO ALVES, LAÍS CAROLINE DA SILVA SANTOS, ANA CLÁUDIA CARVALHO DE SOUSA, BRUNO JOSÉ DO NASCIMENTO, YASMIM BARBOSA DOS SANTOS, VALÉRIA WANDERLEY TEIXEIRA, ÁLVARO AGUIAR COELHO TEIXEIRA", foi aprovado e publicado no livro eletrônico "Ciências da saúde: pluralidade dos aspectos que interferem na saúde humana 5", sob ISBN 978-65-5983-479-2 e DOI 10.22533/at.ed.79221130910.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pela publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 01 de fevereiro de 2022.

Prof.® Dr.® Antonella Carvalho de Oliveira Editora Chefe ATENA EDITORA PREFIXO DOI 10.22533 PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243 Certificado digitalmente por Atena Edição de Livros



Rua jacob Nadal, 57, jardim Carvalho PONTA GROSSA - PR - CEP. 84016-220

392	POTENCIAL TERAPÊUTICO DA MELATONINA SOBRE OS EFEITOS
393	ADVERSOS CAUSADOS PELO ALCOOLISMO
394	THERAPEUTIC POTENTIAL OF MELATONIN ON ADVERSE
395	EFFECTS CAUSED BY ALCOHOLISM
396 397	Primeiro Autor, Anthony Marcos Gomes dos Santos
398	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
399	Animal
400	Recife-PE
401	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/4572948318160798
402	Segundo Autor, Maria Vanessa da Silva
403	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
404	Animal
405	Recife-PE
406	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/1906334502843226
407	Terceiro Autor, Érique Ricardo Alves
408	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
409	Animal
410	Recife-PE
411	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/6892417222004207
412	Quarto Autor, Laís Caroline da Silva Santos
413	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
414	Animal
415	Recife-PE

416	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/1405150136250676
417	Quinto Autor, Ana Cláudia Carvalho de Sousa
418	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
419	Animal
420	Recife-PE
421	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/9480535998642741
422	Sexto Autor, Bruno José do Nascimento
423	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
424	Animal
425	Recife-PE
426	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/8213260513385508
427	Sétimo Autor, Yasmim Barbosa dos Santos
428 429	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
430	Animal
431	Recife-PE
432	Link do lattes: http://lattes.cnpq.br/1783975917572458
433 434	Oitavo Autor, Valéria Wanderley Teixeira
435	Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
436	Animal
437	Recife-PE
438	Orcid: 0000-0001-9533-5476
439	Nono Autor, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

440 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

441 Animal

442 Recife-PE

Orcid: 0000-0001-5940-9220

444 445

443

Data de submissão: 09/07/2021

446 **RESUMO:** O alcoolismo é uma doença crônica multifatorial causada pelo consumo contínuo de álcool, sendo considerado um problema de saúde pública emergente. As 447 448 alterações fisiológicas decorrentes desta enfermidade têm sua patogênese mediada pelo 449 estresse oxidativo. Suas moléculas têm a capacidade de promover danos estruturais a diversos órgãos, podendo levar a morte celular, necrose e perca ou declínio de suas 450 funções. A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal possui alto poder 451 452 antioxidante e tem sido investigada terapeuticamente no tratamento de diversas doenças 453 crônicas. Ela ainda possui importante ação imunomoduladora e anti-inflamatória, o que auxilia no controle e atenuação dos efeitos causados pelo estresse oxidativo a nível celular 454 455 e tecidual. O presente trabalho teve por objetivo fazer uma revisão de literatura sobre o 456 potencial terapêutico da melatonina nos tratamentos causados pelo consumo crônico de 457 álcool. Para isso, foi utilizado trabalhos nas plataformas PubMed, Scielo, Science Direct, Scopu, Google Acadêmico e Web of Science. Um total de 223 artigos foram selecionados 458 dessas bases de dados, as buscas foram realizadas utilizando os seguintes termos: 459 460 "alcoholism and melatonin", "melatonin and ethanol", melatonin and chronic ethanol consumption", "melatonin and ethanol exposure", "melatonin and acute ethanol 461 ingestion". A literatura atesta o potencial terapêutico da melatonina na redução dos danos 462 463 causados em vários órgãos e sistemas. No entanto a ausência de desenhos experimentais homogêneos e de estudos mais detalhados da relação melatonina-alcoolismo-órgão
 mostra a necessidade de mais investigação sobre a temática.

PALAVRAS-CHAVE: Alcoolismo; Antioxidantes; Melatonina; Estresse Oxidativo.

466

467 468 **ABSTRACT:** Alcoholism is a multifactorial chronic disease caused by the continuous 469 consumption of alcohol, being considered an emerging public health problem. The pathogenesis of physiological changes resulting from this disease is mediated by 470 471 oxidative stress. Its molecules have the ability to promote structural damage to various organs, which can lead to cell death, necrosis and loss or decline of their functions. 472 473 Melatonin, a hormone produced by the pineal gland, has a high antioxidant power and has been investigated therapeutically in the treatment of several chronic diseases. It also 474 475 has an important immunomodulatory and anti-inflammatory action, which helps to 476 control and mitigate the effects caused by oxidative stress at the cellular and tissue level. 477 This study aimed to review the literature on the therapeutic potential of melatonin in treatments caused by chronic alcohol consumption. For this, works on the platforms 478 479 PubMed, Scielo, Science Direct, Scopu, Academic Google and Web of Science were used. A total of 223 articles were selected from these databases, searches were performed 480 481 using the following terms: "alcoholism and melatonin", "melatonin and ethanol", melatonin and chronic ethanol consumption", "melatonin and ethanol exposure", 482 "melatonin and acute ethanol ingestion". The literature attests to the therapeutic potential 483 484 of melatonin in reducing damage caused to various organs and systems. However, the absence of homogeneous experimental designs and more detailed studies of the 485 relationship between melatonin-alcoholism-organ shows the need for further 486 487 investigation on the subject.

KEYWORDS: Alcoholism; Antioxidants; Melatonin; Oxidative Stress.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foi realizado uma revisão de literatura, para isso, foi utilizado trabalhos nas plataformas PubMed, Scielo, Science Direct, Scopu, Google Acadêmico e Web of Science. Tais trabalhos foram incluídos de acordo com o cumprimento dos critérios de elegibilidade. Um total de 223 artigos foram selecionados dessas bases de dados, as buscas foram realizadas utilizando os seguintes termos: "alcoholism and melatonin", "melatonin and ethanol", melatonin and chronic ethanol consumption", "melatonin and ethanol exposure", "melatonin and acute ethanol ingestion". Termos relacionados ao tipo de estudo foram adicionados posteriormente como "rats", "mice". Nenhuma restrição de linguagem ou de tempo foi aplicada. Toda estratégia de busca foi revisada com o auxílio do Peer Review of Electronic Search Strategies (PRESS).

1. INTRODUÇÃO

Alcoolismo é uma doença crônica multifatorial causada pelo consumo contínuo de álcool sendo considerado um problema de saúde pública emergente (WORLD HEALTH ASSOCIATION, 2018). Tal condição atinge pessoas em diferentes classes sociais, idade e gênero, causando consequências sociais, morais, psicológicas, econômicas e fisiológicas, aumentando os níveis de morbidade e mortalidade mundialmente. (LE BERRE, 2017; REHM; IMTIAZ, 2016). Além disso, tal distúrbio está relacionado com diversas alterações no sistema gastrointestinal, cardiovascular, reprodutor, nervoso e imunológico. (POLSKY, 2017; KIM, 2019).

As alterações fisiológicas têm sua patogênese mediada pelo estresse oxidativo (DAS, 2007). Esse quadro é mediado pela formação de moléculas reativas de oxigênio (ROS) durante o metabolismo do etanol, que gera um metabólito secundário tóxico, o acetaldeído (CEDERBAUM, 2019). Essas moléculas promovem danos a diversas estruturas como proteínas e lipídeos e ainda promovem a mobilização de citocinas pró inflamatórias, podendo levar a morte celular, necrose e perca ou declínio da função do órgão (GOULART, 2015; ZHU, 2019).

Tratamento com antioxidantes tem demonstrado efeitos protetores e reversivos causados pelo alcoolismo nos diferentes órgãos (AL-QURAISHY, 2017; BJØRKHAUG, 2020; CANTACORPS, 2020; WANG, 2020). A melatonina é o principal hormônio da glândula pineal (TAMURA, 2014), ela atua principalmente no controle do ciclo circadiano, mas também tem papel em diversos sistemas orgânicos, possuindo alto poder antioxidante (LEIBOWITZ, 2008; NDUHIRABANDI, 2011; RAHMAN, 2017; ALVES, 2020).

Diante disso, o presente trabalho traz uma revisão sistemática da literatura sobre o potencial terapêutico da melatonina nos tratamentos dos efeitos deletérios causados pelo alcoolismo.

2. MELATONINA E CONSUMO DE ÁLCOOL DURANTE A GESTAÇÃO: EFEITOS NA PROLE

Filhotes nascidos de mães que consumiram álcool na gestação apresentam capacidade motora reduzida, e alterações comportamentais e cognitivas. A capacidade motora de filhotes de mães que consumiram álcool durante a gestação e tratadas com melatonina foi significantemente maior que a dos filhotes que nascidos de mães sem tratamento nos estudos de Bagheri *et al.* (2015). A densidade de células de Purkinje

apresentou números muito próximos entre grupos controle, tratados apenas com melatonina e etilista mais tratamento com melatonina. O grupo etanol sem tratamento apresentou uma significante diminuição quando comparado aos demais grupos. Além disso, a administração desse hormônio melhorou os números das defesas antioxidantes mensuradas através da avaliação dos níveis da enzima superóxido dismutase quando comparada com o grupo etanol sem tratamento, além da diminuição dos índices de peroxidação lipídicas.

Coelho e colaboradores (2018) mostraram que a melatonina administrada durante a gestação em mães alcoólatras pode prevenir contra prejuízos genéticos e citotoxicidade causadas pelo alcoolismo na prole. Através de ensaio cometa e teste de micronúcleo, os autores conseguiram mensurar os danos causados pelo alcoolismo no cérebro, fígado e células sanguíneas da prole O trabalho traz resultados diferentes para doses de 10mg/kg e 15mg/kg de melatonina e também entre machos e fêmeas.

Nos filhotes machos, o alcoolismo não formou micronúcleos estatisticamente significantes nas células sanguíneas. Apenas o tratamento com a dose de 15 mg/kg diminuiu as porcentagens e frequência de dano ao material genética analisado através de ensaio cometa nesse tipo celular. A melatonina em ambas as doses também promoveu melhorias significativas no fígado quando comparada com o grupo etanol sem tratamento, mas nenhuma dose trouxe resultados protetivos no cérebro dos filhotes machos. Já nas fêmeas, as duas doses de melatonina trouxeram resultados positivos nas células do cérebro e sangue, mas não do fígado.

3.1 EFEITOS DA MELATONINA NO FÍGADO DE ETILISTAS

Ullah *et al.* (2020), Mishra, Paul, Swarnakar (2011) e Hu *et al.* (2009) mostraram melhoria dos aspectos funcionais hepáticos em animais que consumiram álcool e foram

tratados com melatonina quando comparado aos que consumiram álcool e não tiveram tratamentos. Os níveis de enzimas hepáticas (ALT, AST, TGP) se apresentaram próximos do controle, o que indica uma redução da lesão hepática causada pelo álcool. Os mesmos trabalhos juntamente com o de Kurhaluk *et al.* (2017) relataram o potencial antioxidante da melatonina, através da redução de marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA) e níveis de peroxidação lipídica (LPO), os quais apresentaram melhoria dos números nos grupos que consumiram álcool mais tratamento com melatonina em comparação com os que consumiram apenas álcool.

Alterações na forma, tamanho, natureza eosinófila ou basófila no núcleo e vacuolização foram encontradas nas células hepáticas do grupo que recebeu apenas álcool. A histologia do fígado se manteve preservada, semelhante ao grupo controle no grupo álcool com melatonina em comparação com o grupo que recebeu apenas álcool (Ullah *et al.*, 2020). O mesmo trabalho mostra a diminuição de fatores apoptóticos, citocinas pró inflamatórias e o aumento de enzimas antioxidantes no tecido hepático do grupo que recebeu álcool e tratamento com melatonina quando comparado ao grupo que recebeu apenas álcool. Hu *et al.* (2009) e Kurhaluk *et al.* (2017) também mostraram aumento de enzimas antioxidantes nos mesmos grupos.

Mishra *et al.* (2011) mostrou que animais que consumiram álcool tiveram alterações na matriz extracelular do tecido hepático, mediadas principalmente pelas enzimas metaloproteinases. Essas enzimas refletem o nível elevado de citocinas pró inflamatórios, o que retratam o acontecimento de um processo degradativo naquele tecido. A expressão das metaloproteinases mostrou-se elevada nesse grupo. O tratamento com melatonina em animais que consumiram álcool reduziu não só o nível das citocinas

pró inflamatórias como regulou a expressão das metaloproteinases. Essa comprovação foi feita através de técnicas histológicas, bioquímicas e moleculares.

3.2 EFEITOS DA MELATONINA NO CÉREBRO DE ETILISTAS

O consumo de álcool pode afetar o desenvolvimento saudável do cérebro, diminuindo o peso total e do prosencéfalo, cerebelo e tronco cerebral separadamente (GRISEL; CHEN, 2009). Essa diminuição do órgão não apresenta relação com o peso do corpo, o que descaracterizaria microcefalia. O tratamento com melatonina não trouxe alterações significantes quando comparado com o grupo etilista. A densidade das células de purkinje também foi reduzida e sem alterações quando presente o tratamento com melatonina nos animais que consumiram álcool, assim como no estudo de Edwards e colaboradores (2002).

Testes para avaliar a capacidade de aprendizado e memória foram realizados por Dwivedi *et al.* (2018) e mostraram que em animais que receberam álcool mais tratamento com melatonina tiveram números mais parecidos com o do controle quando comparados com o grupo álcool sem tratamento. Baydas e Tuzcu (2005) relataram que o tratamento com melatonina melhora a memória e o aprendizado com mais impacto em ratos idosos em relação a ratos jovens. O estudo também mostrou regulação na expressão dos genes relacionados ao funcionamento do hipocampo de animais alcoolistas tratados com melatonina em comparação com animais alcoolistas sem tratamento, os quais apresentaram além de alteração na expressão gênica alteração na atividade de enzimas como a acetilcolinesterase.

O tratamento com melatonina em animais que consumiram álcool também mostrou diminuir o estresse oxidativo e aumentar as defesas antioxidantes no cérebro. Níveis de LPO e MDA diminuíram em animais tratados com álcool e melatonina em

comparação com os que receberam apenas álcool, não só numa contagem total do cérebro quanto no hipocampo, córtex e cerebelo separadamente (BAYDAS; TUZCU, 2005; ELSOKKARY *et al.*, 1999). Já as defesas antioxidantes (níveis de glutationa) aumentaram nos animais tratados com melatonina em comparação com não tratados (BAYDAS; TUZCU, 2005).

3.3 EFEITOS DA MELATONINA NO RIM DE ETILISTAS

Os níveis de MDA diminuíram e superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) aumentaram em animais que receberam melatonina como tratamento para efeitos do consumo de álcool quando comparado aos que não receberam tratamento (SÖNMEZ *et al.*, 2012). Já Kurhaluk e Tkachenko (2020) não encontrou diferença estatística na produção de SOD quando comparados os tratamentos, embora corrobore nos níveis de CAT, glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) em um nível menor.

Níveis de oxido nítrico foram encontrados reduzidos em animais etilistas sem tratamento, quando comparados aos grupos controle e álcool mais tratamento com melatonina. Corpúsculos polares atrofiados, dilatação e congestão de vasos peritubulares, corpúsculo renal com espaço de Bowman escurecido foram observados nos grupos álcool e álcool com melatonina (SÖNMEZ *et al.*, 2012).

3.4 EFEITOS DA MELATONINA NO CORAÇÃO DE ETILISTAS

Imunorreatividade para óxido nítrico foi menor no tecido cardíaco de animais etilistas tratados com melatonina quando comparados com os etilistas não tratados. A distribuição dessa reatividade foi heterogênea em ambos os grupos e não houve diferença quando comparada com o controle. O grupo etilista sem tratamento mostrou alterações no tecido como sinais de hemorragia, infiltração de células mononucleadas, obstrução de vasos, eosinofilia no citoplasma de algumas células e degradação de cardiomiócitos.

629	Congestão e hemorragia também foram visto no grupo etilista tratado com melatonina,
630	enquanto a infiltração de células mononucleadas não foi evidente ((SÖNMEZ et al.,
631	2009)
632	Níveis de MDA, CAT e SOD encontraram-se elevados no grupo de animais
633	etilistas sem tratamento quando comparado com o controle. O tratamento com melatonina
634	não teve alterações significativas. Já os níveis de LPO tiveram redução significativa com
635	o tratamento, tanto no coração como também no pulmão (SÖNMEZ et al., 2009;
636	SOKKARY et al.,1999)
637	3.5 PERFIL HEMATOLÓGICO, CONSUMO DE ÁLCOOL E TRATAMENTO
638	COM MELATONINA
639	Animais que receberam tratamento apenas com álcool apresentaram uma
640	contagem elevada de células brancas do sangue, especialmente neutrófilos. Tratamento
641	com melatonina reduziu a contagem celular quando comparado com o grupo tratado
642	apenas com álcool, especialmente neutrófilos e linfócitos e aumentou a distribuição da
643	largura das células vermelhas e o volume corpuscular principal (KURHALUK et al.,
644	2017).
645	3.6 MELATONINA, MEMBRANAS BIOLÓGICAS E CONSUMO DE ÁLCOOL
646	A atividade da NA+K+ATPase mostrou-se reduzida entre 24% e 40% em animais
647	que consumiram álcool. Quando tratados com melatonina, os números não diferiram do
648	grupo controle (ÖNER et al., 2002)
649	3.7 EFEITOS DA MELATONINA NOS OVÁRIOS DE ETILISTAS
650	Alterações anormais no ciclo estral de ratas nos grupos alcoólatras e alcoólatras

tratados com melatonina foram detectadas, especialmente prolongamentos do diestro e

metaestro. Nenhum ciclo anovulatório foi relatado. O peso dos ovários e das tubas uterinas diminuiu tanto nos grupos tratados com melatonina quanto nos alcoólatras que não receberam tratamentos quando comparados com o controle (CHUFFA *et al.*, 2013). A atividade da catalase também não apresentou diferença estatística.

3. DISCUSSÃO

O relatório global sobre álcool e saúde (OMS, 2018) diz que 44,8% da população é bebedora ativa, com uma média de consumo per capta de 6,4 litros. O etanol rapidamente atravessa as membranas e por isso consegue facilmente atingir diversos órgãos e sistema dos organismos (ARAÚJO-FILHO, *et al.*, 2007). As alterações fisiológicas mais comuns incluem distúrbios de sono, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, alterações pulmonares, cardiovasculares e imunológicas. Em gestante, o álcool ocasiona efeitos teratogênico, e má formação placentária e congênitas (QUEIROZ, 2016).

A melatonina exerce um papel importante como antioxidante, estimulando as defesas oxidativas e atuando como sequestradora de radicais livres (ALVES *et al.*, 2020). Além disso, o hormônio é modulador de atividades metabólicas, reprodutivas e imunológicas, especialmente por sua ação anti-inflamatória (FAVERO *et al.*, 2017). A utilização da melatonina em diversas doenças crônicas, sozinha e em associação, e de caráter inflamatório vem sido estudada e já apresenta resultados positivos e promissores acerca da sua utilização como recurso terapêutico e/ou preventivo (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2020).

Poucos estudos associam a melatonina no tratamento das diversas patologias relacionadas ao alcoolismo ou até mesmo sua utilização de forma preventiva. O fato do álcool ser uma droga lícita na maioria dos países e de seu consumo ser considerado natural

e "saudável" em diversas esferas pode ser um dos fatores que levam ao não desenvolvimento de estratégias fortes e eficazes de redução de danos (PORTO *et al.*, 2018). Diante disso, é reforçada a importância e necessidade de estudos da melatonina no auxílio na mitigação dos efeitos decorrentes do consumo do álcool que pode, consequentemente, refletir também nos efeitos sociais, financeiros, políticos, psicológicos e todos os outros afetados pelo etilismo (VALENTIM, 2017).

Alguns trabalhos lidos no processo de busca avaliaram o efeito do consumo de álcool na produção de melatonina diária e morfologia da pineal (MARTINEZ-SALVADOR *et al.*, 2018). Etilistas crônicos frequentemente tem distúrbios de sono, o que aumenta também o padrão de consumo de álcool e favorece o enfraquecimento de outros sistemas (MEYREL *et al.*, 2020). Isso aponta um potencial multialvo na utilização da melatonina, pois a mesma é o principal hormônio responsável no ciclo circadiano e poderia ajudar na correção dos problemas de sono além de exercer sua função antioxidante e anti-inflamatória (KURHALUK; TKACHENKO, 2020).

Poucos trabalhos utilizam a melatonina no tratamento de distúrbios de sono em etilistas, embora exista uma quantidade relevante de trabalhos que elucidam o padrão de secreção do hormônio na mesma população (ARNEDT *et al.*, 2007). Nenhum estudo avaliou, ao mesmo tempo, os padrões de sono e antioxidantes mediante tratamento de melatonina em alcoólatras.

Embora com resultados parecidos os resultados dos trabalhos incluídos na revisão, (salvo as exceções), os desenhos experimentais, incluindo dose e concentração do etanol, período de exposição, e dose de melatonina foram bastante heterogêneos entre os estudos. O protocolo de exposição ao álcool, tal como dose e período podem ser parâmetros

influentes nos mecanismos de estudo da patogênese do consumo de álcool em diferentes intensidades. Tomando conta de que a forma que o álcool afeta o organismo também depende de outros fatores (genéticos, ambientais, etc.), a revisão abre uma discussão sobre a possível necessidade (ou não) de um protocolo experimental homogêneo para que se possa comparar de fato diferentes tipos de resultado, com diferentes doses e formas de exposição, de um ponto de vista mais imparcial.

A embasar a possível necessidade de uma homogeneização, alguns resultados encontrados na revisão são controversos e outros tem influência negativa. Sönmez *et al* (2012) mostrou que os níveis de SOD diminuíram nos rins de animais etilistas que receberam melatonina comparados com os etilistas sem tratamento, enquanto Kurhaluk *et al* (2017) não encontrou alterações nesse parâmetro no mesmo órgão, mas encontrou ao analisar os níveis de CAT, glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR). Já Chuffa *et al* (2011) mostrou que a melatonina influenciou negativamente os parâmetros bioquímicos e morfológico do ovário de ratas induzidas ao alcoolismo crônico quando comparadas com o controle, o que choca com as informações de Tamura *et al* (2014) e De Albuquerque *et al* (2020) acerca das influencias da melatonina no sistema reprodutor feminino com e sem a presença de patologias associadas. Tais alterações refletem a ausência de um delineamento experimental unificado e fidedigno ao modelo de patogênese do problema estudado, o que não permite que se encontrem as lacunas no processo de tratamento e que se elucidem seus mecanismos fisiológicos, bioquímicos, e moleculares que podem ajudar no tratamento de outras doenças.

4. CONCLUSÃO

A melatonina desempenha um potencial protetor e terapêutico no tratamento de efeitos decorrentes do consumo de álcool em diversos órgãos, processos e estruturas.

Contudo, a ausência de desenhos experimentais homogêneos impede que se tenha conhecimento total da forma que o hormônio interage com os diversos órgãos, moléculas e tecidos em paralelo com a exposição ao etanol. Isso também dificulta a associação da melatonina com outros fármacos e moléculas que possuem seu potencial comprovado, e impedindo assim em parte o progresso na inovação terapêutica no tratamento e prevenção de uma problemática real e atual, protegida culturalmente nos mais diversos países. Tais estudos, realizados a partir de um desenho experimental que permita responder as perguntas dos mais diversos campos da saúde os quais o consumo de álcool dialoga, especialmente utilizando melatonina com todo seu potencial, podem e devem se tornar uteis e promover mais qualidade de vida, respeitando os aspectos fisiológicos, sociais e culturais incluídos no processo.

734

735

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

5. REFERÊNCIAS

- 736 AL-QURAISHY, S. et al. Olive (Olea European) leaf methanolic extract prevents
- 737 HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting
- antioxidant enzyme activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 338-349,
- 739 2017.
- 740 ALVES, E. R. et al. Protective action of melatonin on diabetic rat testis at cellular,
- hormonal and immunohistochemical levels. **Acta Histochemica**, v. 122, n. 5, p. 151559,
- 742 2020.
- ARAÚJO-FILHO, J. L. S. *et al.* Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos
- indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. 2007.

- 745 ARNEDT, J. T et al. Treatment options for sleep disturbances during alcohol
- recovery. **Journal of addictive diseases**, v. 26, n. 4, p. 41-54, 2007.
- 747 BAGHERI, F. et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol
- administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. **Behavioural**
- **Brain Research**, v. 287, p. 215-225, 2015.
- 750 BAYDAS, G.; TUZCU, M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced
- 751 reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. Experimental
- **neurology**, v. 194, n. 1, p. 175-181, 2005.
- 753 BJØRKHAUG, S. T. et al. Plasma cytokine levels in patients with chronic alcohol
- overconsumption: relations to gut microbiota markers and clinical correlates. **Alcohol**, v.
- 755 85, p. 35-40, 2020.
- 756 CANTACORPS, L.; MONTAGUD-ROMERO, S.; VALVERDE, O. Curcumin
- 757 treatment attenuates alcohol-induced alterations in a mouse model of foetal alcohol
- 758 spectrum disorders. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological
- **Psychiatry**, p. 109899, 2020.
- 760 CEDERBAUM, Arthur I. Alcohol metabolism. Clinics in liver disease, v. 16, n. 4, p.
- 761 667-685, 2012.
- 762 CHUFFA, L. G. A. et al. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on
- circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in
- the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. **Reproductive Toxicology**, v. 39, p. 40-49,
- 765 2013.
- 766 CHUFFA, L. G. A. et al. Long-term exogenous melatonin treatment modulates overall
- 767 feed efficiency and protects ovarian tissue against injuries caused by ethanol-induced

- oxidative stress in adult UChB rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research,
- 769 v. 35, n. 8, p. 1498-1508, 2011.
- 770 DE ALBUQUERQUE, et al. Effect of melatonin on gonad and thyroid development of
- offspring of hypothyroid pregnant rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 95, n. 7, p. 1-
- 772 10, 2020.
- 773 COELHO, I. D. D. S et al. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their
- offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol
- during pregnancy. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental
- 776 **Mutagenesis**, v. 832, p. 52-60, 2018.
- DWIVEDI, D. K. et al. Voluntary alcohol consumption exacerbated high fat diet-induced
- 778 cognitive deficits by NF-κB-calpain dependent apoptotic cell death in rat hippocampus:
- ameliorative effect of melatonin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1393-
- 780 1403, 2018.
- 781 EDWARDS, R. B.; MANZANA, E. J. P.; CHEN, W. J. A. Melatonin (an antioxidant)
- 782 does not ameliorate alcohol-induced Purkinje cell loss in the developing
- cerebellum. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 26, n. 7, p. 1003-
- 784 1009, 2002.
- 785 EL-SOKKARY, G. H. et al. Inhibitory effect of melatonin on products of lipid
- peroxidation resulting from chronic ethanol administration. **Alcohol and Alcoholism**, v.
- 787 34, n. 6, p. 842-850, 1999.
- 788 FAVERO, G. et al. Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome
- activation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, 2017.

- 790 GOULART, P. B. et al. Consequências da exposição materna ao etanol durante a gestação
- 791 e a lactação na formação e mineralização dentária em ratos. 2015.
- 792 GRISEL, J. J.; CHEN, W. J. A. Antioxidant Pretreatment Does Not Ameliorate Alcohol-
- 793 Induced Purkinje Cell Loss in the Developing Rat Cerebellum. Alcoholism: Clinical and
- 794 **Experimental Research**, v. 29, n. 7, p. 1223-1229, 2005.
- 795 HU, S. et al. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative
- stress, inflammatory response, and apoptosis. European journal of pharmacology, v.
- 797 616, n. 1-3, p. 287-292, 2009.
- 798 KIM, H. G. et al. The epigenetic regulator SIRT6 protects the liver from alcohol-induced
- tissue injury by reducing oxidative stress in mice. **Journal of hepatology**, v. 71, n. 5, p.
- 800 960-969, 2019.
- 801 KURHALUK, N. et al. Melatonin restores white blood cell count, diminishes glycated
- haemoglobin level and prevents liver, kidney and muscle oxidative stress in mice exposed
- to acute ethanol intoxication. **Alcohol and Alcoholism**, v. 52, n. 5, p. 521-528, 2017.
- 804 KURHALUK, N.; TKACHENKO, H. Melatonin and alcohol-related
- disorders. **Chronobiology international**, p. 1-23, 2020.
- 806 LE BERRE, A. P.; FAMA, R.; SULLIVAN, E. V. Executive functions, memory, and
- social cognitive deficits and recovery in chronic alcoholism: a critical review to inform
- future research. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, v. 41, n. 8, p. 1432-
- 809 1443, 2017.
- LEIBOWITZ, A. et al. The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats
- with metabolic syndrome. **American journal of hypertension**, v. 21, n. 3, p. 348-351,
- 812 2008.

- MARTÍNEZ-SALVADOR, J. et al. Morphologic variations in the pineal gland of the
- albino rat after a chronic alcoholisation process. **Tissue and Cell**, v. 51, p. 24-31, 2018.
- 815 MEYREL, M. *et al.* Alterations in circadian rhythms following alcohol use: A systematic
- review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 99, p.
- 817 109831, 2020.
- 818 MISHRA, A.; PAUL, S.; SWARNAKAR, S. Downregulation of matrix
- 819 metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in
- mice. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 854-866, 2011.
- 821 NDUHIRABANDI, F. et al. Chronic melatonin consumption prevents obesity-related
- 822 metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and
- reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. Journal of pineal
- **research**, v. 50, n. 2, p. 171-182, 2011.
- ÖNER, P. et al. Effect of exogenous melatonin on ethanol-induced changes in Na+, K+-
- and Ca 2+-ATPase activities in rat synaptosomes. **Neurochemical research**, v. 27, n. 12,
- 827 p. 1619-1623, 2002.
- POLSKY, S.; AKTURK, H. K. Alcohol consumption, diabetes risk, and cardiovascular
- disease within diabetes. **Current diabetes reports**, v. 17, n. 12, p. 136, 2017.
- PORTO, N. T. et al. Comportamento de universitários em relação ao consumo de álcool,
- 831 tabaco e outras drogas: subsídios para ações promotoras de saúde. **Revista Educação e**
- 832 **Cultura Contemporânea**, v. 16, n. 42, p. 104-121, 2018.
- 833 QUEIROZ, Marise Rosas. A Síndrome Alcoólica Fetal: Revisão Sistemática. 2016

- 834 RAHMAN, Md. M. et al. Melatonin supplementation plus exercise behavior ameliorate
- insulin resistance, hypertension and fatigue in a rat model of type 2 diabetes
- mellitus. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 92, p. 606-614, 2017.
- 837 REHM, J. I.; Sameer. A. narrative review of alcohol consumption as a risk factor for
- global burden of disease. **Substance abuse treatment, prevention, and policy**, v. 11, n.
- 839 1, p. 37, 2016.
- 840 SÖNMEZ, M. F. et al. Effect of melatonin and vitamin C on expression of endothelial
- NOS in heart of chronic alcoholic rats. **Toxicology and industrial health**, v. 25, n. 6, p.
- 842 385-393, 2009.
- 843 SÖNMEZ, M. F. et al. Melatonin and vitamin C ameliorate alcohol-induced oxidative
- stress and eNOS expression in rat kidney. **Renal failure**, v. 34, n. 4, p. 480-486, 2012.
- TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. Journal of Obstetrics and
- **Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2014.
- 847 ULLAH, U. et al. Hepatoprotective effects of melatonin and celecoxib against ethanol-
- induced hepatotoxicity in rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 42,
- 849 n. 3, p. 255-263, 2020.
- VALENTIM, Olga Sousa; SANTOS, Célia; RIBEIRO, José Pais. Grupos de autoajuda:
- a perceção de gravidade do alcoolismo, da saúde física e mental. **Revista Portuguesa de**
- Enfermagem de Saúde Mental, n. SPE5, p. 93-97, 2017.
- WANG, F. et al. Protective effect of apple polyphenols on chronic ethanol exposure-
- induced neural injury in rats. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109113, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global status report on alcohol and health
- 856 2018. 2018.

857	ZHU, L. et al. Gamma-oryzanol prevents ethanol-induced liver injury by ameliorating
858	oxidative stress and modulating apoptosis-related protein expression in mice. Journal of
859	Functional Foods, v. 62, p. 103532, 2019
860	
861	Objetivo Geral
862	Analisar os efeitos da administração de melatonina exógena sobre aspectos
863	morfométricos, hormonais e receptores de andrógeno nos testículos de ratos jovens
864	induzidos ao alcoolismo crônico.
865	Objetivos Específicos
866	 Dosar os níveis séricos de Testosterona;
867	Avaliar os efeitos do consumo de etanol na histofisiologia dos testículos associado
868	ou não a administração de melatonina exógena;
869	Analisar histopatológicamente e morfométricamente os testículos;
870	Verificar o índice organossomático dos testículos;
871	Realizar Imunohistoquímica para receptor de andrógeno nos testículos.
872	
873	
874	
875	
876	
877	
878	
879	
880	

881	CAPÍTULO II
882 883 884 885	
886	
887	
888	
889	Efeitos da administração de melatonina sobre aspectos morfométricos,
890	imunohistoquímicos e hormonais dos testículos de ratos induzidos ao alcoolismo
891	crônico
892	
893	
894 895	Anthony Marcos Gomes dos Santos ¹ ; Ismaela Maria Ferreira de Melo ² ; Érique Ricardo Alves ¹ ; Bruno José do Nascimento ¹ ; Laís Caroline Silva Santos ¹ , Maria Vanessa da
896	Silva ¹ , Valéria Wanderley Teixeira ² , Álvaro Aguiar Coelho Teixeira ² .
897 898 899 900 901 902 903	¹ Programa de Pós graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco ² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco Autor correspondente: anthonymarcos20@gmail.com
904 905 906	
907	
908	
909	RECIFE
910	2021
911	

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo é uma síndrome multifatorial causada pelo consumo regular e excessivo de etanol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Tal transtorno causa perturbações morais, sociais, econômicas e fisiológicas e atinge pessoas de diferentes classes sociais, idade e gênero (REIS; RODRIGUES, 2003). Segundo a World Health Organization (2018), no Brasil a quantidade de homens consumidores de álcool é aproximadamente o dobro das mulheres. O consumo de álcool está associado a infertilidade, impotência sexual, perda de memória, distúrbios de sono, psicoses, convulsões, além de favorecer o surgimento de neoplasias e causar prejuízos no funcionamento de diversos órgãos e sistemas (ZAHR *ET AL.*, 2011).

Entre os adolescentes, o álcool é a substância psicotrópica utilizada em maior quantidade e frequência (JACKSON, 2005). O Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira (2007) mostra que os adolescentes costumam ter seu primeiro contato com o álcool por volta dos 13 anos, se tornando um bebedor ativo por volta dos 15. A pesquisa também mostrou que os indivíduos do sexo masculino costumam beber quantidades maiores de álcool e com mais frequência.

Segundo o IV Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Públicas e Privadas de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras (2010), 59,3% dos adolescentes entre 10 e 18 anos já consumiu álcool na vida. 21% relatou consumir álcool mensalmente. As consequências do consumo entre adolescentes vão de problemas morais e sociais, risco de homicídio, suicídio, acidentes de trânsito, problemas no estudo, prática de sexo sem preservação ou consentimento e problemas fisiológicos causados pelos componentes do álcool (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; JACKSON, 2005).

A molécula de etanol atravessa facilmente as membranas biológicas por ser apolar e pequena, conseguindo atingir diferentes tipos celulares rapidamente (ARAUJO-FILHO, 2007). O seu metabolismo gera uma molécula secundária que é tóxica para o organismo, o acetaldeído, e também induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (HECKMANN, 2009). Essas moléculas são instáveis e altamente reativas, causando danos a diversas estruturas celulares como membranas, organelas e ácidos nucléicos (DE

SOUSA COELHO, 2018). A elevada produção de EROS causa um desbalanço em relação as defesas do organismo, levando a um quadro de estresse oxidativo, que é a principal via de patogênese do alcoolismo. (MIRA E MANDO, 1993; JIN, 2013).

O quadro de estresse oxidativo e o consumo de álcool por si só podem afetar diretamente a reprodução, interferindo na produção de testosterona e na espermatogênese (TALEBI, 2011). O etanol causa intoxicação nos testículos e alterações na motilidade e estrutura dos espermatozoides, podendo causar hipogonadismo e atrofia testicular, além de impotência sexual, perda das características sexuais secundárias, alterações nos corpos cavernosos e na microcirculação do pênis (WRIGHT, 1991; EMANUELE, 2001). O acetaldeído também tem a capacidade de reduzir os níveis de produção e liberação de testosterona, interferindo nas vias metabólicas responsáveis pela sua produção (EMANUELE, 2001).

Produzida pela glândula pineal, o hormônio melatonina (MEL) tem sua produção inibida pela luz e estimulada pelo escuro (ALVES, 2020). A MEL apresenta capacidade antioxidante elevada graças a sua capacidade de capturar e neutralizar radicais livres, diminuindo sua quantidade no organismo e atenuando o quadro de estresse oxidativo (SANCHEZ, 2015). Pesquisas anteriores têm mostrado o papel da melatonina (MEL) como atenuadora do quadro de estresse oxidativo em etilistas crônicos (HU, 2009; DE SOUSA COELHO, 2018; ULLAH, 2020) Pacientes etilistas apresentem níveis séricos e urinários de melatonina reduzidos, o que além de contribuir para o quadro de estresse oxidativo, causa prejuízo em outras funções biológicas mediadas pela melatonina como ciclo circadiano, imunidade e reprodução (PERES, 2003; TALEBI, 2011).

Os efeitos da melatonina envolvendo o testículo de ratos é pouco compreendido, e até o presente momento nenhum estudo abordou os efeitos da sua administração associada ao consumo crônico de etanol. Dado o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da administração da melatonina exógena na atenuação dos efeitos deletérios do alcoolismo crônico no testículo de ratos adolescentes em níveis morfológicos, hormonais e histopatológicos e sobre os receptores de andrógeno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos albinos *Rattus norvegicus albinus*, com 40 dias de idade, com 150 ±30g, linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. O experimento foi submetido ao Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e aprovado sob a licença número 5264070720. Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos sob condições ideais de iluminação (ciclo 12 horas claro e 12 hora escuro), temperatura (22°C) e umidade (55%), e divididos nos grupos experimentais: **I:** (controle): ratos sem tratamento com álcool; **II**: ratos submetidos ao consumo crônico de solução hidroalcoólica a 25%; **III**: ratos submetidos ao consumo crônico de solução hidroalcoólica a 25% e tratados simultaneamente com melatonina.

2.2 Indução do alcoolismo e tratamento com melatonina

O alcoolismo foi induzido utilizando-se a metodologia de consumo semivoluntário de etanol, onde a única dieta liquida disponível para os animais dos grupos II e III foi solução hidroalcóolica a 25% (MARCHINI, 2018; POMINI, 2019; DULINSKAS e RUKSENAS, 2020; WANG *et al*, 2020). Com exceção do grupo I (controle), os animais passaram por um período de 4 semanas de adaptação onde foram introduzidas doses de solução hidroalcoólica em concentrações crescentes (5%, 10%, 15% e 20%). Em seguida os animais passaram a receber etanol a 25% durante o período de 8 semanas. A administração de melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) foi feita na dose de 10mg/kg. Para tanto, foi dissolvida

em 0,2 mL de etanol e diluída em 0,8mL NaCl a 0,9% e aplicada via intraperitoneal sempre no período do início da noite a partir da semana cinco do experimento apenas nos animais do grupo III.

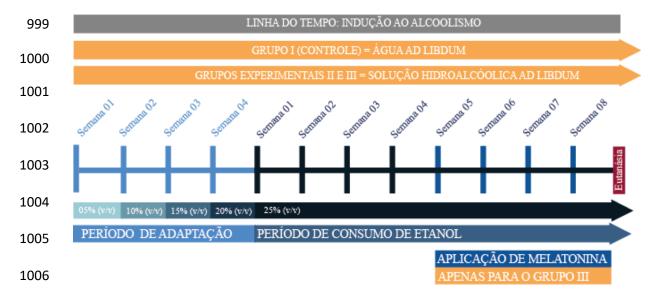


Figura 1: Linha do tempo da indução ao alcoolismo utilizando o modelo de consumo semivoluntário de etanol.

2.3 Dosagem hormonal

Foram realizadas três coletas de sangue (Semana 01 do período de adaptação, semana 01 e semana 08 do período de consumo de etanol) para todos os grupos experimentais. Os animais dos grupos experimentais foram imobilizados em contensor e o sangue (1ml) coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue retirado foi colocado em tubos com gel separador e mantidos à temperatura ambiente. Para obtenção do soro as amostras foram submetidas à centrifugação refrigerada (-4 °C) com a velocidade de 3.000 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, o soro foi acondicionado em microtubos e congelados a -20 °C até o momento das dosagens (TEIXEIRA *ET AL.*, 2004). Os níveis séricos de testosterona

foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbet Assay (ELISA), através de KIT's comerciais. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.4 Histopatologia

Para coleta dos testículos os animais, após um período de 8 semanas de consumo de etanol, os animais foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formol tamponado e processados para inclusão em parafina. Posteriormente os cortes foram submetidos à coloração H. E. para histologia e morfometria. Na análise morfométricas dos testículos foram determinadas o número de espermatogônias, espermatócitos, espermátides, células de Sertoli e células de Leydig, além da área tubular e intertubular. As lâminas foram observadas em uma ocular de 10x, contendo no interior um retículo de WEIBEL com 25 pontos.

2.5 Índice organossomático

Os animais foram pesados diariamente. Os testículos foram pesados com auxílio de balança analítica e o índice organossomático foi calculado pela razão entre o peso de cada órgão e o peso corpóreo de cada animal (ZHANG *ET AL.*, 2014), para detectar aumento ou atrofia das gônadas (VAN DYK *ET AL.*, 2007) utilizando a seguinte fórmula:

1037 Onde:

$$IO = \frac{PO}{PC} \times 100$$

IO: Índice organossomático;

1040 PO: Peso do órgão;

8...

1041 PC: peso corporal.

2.6 Morfometria

Para morfometria testicular foram obtidas fotomicrografias das lâminas histológicas com auxílio de uma câmera de vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, onde o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero foram medidos utilizando o software Image J. Trinta túbulos seminíferos redondos foram medidos para cada animal (n=5/grupo). O comprimento total dos túbulos seminíferos (em metros) por g de testículo foi obtido pela fórmula: TL = VST / πR², onde TL = comprimento do túbulo seminífero; VST = volume do túbulo seminífero e R = diâmetro do túbulo seminífero / 2 (Monteiro *et al.*, 2012; Penitente Filho *et al.*, 2014). Para a contagem das células de Sertoli e células de Leydig, utilizou-se a objetiva de 10x contendo no interior o retículo de WEIBEL. Onde foram determinados percentuais dos pontos que incidiram sobre essas células de acordo com metodologia descrita por Neves *et al.* (2002).

2.7 Imunohistoquímica (receptor de andrógeno)

Foi utilizado o anticorpo AR (441): SC-7305 (Santa Cruz Biotechnology) para o receptor androgênico, na proporção de diluição de 1: 100. As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois, respectivamente. A recuperação do antígeno será realizada através de uma solução tampão de citrato (pH 6 para AR) a alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida por uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação inespecífica antígeno-anticorpo foi bloqueada pela incubação das lâminas em PBS e albumina de soro bovino a 5% (BSA) por 1 hora. O anticorpo foi diluído em PBS 5% por 1 hora. Posteriormente, as seções foram tratadas com Histofine (Cod. 414191F, - Nichirei Biosciences, Tóquio, Japão) por 30 min. As observações foram realizadas através de um precipitado marrom

após aplicação de 3,3-diaminobenzidina por 4 minutos e revestidos com hematoxilina. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo Sony acoplada ao microscópio OLYMPUS BX-50, feitas com a objetiva 40X e submetidas ao aplicativo GIMP 2.0 para quantificação usando o histograma RGB (vermelho-verde-azul), que se baseia na intensidade da luminescência em que os tons de pixel da imagem variam de 0 a 255, e o tom 0 representa a (menos luminescência), enquanto o tom 255 representa a branco absoluto (maior luminescência) (LEE *et al.*, 2001; OBERHOLZER *et al.*, 1996). Para o receptor de andrógenos, a contagem foi realizada usando um retículo WEIBEL de 25 pontos, seguido por uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas por grupo onde foram analisados 10 túbulos seminíferos, com uma objetiva de 10x. Foram contadas no mínimo 300 células do epitélio seminífero e transformadas em porcentagem de células marcadas (WEIBEL, 1963).

2.8 Análise estatística

Todos os dados morfométricos e imunohistoquímicos foram submetidos a Análise de Variância, quando significante esta foi complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer (P<0,05).

3. RESULTADOS

3.1 Dosagem Hormonal

As dosagens hormonais revelaram redução significativa da testosterona sérica nos animais do grupo álcool, quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 1).

1086 3.2 Histopatologia

De acordo com a avaliação qualitativa da estrutura testicular dos animais dos grupos controle (I) e álcool + mel (III), não foram observadas alterações compatíveis com degeneração testicular, apresentando epitélio seminífero integro com elementos celulares (espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e célula de Sertoli) bem definidos. No entanto, os testículos dos animais do grupo álcool (II), apresentaram desorganização do epitélio seminífero adquirido um aspecto de degeneração tecidual, dificultando a observação de alguns tipos celulares (Figura 2).

3.3 Índice organossomático e morfometria

Houve redução do peso corporal, dos testículos e do índice organossomático nos animais que receberam álcool em relação ao controle e os que foram tratados com melatonina. A morfometria testicular revelou nesses animais, redução do diâmetro tubular, da altura do epitélio seminífero, do comprimento total tubular, número das células de Sertoli e Leydig (Tabela 1).

3.4 Imunohistoquímica para receptor de andrógeno

O grupo álcool apresentou marcação reduzida para receptor de andrógenos em todo o epitélio seminífero. Já o grupo álcool + melatonina apresentou marcação positiva para receptor de andrógeno em todos os tipos celulares do epitélio seminífero, não diferindo estatisticamente do grupo controle. Os resultados puderam ser confirmados pela quantificação das células marcadas (figura 4)

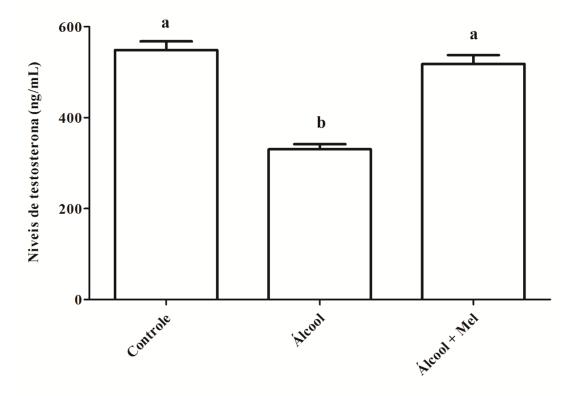


Figura 2. Níveis de testosterona nos animais dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer (P>0,05).

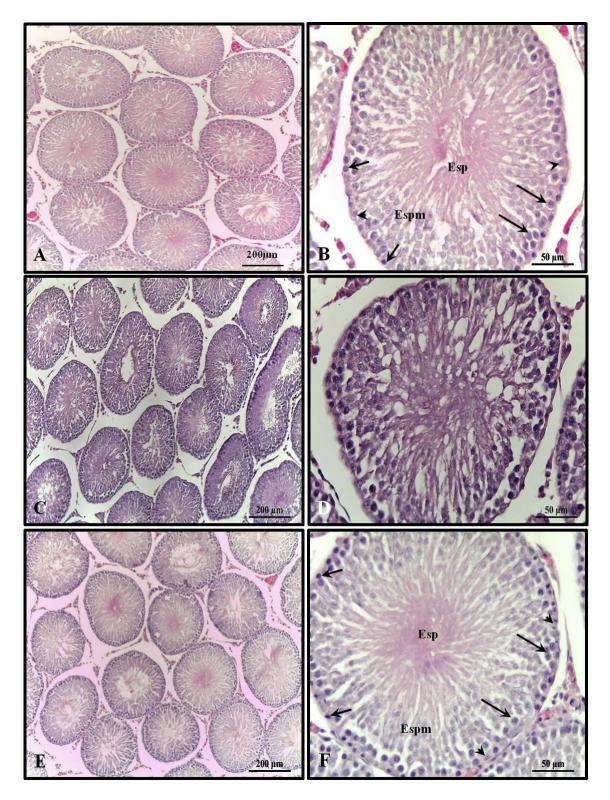


Figura 3: Fotomicrografia dos testículos dos animais dos grupos experimentais. A-B controle; C-D Álcool e E-F Álcool + Mel. H.E. Cabeça de seta – célula de Sertoli; Setas curtas – espermátides; Setas longas – espermatócitos; Espm – Espermátides; Esp – Espermatozóides.

Tabela 1. Médias dos dados morfométricos dos animais dos grupos experimentais

	Controle	Álcool	Álcool + Mel	P
Peso corporal (g)	369,00 ±	278,06 ±	$332,\!25\ \pm$	0,0351
	37,91a	34,54b	38,08a	
Peso dos testículos (g)*	$1,65 \pm 0,14a$	$1,32 \pm 0,18b$	$1,50 \pm 0,17a$	0,0111
Índice organossomático (%)	$0,49 \pm 0,03a$	$0,41 \pm 0,01b$	$0,45 \pm 0,02b$	0,0202
Diâmetro tubular (μm)	$332,21 \pm 2,16a$	298,11 ±	$329,78 \pm 4,54a$	0,0105
		3,45b		
Altura do epitélio (μm)	$119,82 \pm 1,09a$	105,29 ±	$117,50 \pm 3,98a$	0,0256
		3,61b		
Comprimento total tubular	$12,33 \pm 0,52a$	$10,88 \pm 0,33b$	$11,90 \pm 0,98a$	0,0312
(m)				
Células de Sertoli	$5,15 \pm 1,16a$	$3,09 \pm 0,55b$	$4,23 \pm 0,12a$	0,0010
Células de Leydig	$3,38 \pm 0,22a$	$2,11 \pm 0,05b$	$3,10 \pm 0,32a$	0,0037

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer (P>0,05). valores correspondem à média dos testículos direito e esquerdo.

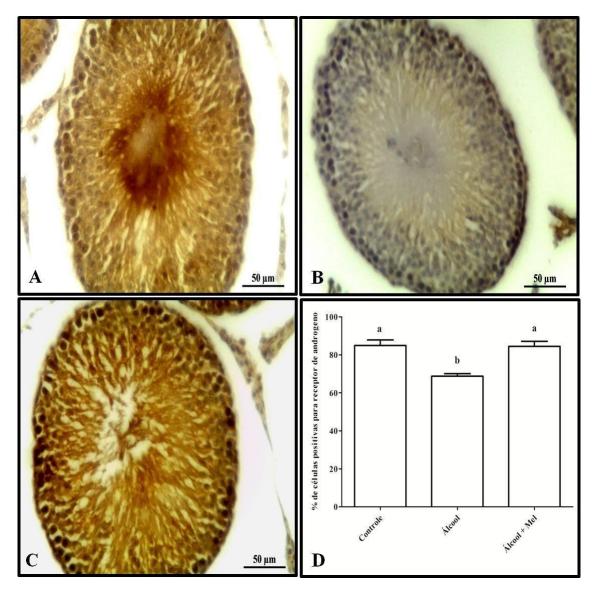


Figura 4: Imunohistoquímica para receptor de andrógeno nos testículos dos animais dos grupos experimentais. A) Controle; B) Álcool e C) Álcool + Mel. D) Percentual de receptores. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste anova one-way com post hoc de Tukey (p < 0.05).

. . . .

4. DISCUSSÃO

A literatura mostra que todas as vias metabólicas do etanol envolvem um aumento na produção de especies reativas de oxigenio, além de seu principal metabólito secundário,o acetoaldeildo ser tóxico aos sistesmas biológicos (ZIMA, 2001; WU, 2006; ALBANO, 2006). O quadro de estresse oxidativo é caracterizado pelo desbalanço entre as defesas antioxidantes e a produção de radicais livres e causa alterações na estrutura testicular tanto no alcoolismo quanto em outras doenças como obesidade, diabetes e etc (BARBOISA, 2010; PAZ, 2020; ALVES, 2020). O estado pro-oxidativo causado pelo consumo de etanol favorece alterações na estrutura e no funcionamento dos testículos (AMANVERMEZ, 2005; CONDORELLI, 2015).

Os animais do grupo II apresentaram a estrutura testicular com desorganização do epitélio seminífero e diminuição de alguns tipos celulares, caracterizando um aspecto de degeneração testicular. Sabe-se que o quadro de estresse oxidativo gera uma resposta inflamatória prolongada em órgãos e tecidos mediada através da expressão de citocinas pró inflamatórias como II1-b, IL-6, e TNFa, o que causa morte celular e degeneração tecidual, tais qual as caracteristicas histopatológicas encontradas nos animais do grupo II (DUTA, 2021. Trabalhos como e Erdemir (2012) e Alves (2020)) também mostram alterações nas caracteristicas teciduais testiculares em animais acometidos por doenças que tem sua patogenese mediada por estresse oxidativo.

O grupo álcool + melatonina manteve sua estrutura testicular íntegra, sem características de degeneração testicular, tal como o grupo controle em suas análises histopatológicas. A administração de melatonina foi capaz de aumentar o diâmetro dos túbulos seminíferos em ratos expostos a radiação, tal como a retomada na produção e contagem de espermatozoides (HUSSEIN, 2006). A melatonina também foi capaz de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias no testículo de ratos diabéticos, o que diminuiu o dano causado aos tecidos pelo estresse oxidativo (ALVES, 2020). A administração de melatonina exógena também apresentou efeito protetor nas estruturas testiculares de pacientes que sofreram torção testicular, que tem sua patogênese também mediada por estresse oxidativo (PARLAKTAS, 2014) Além do seu efeito protetor, a MEL estimula as defesas antioxidantes do organismo, o que explica a manutenção das estruturas teciduais no grupo que recebeu tratamento com melatonina e sua semelhança com as do grupo controle (REITER, 2000; ALVES, 2020)

Os níveis séricos de testosterona dos animais do grupo álcool diminuíram em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com melatonina. Gordon (1976) mostrou a diminuição dos níveis séricos de testosterona em homens que consumiram álcool durante um período de quatro semanas em comparação a homens que não consumiram. Os níveis séricos desse hormônio começaram a cair após o quinto dia de consumo. Em ratos, estudos mostram a diminuição dos níveis séricos de testosterona associado ao consumo de etanol (WRIGHT, 1991; APTER, 2003; APTER, 2006; MARTINS, 2007; OREMUSU, 2015).

A baixa na produção de testosterona pode acontecer por diversos fatores como dano a estruturas testiculares e toxicidade do etanol, aumento do estresse oxidativo e alta produção de acetaldeído, molécula secundária do metabolismo do etanol, que é capaz de interferir diretamente na síntese da testosterona através da modulação de diferentes vias metabólicas da produção deste hormônio. (EMANUELE, 2001; DOSUMU, 2012; PRYA, 2014; GONCALVES, 2016).

Os animais do grupo III mostraram níveis séricos de testosterona semelhantes ao grupo I. Estudos mostram que a melatonina é capaz de proteger os testículos de danos ambientais como os causados pela toxicidade direta da molécula de etanol, seu metabolito secundário (acetaldeído) e pelo quadro de estresse oxidativo (LI, 2015; BHATTACHARYA, 2019). Animais que foram submetidos a luz constante apresentaram diminuição de organelas que armazenam enzimas chaves para a síntese de testosterona na célula de Leydig, indicando uma ação direta da melatonina na produção de testosterona (REDINS, 2002; MASON, 2010).

A sintese da testosterona acontece nas células de Leydig, localizada no instersticio entre os tubulos seminiferos nos testíticulos (ZIRKIN,. 2018). A contagem direta das células de Leydig mostrou-se reduzida no grupo II, o que está diretamente ligado a diminuição dos níveis séricos de testosterona. Nos grupos I e III, tanto a contagem das células de Leydig quanto os niveis de testosterona se mantiveram normais, o que reforça a relação entre as alterações estruturais no testículo e a produção de testosterona (PAJARINEN, 1994). O etanol mesmo sem ser metabolizado é considerado gonadotóxico, afetando diretamente as células de leydig (VAN THIEL, 1983). A progressão da exposição ao etanol também altera seu tamanho, suas organelas e causa uma disfunção no eixo hipotalamico-hipofisário, o que leva a diminuição dos niveis

séricos de testosterona (SANTUCCI, 1983).

A baixa nos níveis de testosterona, diminuição das células de sertoli no grupo II justifica a alteração do peso dos testículos quando comparados com os grupos I e II nos quais o peso dos órgãos se manteve dentro da normalidade. É comum (três em cada quatro alcoólatras) o quadro de atrofia testicular em pacientes etilistas, que causa outros efeitos como impotência sexual, esterilidade, motilidade e contagem de espermatozoides (BANNISTER, 1987; EL-SOKKARY, 2001). As células de Sertoli são as primeiras a serem afetadas pelo consumo de etanol, visto que sao elas que mantém a barreira thematotesticular (MRUK, 2011). Zhu (1997) mostrou que as alterações morfológicas nos testículos de individuos que consumiram alcool acontecem após o rompimento dessa barreira, o que atesta o papel das células de Sertoli na progressão dos danos causados pelo consumo crônico de álcool e corrobora com os achados do grupo II.

A análise imunohistoquímica mostrou uma expressão reduzida de receptores de andrógenos nos testículos dos animais do grupo II quando comparado ao grupo I e ao grupo III, se apresentando de acordo com outros trabalhos na literatura (ALASMARI, 2018; KHALAF, 2019; ALVES, 2020). Esse resultado pode estar relacionado com os níveis séricos de testosterona como mostra a literatura (SEIDMAN, 2001; ZAYA *et al*, 2012; ALVES, 2020). Outros trabalhos mostram alteração de diversas funções fisiológicas mediadas por hormônios sexuais devido a diminuição dos receptores de andrógeno em animais que consumiram álcool, sendo essas alterações causadas por estresse oxidativo e diminuição nos níveis de hormônios andrógenos (VAN THIEL, 1979; CHANG, 1995; VINGREN, 2004; LENZ, 2012).

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, podemos concluir que a melatonina apresenta potencial protetor sobre as células dos testículos de animais alcoólatras, em níveis hormonais, morfométricos e histopatológicos. Além disso, a administração da melatonina exógena auxiliou na manutenção do peso dos órgãos, da espermatogênese e na expressão de receptores androgênicos em todos os tipos celulares do epitélio seminífero, o que atesta sua função terapêutica na diminuição dos efeitos deletérios causados pelo alcoolismo. Embora apresente resultados positivos, é necessário um aprofundamento sobre o tema.

6. REFERÊNCIAS

- 1238 ALASMARI, W. A. The effect of metformin versus vitamin E on the testis of adult
- 1239 diabetic albino rats: histological, biochemical and immunohistochemistry
- study. Advances in Reproductive Sciences, v. 6, n. 4, p. 113-132, 2018.
- 1241 ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proceedings of the
- **nutrition society**, v. 65, n. 3, p. 278-290, 2006.
- 1243 ALVES, E. et al. Protective action of melatonin on diabetic rat testis at cellular, hormonal
- and immunohistochemical levels. **Acta Histochemica**, v. 122, n. 5, p. 151559, 2020.
- 1245 AMANVERMEZ, Ramazan et al. Alcohol-induced oxidative stress and
- reduction in oxidation by ascorbate/L-cys/L-met in the testis, ovary, kidney, and lung of
- rat. **Advances in therapy**, v. 22, n. 6, p. 548-558, 2005.
- 1248 APTER, S.; ERIKSSON, P. The effect of alcohol on testosterone concentrations in
- alcohol-preferring and non-preferring rat lines. Alcoholism: Clinical and
- 1250 **Experimental Research**, v. 27, n. 7, p. 1190-1193, 2003.
- 1251 ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos
- indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. Revista de
- 1253 **Ciências Médicas e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 17-25, 2007.
- 1254 BANNISTER, P.; LOWOSKY, M. INVITED REVIEW: ETHANOL AND
- 1255 HYPOGONADISM. **Alcohol and alcoholism**, v. 22, n. 3, p. 213-217, 1987.
- 1256 BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e
- fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- 1258 BHATTACHARYA, K. et al. Role of melatonin in male reproduction. Asian Pacific
- **Journal of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 211, 2019.
- 1260 BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. SVS/CN-DST/AIDS. A
- 1261 Política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras
- Drogas/Ministério da Saúde. 2.ed. rev. ampl. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- 1263 CHANG, C. Androgen receptor: an overview. Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene
- **Expression**, v. 5, n. 2, 1995.
- 1265 CONDORELLI, R. A. et al. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: our
- experience and the main evidences. **Andrologia**, v. 47, n. 4, p. 368-379, 2015.
- 1267 CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. Alcohol Clin Exp Res, v. 30, p. 720-730,
- 1268 2006.
- 1269 DE SOUSA COELHO, I. D. D. et al. Protective effect of exogenous melatonin in rats
- and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of
- 1271 alcohol during pregnancy. Mutation Research/Genetic Toxicology and
- **Environmental Mutagenesis**, v. 832, p. 52-60, 2018.

- DOSUMU, O. O.; AKINOLA, O. B.; AKANG, E. N. Alcohol-induced testicular
- oxidative stress and cholesterol homeostasis in rats—The therapeutic potential of virgin
- coconut oil. Middle East Fertility Society Journal, v. 17, n. 2, p. 122-128, 2012.
- 1276 DULINSKAS, Redas; RUKSENAS, Osvaldas. Modulation of responses to visual
- 1277 stimulus onset and offset by chronic alcohol consumption and withdrawal in the rat
- visual cortex and lateral geniculate nucleus. **Alcohol**, v. 85, p. 101-110, 2020.
- 1279 DUTTA, Sulagna et al. Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male
- reproduction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10043,
- 1281 2021.
- 1282 EL-SOKKARY, G. H. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration
- on the testis of adult male rat. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, n. 2, p. 93-100, 2001.
- 1284 EMANUELE, M.; EMANUELE, N. Alcohol and the male reproductive system. Alcohol
- 1285 **Research & Health**, v. 25, n. 4, p. 282, 2001.
- 1286 ERDEMIR, F. et al. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum
- oxidative stress parameters. Actas Urológicas Españolas (English Edition), v. 36, n. 3,
- 1288 p. 153-159, 2012.
- 1289 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**,
- 1291 v. 56, n. 3, p. 225-237, 2014.
- 1292 GONCALVES, N. R.; DA LUZ DIAS, F. Análise da influência do alcoolismo e
- tabagismo na fertilidade masculina. **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, 2016.
- GORDON, G. et al. Effect of alcohol (ethanol) administration on sex-hormone
- metabolism in normal men. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 15, p. 793-
- 1296 797, 1976.
- 1297 HARASIMOWICZ, J. et al. Chemiluminometric evaluation of melatonin and selected
- melatonin precursors' interaction with reactive oxygen and nitrogen species. Analytical
- **biochemistry**, v. 420, n. 1, p. 1-6, 2012.
- 1300 HUSSEIN, M. et al. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin
- 1301 against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal
- model. **International journal of experimental pathology**, v. 87, n. 3, p. 237-250, 2006.
- 1303 I LEVANTAMENTO NACIONAL SOBRE OS PADRÕES DE CONSUMO DE ÁLCOOL NA POPULAÇÃO
- 1304 BRASILEIRA / Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeira et al; Revisão técnica
- 1305 científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas,
- 1306 2007.
- 1307 JACKSON, K. M. et al. Recent developments in alcoholism, Vol. 17: Alcohol problems in
- 1308 adolescents and young adults. 2005.

- 1309 JIMÉNEZ, V. et al. Effect of chronic ethanol feeding on 24-hour rhythms of mitogenic
- responses and lymphocyte subset populations in thymus and spleen of peripubertal male
- rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 12, n. 6, p. 357-365, 2005.
- 1312 KHALAF, H. A.; ARAFAT, E. A.; GHONEIM, F. M. A histological,
- immunohistochemical and biochemical study of the effects of pomegranate peel extracts
- on gibberellic acid induced oxidative stress in adult rat testes. Biotechnic &
- 1315 **Histochemistry**, v. 94, n. 8, p. 569-582, 2019.
- KOCAK, I. et al. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis
- factor α levels with semen parameters in fertile and infertile men. Urological research,
- 1318 v. 30, n. 4, p. 263-267, 2002.
- 1319 KOSMIDOU, I. et al. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive
- oxygen species. American journal of respiratory cell and molecular biology, v. 26, n.
- 1321 5, p. 587-593, 2002.
- LEE, E. S. *et al.* Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases.
- 1323 **Int. J. Dermatol**, v. 40, p. 45-9, 2001.
- 1324 LENZ, B. Sex hormone activity in alcohol addiction: integrating organizational and
- activational effects. **Progress in neurobiology**, v. 96, n. 1, p. 136-163, 2012.
- LI, C.; ZHOU, X. Melatonin and male reproduction. Clinica Chimica Acta, v. 446, p.
- 1327 175-180, 2015.
- 1328 MARCHINI, Adriana Mathias Pereira de Silva et al. Influence of chronic alcoholism
- and estrogen deficiency on the immunohistochemical expression of regulatory proteins
- of the bone resorption process in the periodontium of Wistar rats. Archives of Oral
- **Biology**, v. 95, p. 7-14, 2018.
- 1332 MARTINS, O. ESTRESSE, ALCOOLISMO E VITAMINA E: AVALIAÇÃO DE
- 1333 **PARÂMETROS**. 2007. 101 f. Tese (Doutorado em engenharia da produção) Instituto
- de Biociências, Universidade de São Paulo, 2007.
- 1335 MASON, A. O. et al. Photoperiod and reproductive condition are associated with changes
- in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (Mesocricetus
- auratus). **Journal of biological rhythms**, v. 25, n. 3, p. 176-185, 2010.
- 1338 MONTEIRO, JC. et al. Testicular Morphology of Adult Wistar Rats Treated with Rudgea
- viburnoides (Cham.) Benth. Leaf Infusion. Braz Arch Biol Techn. 55, (1), 101-105.
- 1340 2012.
- MONTERA, V. Benefícios dos nutrientes antioxidantes e seus cofatores no controle do
- estresse oxidativo e inflamação na insuficiência cardíaca. **Revista da SOCERJ**, v. 20, n.
- 1343 1, p. 20-27, 2007.

- MRUK, Dolores D.; CHENG, C. Yan. An in vitro system to study Sertoli cell blood-testis
- barrier dynamics. In: **Permeability Barrier**. Humana Press, 2011. p. 237-252.
- NEVES, E. S., CHIARINI-GARCIA, H., & FRANÇA, L. R. Comparative testis
- morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biology*
- 1348 *of reproduction*, 67(1), 247–255. 2002.
- OBERHOLZER, M. et al. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and**
- **cell biology**, v. 105, n. 5, p. 333-355, 1996.
- OREMOSU, A. A; AKANG, E. N. Impact of alcohol on male reproductive hormones,
- oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. **Middle East Fertility**
- 1353 **Society Journal**, v. 20, n. 2, p. 114-118, 2015.
- 1354 OSTJEN, C. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery
- from muscular trauma induced in rats. **Experimental and molecular pathology**, v. 106,
- 1356 p. 52-59, 2019.
- 1357 PAJARINEN, J. T.; KARHUNEN, P. J. Spermatogenic arrest and 'Sertoli cell-
- only'syndrome—common alcohol-induced disorders of the human testis. **International**
- journal of andrology, v. 17, n. 6, p. 292-299, 1994.
- 1360 PARLAKTAS, B. et al. The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the
- ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. Asian
- **Journal of Andrology**, v. 16, n. 2, p. 314, 2014.
- PENITENTE FILHO, JM. *Et al.* Morphometric evaluation of the spermatogenic process
- of adults wistar rats exposed to the 2,4diclorophenoxiacetic acid associated to picloram
- 1365 (Tordon 2,4-D ® 64/240 BR) **Acta Vet Bras**. 8, (1), 47-53. 2014.
- 1366 PERES, R. et al. Ethanol consumption and pineal melatonin daily profile in
- rats. **Addiction biology**, v. 16, n. 4, p. 580-590, 2011.
- PRIYA, P. H.; GIRISH, B. P.; REDDY, P. Sreenivasula. Restraint stress exacerbates
- alcohol-induced reproductive toxicity in male rats. **Alcohol**, v. 48, n. 8, p. 781-786, 2014.
- 1370 REDINS, C. A.; REDINS, G. M.; NOVAES, J. C. The effects of treatment with melatonin
- on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. **Brazilian Journal of**
- **Biology**, v. 62, n. 3, p. 517-523, 2002.
- 1373 REIS, Nelzir Trindade; RODRIGUES, Cláudia dos Santos Cople. Nutrição clínica:
- 1374 **alcoolismo**. Rubio, 2003.
- 1375 REITER, R. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of**
- 1376 **biomedical science**, v. 7, n. 6, p. 444-458, 2000.
- 1377 ROMEO, J. et al. Changes in the immune system after moderate beer
- consumption. Annals of Nutrition and Metabolism, v. 51, n. 4, p. 359-366, 2007.

- 1379 SÁNCHEZ, Aroha; CALPENA, Ana Cristina; CLARES, Beatriz. Evaluating the oxidative stress
- in inflammation: role of melatonin. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p.
- 1381 16981-17004, 2015.
- POMINI, Karina Torres et al. Influence of experimental alcoholism on the repair
- process of bone defects filled with beta-tricalcium phosphate. **Drug and Alcohol**
- 1384 **Dependence**, v. 197, p. 315-325, 2019.
- 1385 SANOCKA, D. et al. Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins
- 1386 in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal
- plasma. **Journal of andrology**, v. 24, n. 3, p. 448-455, 2003.
- SANTUCCI, L.; GRAHAM, T. J.; MD, David H. Van Thiel. Inhibition of
- 1389 Testosterone Production by Rat Leydig Cells with Ethanol and Acetaldehyde:
- 1390 Prevention of Ethanol Toxicity with 4-Methylpyrazole. Alcoholism: Clinical and
- 1391 **Experimental Research**, v. 7, n. 2, p. 135-139, 1983.
- 1392 SEIDMAN, S. N. Testosterone level, androgen receptor polymorphism, and depressive
- symptoms in middle-aged men. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 5, p. 371-376, 2001.
- 1394 SERMONDADE, N. et al. Progressive alcohol-induced sperm alterations leading to
- spermatogenic arrest, which was reversed after alcohol withdrawal. Reproductive
- **biomedicine online**, v. 20, n. 3, p. 324-327, 2010.
- 1397 TALEBI, A. et al. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA
- integrity of epididymal spermatozoa in rat. **Alcohol**, v. 45, n. 4, p. 403-409, 2011.
- 1399 TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. Journal of Obstetrics and
- **1400 Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2014.
- 1401 TAPIA, G. et al. Thyroid hormone-induced oxidative stress triggers nuclear factor-κΒ
- 1402 activation and cytokine gene expression in rat liver. Free Radical Biology and
- 1403 **Medicine**, v. 35, n. 3, p. 257-265, 2003.
- 1404 TEIXEIRA, AAC. Et a. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or
- submitted to the constant illumination rats. **Int J Morphol**. 22 (3), 189-194. 2004.
- 1406 VAN DYK, JC, PIETERSE, GM, VAN VUREN, JH. Histological changes in the liver of
- 1407 Oreochromis mossambicus (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. Ecotox
- 1408 Environ Safe. 66 (3), 432-40. 2007
- 1409 VAN THIEL, D. H. et al. Ethanol, a Leydig cell toxin: evidence obtained in vivo
- and in vitro. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 18, p. 317-323, 1983.
- 1411 VAN THIEL, D. H.; LESTER, R. The effect of chronic alcohol abuse on sexual
- function. Clinics in Endocrinology and Metabolism, v. 8, n. 3, p. 499-510, 1979.
- 1413 VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do
- 1414 Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras
- 1415 2010/ supervisão: E. A. Carlini et al. -- São Paulo: CEBRID Centro Brasileiro de Informações

- 1416 sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP Universidade Federal de São Paulo. SENAD Secretaria
- 1417 Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília, 2010.
- 1418 WANG, Fang et al. Protective effect of apple polyphenols on chronic ethanol exposure-
- induced neural injury in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 326, p. 109113,
- 1420 2020.
- WEIBEL ER: Princípios e métodos para o estudo morfométrico do pulmão e outros órgãos. Lab
- 1422 **Invest**, 12: 131-155. 1963.
- WEIBEL ER: Princípios e métodos para o estudo morfométrico do pulmão e outros
- 1424 órgãos. Lab Invest. 12: 131-155. 1963.
- 1425 WEST, A. S. et al. The Effects of Naturalistic Light on Diurnal Plasma Melatonin and
- 1426 Serum Cortisol Levels in Stroke Patients during Admission for Rehabilitation: A
- Randomized Controlled Trial. **International journal of medical sciences**, v. 16, n. 1, p.
- 1428 125, 2019.
- 1429 WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global status report on alcohol and health
- 1430 2018. Licence: CC BY-NC-SA, v. 3, 2018.
- WRIGHT, H.; GAVALER, J.; VAN THIEL, D. Effects of alcohol on the male
- reproductive system. **Alcohol Research**, v. 15, n. 2, p. 110, 1991.
- 1433 WU, D.; ZHAI, Q.; SHI, X. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. **Journal**
- of gastroenterology and hepatology, v. 21, p. S26-S29, 2006.
- 1435 ZAHR, Natalie M.; KAUFMAN, Kimberley L.; HARPER, Clive G. Clinical and
- pathological features of alcohol-related brain damage. **Nature Reviews Neurology**, v. 7,
- 1437 n. 5, p. 284, 2011.
- 1438 ZHANG, Z. et al. Maize Purple Plant Pigment Protects Against Fluoride-Induced
- Oxidative Damage of Liver and Kidney in Rats. Int J Environ Res Public Health. 11(1),
- 1440 1020-1033. 2014
- 2HU, Qianlong; VAN THIEL, David H.; GAVALER, Judith S. Effects of ethanol on
- rat Sertoli cell function: studies in vitro and in vivo. Alcoholism: Clinical and
- **Experimental Research**, v. 21, n. 8, p. 1409-1417, 1997.
- 1444 ZIMA, T. et al. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related
- diseases. **Journal of biomedical science**, v. 8, n. 1, p. 59-70, 2001.
- 2 ZIRKIN, Barry R.; PAPADOPOULOS, Vassilios. Leydig cells: formation, function,
- and regulation. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 101-111, 2018.
- 1448
- 1449
- 1450