

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenças de enantiômeros do Citalopram na indução de mutação e recombinação em  
células de asa de *Drosophila melanogaster***

Abu-Bakr Adetayo Ariwoola

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
curso de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Ituiutaba, MG  
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenças de enantiômeros do Citalopram na indução de mutação e recombinação em  
células de asa de *Drosophila melanogaster***

Abu-Bakr Adetayo Ariwoola

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
curso de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Ituiutaba, MG  
Dezembro - 2019

Dedico este trabalho a todos aqueles  
que compartilharam comigo essa jornada  
chamada graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente minha família, especialmente minha mãe Maria Cecília de Moraes Gillio e minha irmã Aisha Marina Ariwoola, por me apoiarem e por não me deixar desistir quando tomei a decisão de cursar Ciências Biológicas em uma cidadezinha a quase 700 km de casa. Mais do que um simples apoio financeiro, foi graças ao apoio emocional de vocês, que eu consegui chegar ao fim desta graduação, penso, que este diploma deverá ser tanto seus quanto meu.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e amigas, que me aguentaram durante todo esse tempo. Perdi a conta de quantas vezes o que me fez levantar da cama e ir para aula era o simples fato de saber que vocês estariam lá. Natália, Isadora, Lorraine, Marcelina e Maria, obrigado por tudo, eu amo vocês.

Agradeço também à banca examinadora pela disponibilidade, avaliação, sugestões e opiniões dadas a essa monografia;

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, pela disposição de recursos para a realização do presente trabalho;

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica;

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende pela orientação e pela paciência.



“We are part of this universe; we are in this universe, but perhaps more important than both of those facts, is that the universe is in us” (Neil deGrasse Tyson).

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico do Citalopram e Escitalopram em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e verificar a influência das enzimas do complexo CYP450 na indução de mutações e recombinação homóloga. Foram utilizadas progênies do cruzamento padrão (*Standard* – ST) e de alta bioativação metabólica (*High Bioactivation* – HB) de *D. melanogaster* para o Teste de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test* - SMART). Larvas de terceiro estágio dos dois cruzamentos foram tratadas com diferentes concentrações das drogas antidepressivas Citalopram e Escitalopram (0,3125 mg/mL a 10 mg/mL). Ambos os medicamentos foram tóxicos em altas concentrações. Resultados obtidos dos cruzamentos indicam que o Citalopram foi mutagênico e recombinogênico na maior concentração testada no ST, porém, não foi mutagênico quando altamente metabolizado por enzimas CYP450 no HB. Escitalopram foi mutagênico e majoritariamente recombinogênico em todos os tratamentos do cruzamento ST, porém, foi mutagênico em todos os tratamentos realizados em HB. Mais estudos devem ser feitos para melhor caracterizar os tipos de danos causados por essas drogas ao DNA.

Palavras-chave: Antidepressivos. Mutagenicidade. Recombinogenicidade. SMART. Citalopram. Escitalopram.

## ***ABSTRACT***

*The main goal of this research was to evaluate the mutagenic and recombinogenic effect of Citalopram and Escitalopram in somatic cells of Drosophila melanogaster and verify the influence of CYP450 complex enzymes in the induction of mutation and homologous recombination. Flies from the Standard (ST) and High Bioactivation (HB) crosses were used for the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). Third instar larvae of D. melanogaster obtained from both crosses (ST and HB) were fed chronically with the antidepressants drugs Citalopram or Escitalopram (0,3125 to 10 mg/mL). Both drugs were toxic in higher concentrations. The results obtained from the crosses indicated that Citalopram was mutagenic and recombinogenic only at the highest concentration tested in ST. However, it did not show any mutagenic effect when highly metabolized via CYP450 enzymes. Escitalopram was mutagenic and mainly recombinogenic in all ST treatments, but it was completely mutagenic in all HB treatments. More studies need to be done to better evaluate the DNA damage caused by these drugs.*

*Keywords: Antidepressants. Mutagenicity. Recombinogenicity. SMART. Citalopram. Escitalopram.*



## SUMÁRIO

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                    | <b>10</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                           | <b>13</b> |
| 2.1. Compostos químicos e Meio de Cultura.....                                               | 13        |
| 2.2. <i>Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in Drosophila melanogaster</i> ..... | 13        |
| 2.2.1. Linhagens de <i>Drosophila</i> .....                                                  | 13        |
| 2.2.2. Cruzamentos e Tratamentos.....                                                        | 14        |
| 2.2.3. Ensaio de Sobrevivência.....                                                          | 14        |
| 2.2.4. Preparação e Análise das Lâminas.....                                                 | 15        |
| 2.2.5. Análise Estatística.....                                                              | 15        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                        | <b>16</b> |
| <b>4. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE .....</b>                                          | <b>23</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                   | <b>23</b> |
| <b>Tabelas. ....</b>                                                                         | <b>30</b> |
| <b>Figuras. ....</b>                                                                         | <b>34</b> |
| <b>Anexo 1. ....</b>                                                                         | <b>38</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão configura-se um transtorno mental caracterizado pela perda gradual de interesse em atividades comuns, pelo sentimento de tristeza e baixa autoestima (Abelha, 2014). Estudos indicam a relação da depressão com doenças cardíacas, diabetes e hipertensão, além de ser causa comum de suicídios (Organização Mundial de Saúde, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2018), mais de 300 milhões de pessoas vivem com depressão. Considerando o aumento no número de casos e suas consequências sociais, constitui sério problema de saúde pública (Aguilar et al., 2011).

A descoberta de drogas antidepressivas no final da década de 1950 trouxe importantes avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nos transtornos depressivos, assim como possibilidades de tratamento farmacológico (Moreno et al., 1999; Ribeiro et al., 2014). De maneira geral, esses fármacos produzem aumento na concentração de neurotransmissores na fenda sináptica por meio de inibição do metabolismo, bloqueio de recaptura neuronal ou atuando nos autorreceptores pré-sinápticos (Moreno et al., 1999).

Entre as diversas classes de antidepressivos, existem os que pertencem ao grupo dos inibidores seletivos de recaptura de serotonina/noradrenalina (ISRS/SSIR), tendo como representantes Hidrobromidrato de Citalopram (**Figura 1A**) e Oxalato de Escitalopram (**Figura 1B**). Esses são preferidos no tratamento de pacientes idosos que possuem duas ou mais doenças em simultâneo e no tratamento de pacientes com transtorno de ansiedade comórbido (Moreno et al., 1999; Costa et al., 2012).

Citalopram é uma mistura racêmica 1:1 constituída pelos enantiômeros R(-) e S(+), contudo, somente o segundo é terapeuticamente ativo, além disso, possui estrutura química diferente dos outros ISRS e de qualquer outra droga antidepressiva prescrita (Sánchez et al., 2004). Seu metabolismo, em humanos, ocorre principalmente no fígado via N-desmetilação

até seu principal metabólito, desmetilcitalopram através das enzimas CYP2C19 e CYP3A4 (Bezchlibnyk-Butler et al., 2000). Outros metabólitos incluem didesmetilcitalopram via CYP2D6 e Citalopram N-oxide, via enzimas monoaminoxidase e aldeído oxidase (Bezchlibnyk-Butler et al., 2000).

Já o Escitalopram é um S-Enantiômero do Citalopram. Porém, apesar das diferenças estruturais, suas atividades farmacológicas são praticamente iguais. Seu metabolismo também ocorre no fígado pelas mesmas enzimas do complexo CYP450 transformando-o em S-desmetilcitalopram (S-DCT) e S-didesmetilcitalopram (S-DDCT) (Sánchez, 2008).

Considerando o aumento no número de casos e suas consequências sociais, depressão, constitui sério problema de saúde pública e, até o presente momento existem poucos dados referentes à indução de danos genéticos por meio de medicamentos utilizados no tratamento. Assim, faz-se necessária a avaliação do potencial genotóxico, mutagênico e recombinogênico do Escitalopram e do Citalopram com o intuito de colaborar com a comunidade científica sobre os possíveis efeitos adversos relacionados ao uso desses medicamentos.

De acordo com Battal e colaboradores (2013), drogas utilizadas no tratamento prolongado da depressão podem causar danos ao DNA. A maioria dos danos normalmente é reparada por enzimas do sistema de reparo, porém, essa habilidade diminui com o tempo (Keijzers et al., 2018). O acúmulo de danos oxidativos no DNA pode levar ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como câncer (Oberley, 2002). Estudos realizados *in vitro* com Escitalopram indicaram que o medicamento causa a troca de cromátides irmãs (SCE), porém, não foram observados aumentos estatisticamente significativos no dano ao DNA e na formação de micronúcleos (MN) durante o tratamento (Cobanoglu et al., 2017).

Estudos realizados *in vivo* por Hassanane e colaboradores (2011), com

concentrações recomendadas de Amitriptilina utilizadas no tratamento de depressão, indicaram o aumento do aparecimento de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais em células somáticas (medula óssea) e germinativas (espermátócitos), tais efeitos também foram vistos em estudos com Citalopram (Attia et al., 2013).

Verifica-se mundialmente o esforço para reduzir a utilização de mamíferos nas pesquisas toxicológicas e genéticas, principalmente no que se diz respeito ao desenvolvimento de modelos alternativos (Siddique et al., 2005). Nesse contexto, *Drosophila melanogaster* representa um inseto amplamente utilizado como modelo experimental em pesquisas científicas, principalmente em estudos de genética e biologia do desenvolvimento, tendo apreço há cerca de um século (Roberts, 2006). Além disso, a mosca destaca-se no meio científico em estudos que buscam rastrear a toxicidade e mutagenicidade de diferentes xenobióticos (Morais et al., 2017; Marcos & Carmona, 2019; Naves et al., 2019).

Dentre os testes realizados com *D. melanogaster* como organismo modelo, destaca-se o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test* - SMART), considerado um dos testes “padrão ouro” para avaliação de mutagenicidade/recombinogenicidade (Parvathi e Rajagopal, 2014). Esse teste foi desenvolvido por Graf e colaboradores. (1984) e aprimorado por Graf e van Schaik (1992). Fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que alteram o fenótipo dos pelos da asa da mosca (Graf et al., 1996; Spanó & Graf, 1998).

Diante do acima exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico do Citalopram e Escitalopram em células somáticas de *D. melanogaster* e, ainda, verificar a influência das enzimas do complexo CYP450 na indução de manchas mutantes e de recombinação homóloga.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Compostos químicos e Meio de Cultura

Os Antidepressivos, com grau de pureza farmacêutica, utilizados para as análises foram: Hidrobromidrato de Citalopram ( $C_{20}H_{21}FN_2O$  – Número CAS: 59729-33-8. Sandoz, Brasil) (**Figura 1A**) e Oxalato de Escitalopram ( $C_{20}H_{21}FN_2O$  - Número CAS: 128196-01-0. Lexapro®, Lundbeck A/S, Dinamarca), (**Figura 1B**).

Uretano (Carbamato de Etila – Número CAS: 51-76-6, Buchs, Suíça), foi utilizado como controle positivo e água ultrapura (18,2 MΩ), obtido pelo MilliQ System (Millipore, Vimodrone, Milão, Itália), como controle negativo. Purê de batata foi utilizado como meio alternativo de cultura (Yoki Alimentos S.A. - São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

### 2.2. *Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in Drosophila melanogaster*

#### 2.2.1. Linhagens de *Drosophila*

Três linhagens diferentes de moscas mutantes foram utilizadas: (i) machos *mwh* (*mwh/mwh*); (ii) fêmeas *flr<sup>3</sup>* (*flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd<sup>S</sup>*); e (iii) fêmeas *ORR; flr<sup>3</sup>* (*ORR; flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd<sup>S</sup>*). Essas linhagens mutantes foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia, ETH, da Universidade de Zürich (Schwerzenbach, Suíça). Detalhes das linhagens usadas no presente trabalho estão descritas por Graf e colaboradores (1984) e Graf e van Schaik (1992).

As linhagens mutantes foram mantidas em estufa B.O.D (*Biologic Oxygen Demand*) (Tecnal – Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.2.2. Cruzamentos e Tratamentos

Foram realizados dois cruzamentos: 1) Padrão (*Standard* – ST) que utiliza machos *mwh* e fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* (Graf et al., 1989); e 2) Cruzamento de alta bioativação metabólica (*High Bioactivation* – HB), que utiliza machos *mwh* e fêmeas virgens ORR; *flr<sup>3</sup>* (Graf e van Schaik, 1992), caracterizado por níveis constitutivos de expressão gênica de enzimas do complexo citocromo P450 (CYP6A2). Ambos os cruzamentos (ST e HB) produzem dois tipos de descendentes: moscas trans-heterozigotas marcadas (MH) e moscas heterozigotas balanceadas (BH), as quais foram analisadas para avaliar a contribuição direta de recombinação homóloga nos fenótipos observados após o tratamento.

### 2.2.3. Ensaio de Sobrevivência

Para a escolha das concentrações, foi realizado ensaio de sobrevivência, sendo selecionadas as concentrações subletais.

Para determinação da toxicidade dos antidepressivos em *D. melanogaster*, 40 larvas (3º estágio) foram transferidas para *vials* contendo meio de cultura alternativo (1,5 g de purê de batata) hidratado com 5 mL (Spanó et al., 2001) de diferentes concentrações dos antidepressivos Citalopram e Escitalopram (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5, 5 ou 10 mg/mL).

Após a eclosão dos indivíduos adultos, estes foram quantificados e a frequência foi comparada de cada tratamento foi comparada à frequência do controle negativo, utilizando o teste do Chi-quadrado, para razões de amostras independentes. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo (CN) (Machado et al., 2016; Morais et al., 2017). Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

#### **2.2.4. Preparação e Análise das Lâminas**

Os adultos emergentes após tratamento foram coletados e armazenados em frascos contendo etanol 70%. As asas foram retiradas com auxílio de pinças entomológicas e de um estereomicroscópio, e alinhadas sobre lâmina de vidro, sendo 5 pares de asas de fêmeas na parte superior e 5 pares de asas de machos na porção inferior (totalizando 10 indivíduos por lâmina). Para adesão da lamínula à lâmina, foi utilizada solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 mL de água). As lâminas após secas foram posteriormente analisadas em microscópio óptico de luz com aumento final de 400X.

#### **2.2.5. Análise Estatística**

Para avaliação do potencial genotóxico dos antidepressivos Citalopram e Escitalopram, a frequência de manchas por mosca em cada série tratada foi comparada ao controle negativo. Para tanto, foi utilizado o Teste Binomial condicional de Kastembaun e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würgler (1988), que é aplicado sobre duas hipóteses e permite a obtenção de quatro diagnósticos estatísticos. Na hipótese nula ( $H_0$ ), é determinado que não há diferença na frequência de manchas induzidas nos dois grupos e na hipótese alternativa ( $H_A$ ) é colocado um fator multiplicador ( $m$ ), em que se afirma que um dos grupos apresenta uma frequência de manchas  $m$  vezes maior ou menor do que o outro. Como as manchas simples pequenas podem apresentar alta frequência espontânea, o valor multiplicador  $m$  é fixado em 2. Para as manchas simples grandes e gêmeas, as quais apresentam uma frequência espontânea baixa, o  $m$  é estabelecido em 5 (Andrade et al., 2004).

Cada hipótese é testada para um nível de significância de 5%, sendo quatro as decisões possíveis: 1) inconclusivo (i): são aceitas ambas as hipóteses e como elas não podem ser simultaneamente verdadeiras, nenhuma conclusão pode ser tomada; 2) negativo (-): aceita  $H_0$

e rejeita  $H_A$ ; 3) positivo (+): rejeita  $H_0$  e aceita  $H_A$  e 4) fraco-positivo (f+): são rejeitadas ambas as hipóteses. Com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir os *outliers* foi efetuado o Teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würigler, 1995).

Com base nas frequências de indução de clones por  $10^{-5}$  células, a atividade recombinogênica é calculada como: frequência de mutação (FM) = frequência de clones em moscas BH / frequência de clones em moscas MH; frequência de recombinação (FR) =  $1 - FM$ . Frequência total de manchas (FT) = total de manchas observadas em moscas MH / número de moscas (Sinigaglia et al., 2006).

Comparações estatísticas de taxas de sobrevivência entre pupas e adultos, foram realizadas por meio do Teste do  $X^2$  para proporções, para amostras independentes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Citalopram é um ISRS racêmico (1:1) constituído por dois enantiômeros, um R(-) inativo e outro S(+) ativo, contudo, estudos demonstraram que o enantiômero R(-) acaba inibindo a ação do S(+) dependendo da dose utilizada, prejudicando sua eficácia no tratamento da depressão (Auquier et al., 2009; Sánchez et al., 2004). Assim, com intuito de diminuir os efeitos colaterais e potencializar os terapêuticos, o enantiômero ativo foi isolado e, posteriormente, comercializado como outra droga chamada Escitalopram (Gorman et al., 2014).

Para avaliar os efeitos dos medicamentos sobre a sobrevivência dos organismos testados, foi realizado um Ensaio de Sobrevivência, onde larvas de terceiro estágio oriundas dos cruzamentos Padrão (ST) e de Alta Bioativação (HB), foram expostas a diferentes concentrações (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL) de Citalopram e Escitalopram. A partir dos resultados obtidos, observou-se que a concentração 10 mg/mL de Citalopram, mostrou-se tóxica, diminuindo significativamente ( $p < 0,05$ ) a taxa de sobrevivência dos



indivíduos de ambos os cruzamentos (ST e HB) quando comparados ao controle negativo (**Figura 2A** e **Figura 2B**, respectivamente). Nos tratamentos realizados com Escitalopram, a concentração 10 mg/mL levou à completa mortalidade. Por outro lado, apenas a concentração 5 mg/mL de Escitalopram, foi tóxica de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) para os indivíduos do Cruzamento ST (**Figura 3A**). Não houve redução significativa para os demais tratamentos, inclusive para todas as concentrações do Cruzamento HB (**Figura 3B**).

Dessa forma, as concentrações escolhidas para a realização das análises para os dois antidepressivos, foram: 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL, pois não alteraram significativamente as taxas de sobrevivência.

Brambilla, Marttioli & Martelli (2009), revisaram os resultados obtidos em testes de genotoxicidade e carcinogenicidade realizados com 104 diferentes fármacos, sendo que 33 desses eram antidepressivos. Entre as drogas analisadas, as avaliações realizadas com o Citalopram demonstraram que a droga foi capaz de induzir *in vitro* aberrações cromossômicas em fibroblastos de pulmão de ratos chineses, além de causar mutações reversas nos genes TA98 e TA1537 de *Salmonella typhimurium*. Vale ressaltar, que Citalopram mostrou-se tanto genotóxico quanto carcinogênico nesses testes.

Medicamentos como Fluoxetina, Sertalina e Clomipramina, todos esses pertencendo à classe ISRS (assim como o Citalopram e Escitalopram, estudados no presente trabalho), foram capazes de induzir danos no DNA (Draz et al., 2009).

Por outro lado, estudos realizados por Wang e colaboradores. (2015), demonstraram que diversos antidepressivos, incluindo ISRS, efetivamente melhoram as respostas ao dano no DNA causadas por neurotoxinas e são capazes de reverter às alterações causadas durante o ciclo celular, atuando como neuroprotetores.

A partir do acima exposto, fica evidente a ausência de unanimidade a respeito dos efeitos de antidepressivos classificados como Inibidores Seletivos de Recaptura de Serotonina

(ISRS) sobre danos ao DNA. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de contribuir para a elucidação do tema e para tanto, foram avaliados os potenciais mutagênicos e recombinogênicos do Escitalopram e do Citalopram em células de asa de *Drosophila melanogaster* através do *Somatic Mutation and Recombination Test* (SMART).

O teste fundamenta-se na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que alteram o fenótipo dos pelos da asa da mosca e permite detectar mutações pontuais, deleções, algumas aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (recombinação homóloga) (Graf et al., 1996; Vogel & Zijlstra, 1987).

A análise dos indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento ST tratados com Citalopram, demonstrou que o medicamento é capaz de causar danos no DNA, resultando no aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), na frequência total de manchas mutantes em moscas tratadas com 2,5 mg/mL (**Tabela 1**). Por outro lado, a análise dos indivíduos MH do cruzamento HB, demonstrou que o medicamento não foi capaz de aumentar significativamente o total de manchas mutantes, independentemente da concentração testada (**Tabela 2**). A frequência de manchas induzidas nos diferentes cruzamentos é numericamente próxima. Provavelmente, este resultado estaria associado ao efeito inibitório do Citalopram a atividade de diversas enzimas do complexo CYP450 (Bezhlibnyk-Butler et al., 2000; Brosen & Naranjo, 2001; Cheng et al., 2012).

Estudos realizados em humanos indicaram que produtos do metabolismo do Citalopram foram tóxicos para células hepáticas, provocaram quebras na fita de DNA e a formação de micronúcleos. (Attia et al., 2013; Cooke & Waring, 2012).

De maneira antagônica, os resultados encontrados para o Citalopram neste trabalho diferem dos encontrados por Gürbüz e colaboradores (2012). Existem algumas diferenças metodológicas entre esses dois trabalhos, sendo que algumas podem estar diretamente relacionadas aos resultados divergentes entre os trabalhos. Assim, as principais serão aqui

pontuadas. De acordo com o trabalho anterior, foi utilizado Dimetilsulfóxido 1% (DMSO) como controle negativo, a frequência de manchas no controle negativo (DMSO) resultou na indução de apenas 1 mancha mutante em 20 indivíduos analisados e não é apresentada curva de sobrevivência., o que talvez demonstraria a toxicidade causada pelo uso de DMSO.

Nazir e colaboradores (2008) apontaram os diversos efeitos citotóxicos do DMSO quando utilizado acima de 0,5%. Recentemente, Galvão e colaboradores. (2013) e Cvetković e colaboradores. (2013), recomendaram que a porcentagem do solvente utilizada para dissolver drogas deveria ser menor 1% e deveria ser incluído um controle não tratado com DMSO, para avaliar a toxicidade do solvente. De acordo com resultados de trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Machado et al., 2016; Morais et al., 2017; Vasconcelos et al., 2017; Chen-Chen et al., 2018; Mendonça et al., 2019) e de outros pesquisadores (Oliveira et al., 2017; Öz & Çakir Arica, 2019) que trabalham com a mesma metodologia, a frequência basal de manchas mutantes de indivíduos tratados apenas com água *D. melanogaster* não é tão reduzida como apresentada no referido trabalho (Gürbüz et al., 2012).

A análise da progênie MH do cruzamento ST tratados com Escitalopram, demonstrou que o medicamento foi mutagênico, sendo capaz de aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ) o total de manchas mutantes em todas as concentrações analisadas quando comparadas ao controle negativo (**Tabela 3**). Resultado semelhante foi verificado no cruzamento HB (**Tabela 4**). De acordo com os resultados obtidos, o aumento no número de manchas mutantes no cruzamento HB, pode estar relacionado à maior metabolização de Escitalopram nos organismos com elevada expressão de enzimas do complexo do citocromo P450 (CYP6A2) (Graf e van Schaik, 1992).

De acordo com testes realizados em células humanas por Sánchez e colaboradores (2008), Escitalopram é convertido no fígado em S-desmetilcitalopram (S-DCT) e S-didesmetilcitalopram (S-DDCT), moléculas que possuem potencial mutagênico maior que o

próprio Escitalopram. Além disso, outro estudo indicou o efeito citotóxico e inibidor de mitoses causado por tais metabólitos (Cobanoglu et al., 2017).

As enzimas do complexo CYP450 constituem uma das principais vias de detoxificação do organismo (Guengerich, 2008). Devido à presença de diversas isoformas geradas graças aos polimorfismos genéticos (Paixão et al., 2016), pode haver a conversão nos metabólitos S-DCT e S-DDCT no organismo utilizado (*Drosophila melanogaster*). Apesar de não terem sido quantificados no presente trabalho, esses podem estar diretamente relacionados com as frequências das mutações encontradas nos experimentos (**Tabelas 3 e 4**).

Recombinação homóloga (HR) pode ser descrita como uma série de vias inter-relacionadas, que utilizam uma sequência homóloga de DNA, que pode ser a cromátide irmã ou cromossomo homólogo, como moldes no reparo de lesões severas na forquilha de replicação, agindo diretamente no reparo de quebras duplas e de ligações cruzadas intercadeias (Li & Heyer, 2008; Helleday, 2010; Delabaere et al., 2017). Entretanto, o reparo por HR pode causar alterações genéticas como: mutação pontual, deleção, translocação, perda cromossômica e não disjunção (Kaya et al., 2000).

*D. melanogaster* configura-se um excelente modelo animal para estudos de HR, pois, nesses organismos, os cromossomos homólogos estão pareados em células somáticas e pré-meióticas. Assim, as vias de reparo de quebras duplas tendem a utilizar o cromossomo homólogo como molde (Sekelsky, 2017). Além disso, nesses organismos HR dependente de Rad51 é a principal via de reparo de quebras duplas em células dividindo-se por mitose, como as células das asas analisadas no teste SMART.

Para avaliar a contribuição direta da recombinação homóloga no total de manchas (TM), foi realizada a análise dos descendentes heterozigotos-balanceados (BH), que devido às múltiplas inversões do cromossomo TM3, todos os eventos de recombinação são suprimidos, levando a célula a apoptose (Graf et al., 1984).

A quantificação de HR tratados com Citalopram foi realizada apenas para a concentração 2,5 mg/mL do cruzamento ST, pois foi a única concentração na qual a droga se mostrou mutagênica. Os resultados indicam que nessa concentração a ação do medicamento é majoritariamente recombinogênica (**Tabela 1**).

Os resultados obtidos após a análise dos descendentes BH tratados com Escitalopram demonstram que para o cruzamento ST, o medicamento foi principalmente recombinogênico nas duas concentrações maiores, porém foi mutagênico na menor concentração (**Figura 4A**). Já no cruzamento HB, a ação foi essencialmente mutagênica em todas as concentrações avaliadas (**Figura 4B**). Contudo, curiosamente, ao contrário do observado no ST, é possível observar que quanto maior a concentração, maior a mutagenicidade associada. Esses resultados indicam que, aumentado o grau de metabolismo do Escitalopram pela via do complexo CYP450, o medicamento apresenta uma mudança no padrão de dano causado ao DNA, deixando de causar quebras duplas, que seriam reparadas por HR. Por outro lado, há também a possibilidade do medicamento inibir o sistema de reparo via HR, o que talvez explique o aumento no número de manchas mutantes quantificadas após os tratamentos.

Nas últimas décadas muitos estudos evidenciaram a importância de mutações e instabilidade genômica no processo de desenvolvimento de câncer, sejam essas oriundas de erros de replicação, danos ambientais ou deficiência no reparo a danos endógenos ou exógenos. Um dos grandes responsáveis por gerar instabilidade genômica é a HR, e já foi demonstrado que pacientes cujas células exibiam aumento na frequência de recombinação, também apresentavam aumento na frequência de câncer (Bishop & Schiestl, 2000, 2001). Contudo, defeitos em genes necessários para a ocorrência de recombinação, como *BRCA1* e *BRCA2*, foram relacionados à predisposição a uma variedade de cânceres, particularmente aqueles afetando mamas e ovários (Abkevich et al., 2012; Li & Heyer, 2008; Zhao et al., 2017).

Eventos de HR podem causar perda de heterozigose (LOH) através de conversão gênica, deleção, *crossing-over* desigual e translocação. A perda de heterozigose é o resultado da perda de um alelo em uma célula, que se torna homozigota (caso haja conversão gênica) ou hemizigota (caso um alelo seja simplesmente perdido) para o alelo remanescente (Bishop & Schiestl, 2003).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que as drogas aqui testadas foram capazes de causar LOH em células das asas de *Drosophila melanogaster*, resultando no aparecimento de células com fenótipos mutantes.

Eventos de LOH podem levar ao desenvolvimento de cânceres em humanos, ao permitir a expressão de alelos recessivos ou pela mutação de supressores tumorais. Luo e colaboradores (2000) demonstraram *in vivo* que o aumento na frequência de LOH oriundas de HR constituiu o mecanismo fundamental causador da susceptibilidade a tumores em ratos.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que podem existir danos ao DNA promovidos por ISRS. De acordo com os resultados apresentados, Citalopram foi mutagênico e recombinogênico apenas na maior concentração do cruzamento ST e não houve alterações significativas nos indivíduos tratados com as demais concentrações, inclusive no HB. Já para o Escitalopram, os resultados são diferentes. Para o cruzamento ST, foi possível notar que majoritariamente o dano é por recombinação. Por outro lado, no cruzamento HB as manchas mutantes foram induzidas essencialmente por processos mutagênicos.

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que, apesar das drogas serem enantiômeros e apresentam farmacologicamente as mesmas atividades (Sánchez, 2008), originam danos diferentes ao DNA. Os produtos da metabolização do Citalopram, assim como a própria droga, demonstraram menor potencial mutagênico (**Tabelas 1 e 2**) que o Escitalopram e seus metabólitos (**Tabelas 3 e 4**). Ainda, de acordo com os resultados obtidos

pode-se dizer que o aumento da conversão do Escitalopram, pode ser responsável por alterar a natureza do dano ou interferir no sistema de reparo por HR.

Como estes efeitos estão relacionados ao desenvolvimento de tumores em diversos organismos, incluindo humanos, mais estudos devem ser realizados para melhor caracterizar as consequências dos danos causados pelo uso de ISRS ao DNA.

#### **4. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

#### **5. REFERÊNCIAS**

Abelha, L. (2014). Depressão, uma questão de saúde pública. *Cadernos Saúde Coletiva*, 22(3), 223-223. doi: 10.1590/1414-462X201400030001.

Abkevich, V., Timms, K. M., Hennessy, B. T., Potter, J., et al. (2012). Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *British journal of câncer*, 107(10), 1776–1782. doi: 10.1038/bjc.2012.451.

Amoretty, P.R., Padilha, K.P., Freitas, R.T. de, Bruno, R.V. (2013). Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *Acta Sentia & Technicae*, 1(1), 87-98.

Andrade, R., Reguly, L., Lehmann, M. (2003). Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). *Humana Press*, 389-412. doi: 10.1385/1-59259-665-7:389.

Attia, S. M., Ashour, A.E. and Bakheet, S.A. (2013). Comet- FISH studies for evaluation of genetic damage of citalopram in somatic cells of the mouse. *Journal of Applied. Toxicology*, 33, 901-905. doi: 10.1002/jat.2859.

Auquier, P., Robitail, S., Llorca, P., Rive, S. (2009). Comparison of escitalopram and citalopram efficacy: A meta-analysis. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 7(4), 259-268. doi: 10.1080/13651500310003408.

Battal, D., Aktas, A., Sungur, M. A., Kadioglu, E., et al. (2013). In Vivo Genotoxicity Assessment of Sertraline by Using Alkaline Comet Assay and the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 113, 339-346. doi: 10.1111/bcpt.12095.

Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H. (2000). Homologous recombination as a mechanism for

genome rearrangements: environmental and genetic effects. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2427-2334. doi: 10.1093/hmg/9.16.2427.

Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H. (2001). Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Reviews on Cancer*, 1471(3), 109-121. doi: 10.1016/S0304-419X(01)00018-X.

Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H. (2003). Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*, 74(2), 94-105. doi: 10.1016/S0014-4800(03)00010-8.

Bezchlibnyk, K., Aleksic, I., Kennedy, S.H. (2000). Citalopram--a review of pharmacological and clinical effects. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 25(3), 241-54.

Brambilla, G., Mattioli, F., Martelli, A. (2009). Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology*, 261(3), 77-88. doi: 10.1016/j.tox.2009.04.056.

Brosen, K., Naranjo, C.A. (2001). Review of pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction studies with citalopram. *European Neuropsychopharmacology*, 11(4), 275-83. doi: 10.1016/s0924-977x(01)00101-8.

Chen-Chen, L., Carvalho, C.J.S., Filho, A.M., Vêras, J., et al. (2019). Toxicity and genotoxicity induced by abacavir antiretroviral medication alone or in combination with zidovudine and/or lamivudine in *Drosophila melanogaster*. *Human & Experimental Toxicology*, 38(4), 446–454. doi: 10.1177/0960327118818248.

Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., et al. (2012). AmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(11), 3099-105. doi: 10.1021/ci300367a.

Cooke, M.J., Waring, W.S. (2013). Citalopram and cardiac toxicity. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 69(4), 755–760. doi: 10.1007/s00228-012-1408-1.

Costa, F.H.R. (2012). Depression in Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 12, 617-620. doi: 10.1590/S0004-282X2012000800011.

Cobanoglu, H., Mahmut, C., Akin, Ç., Munevver, C. (2017). In vitro genotoxic and cytotoxic effects of doxepin and escitalopram on human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 238-244. doi: 10.1080/01480545.2017.1365885.

Cvetković, V.J, Mitrović, T.L., Jovanović, B., Stamenković, S.S., et al. (2015). Toxicity of dimethyl sulfoxide against *Drosophila melanogaster*. *Biologica Nyssana*, 6(2), 91-95.

Delabaere, L., Ertl, H. A., Massey, D. J., Hofley, C. M., et al. (2017). Aging impairs double-strand break repair by homologous recombination in *Drosophila* germ cells. *Aging cell*, 16(2), 320–328. doi: 10.1111/accel.12556.

Draz, E., Draz, E., Khaled, A., Khaled, S., et al. (2009). Genotoxicity of some commonly used antidepressants (Fluoxetine, Sertraline and Clomipramine). *Mansoura Journal of forensic medicine and clinical toxicology*, 8(2), 63-78.



Frei, H., Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, 203, 297–308. doi: 10.1016/0165-1161(88)90019-2.

Frei, H., Würgler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, 334, 247–258. doi: 10.1016/0165-1161(95)90018-7.

Frölich, A., Würgler, F.E. (1990). *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 234, 71-80. doi: 10.1016/0165-1161(90)90033-K.

Galvão, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., et al. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317-1330. doi: 10.1096/fj.13-235440.

Gorman, J.C., Korotzer, A., Su, G. (2014). Efficacy Comparison of Escitalopram and Citalopram in the Treatment of Major Depressive Disorder: Pooled Analysis of Placebo-Controlled Trials. *CNS Spectrums*, 7(S1), 40-44. doi: 10.1017/S1092852900028595.

Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J., et al. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 222, 359-373. doi: 10.1016/0165-1218(89)90112-2.

Graf, U., Spanó, M.A., Rincón, J.G., Abraham, S.K., et al. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*, 6, 9-13.

Graf, U., van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 8, 59-67. doi: 10.1016/0165-1161(92)90032-H.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., et al. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6, 153-188. doi: 10.1002/em.2860060206.

Guengerich, F. P. (2008). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 70- 83. doi: 10.1021/tx700079z.

Gürbüz, M.O., Elif, K.H., Halici, Z., Gulec, M. (2012). Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 748(1–2), 17-20. doi: 10.1016/j.mrgentox.2.

Hassanane, M.S, Hafiz, N., Radwan, W., El-Ghor, A.A. (2012). Genotoxic evaluation for the tricyclic antidepressant drug, amitriptyline. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(4), 450-455. doi: 10.3109/01480545.2011.642382.

Helleday, T. (2010). Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*, 31(6), 955–960. doi: 10.1093/carcin/bgq064.

Kastenbaun, M. A. Bowman, K. O. (1970) .Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9, 527–549. doi: 10.1016/0027-5107(70)90038-2.

Kaya, B.A. Yanikoglu, A. Creus, R.M. (2000). Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 465, 77-84. doi: 10.1016/S1383-5718(99)00214-4.

Keijzers, G., Bakula, D., Scheibye-Knudsen, M. (2018). Monogenic Diseases of DNA Repair. *The New England Journal of Medicine*, 377(19), 1868-1876. doi: 10.1056/NEJMr1703366.

Li, X., Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research*, 18(1), 99–113. doi: 10.1038/cr.2008.1.

Luo, G., Santoro, I., McDaniel, L., et al. (2000). Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination in Bloom mice. *Nature Genetics*, 26, 424–429. doi: 10.1038/82548.

Machado, N.M., de Rezende, A.A.A., Nepomuceno, J.C., Tavares, D.C., et al. (2016). Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 226-233. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.005.

Marcos, R., Carmona, E.R. (2019). The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays for Detecting Genotoxicity in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology*, 2031. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3\_23.

Mendonça, T.P., Aquino, D., Mendes, D., Campos, C.F., et al. (2016). Genotoxic and mutagenic assessment of spinosad using bioassays with *Tradescantia pallida* and *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 222, 503-510. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.182.

Morais, C.R., Carvalho, S.M.A., Carvalho, N.M.P., Araújo, G.R., de Rezende, A.A.A., et al. (2017). Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiamethoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 187, 163-172. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.108.

Moreno, R.A., Moreno, D.H., Soares, M.B.M. (1999). Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 21, 24-40. doi: 10.1590/S1516-44461999000500006.

Munerato, M.C., Sinigaglia, M., Regul, M. Luíza, Andrade, H.H.R. (2005). Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582 (1–2), 87-94. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.01.001.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Escitalopram, CID=146570. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Escitalopram> (Acessado 25 de

Novembro de 2019)

Naves, M.P.C., Morais, C, R., Silva, A.C.A, Dantas, N.O., et al. (2018). Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 112, 273–281. doi: 10.1016/j.fct.2017.12.040.

Naves, M.P.C., Spanó, M.A., de Rezende A.A.A. (2019). Mutagenicity and recombinogenicity evaluation of bupropion hydrochloride and trazodone hydrochloride in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 131. doi: 10.1016/j.fct.2019.06.004.

Nazir, A., Mukhopadhyay, Saxena, I.D.K., Chowdhuri, D.K. (2003). Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. Toxicology Mechanisms and Methods, 13(2), 147-152. doi: 10.1080/15376510309846.

Paixão, C. S., Santos, M.O., D'Ávila, V.G., Ternes, Y.M.F., Santos, R.S. (2016). Polimorfismos genéticos da família citocromo P450 e o câncer. Saúde & Ciência em Ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde, 3(1). <https://revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/download/239/181> (Acessado 10 de Dezembro de 2019)

Oberley, T.D. (2002). Oxidative Damage and Cancer. The American Journal of Pathology, 160(2), 403-408. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64857-2.

Oliveira, V.C., Constante, S.A.R., Orsolin, P.C., Nepomuceno, J.C., et al. (2017). Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. Food Chemical Toxicology, 106, 283-291. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.052.

Öz, S., Çakir, A.Ş. (2019). The genoprotective effect of *Crucius sativus* L. (Saffron) extract on Doxorubicin-Induced Genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. Fresenius Environmental Bulletin, 28, 2545-2552.

Pan American Health Organization (PAHO). (2018). Com depressão no topo da lista de causas de problemas de saúde, OMS lança a campanha “Vamos conversar”. Pan American Health Organization Washington, United States of America. <https://www.paho.org/bra> (Acessado em 10 de dezembro de 2019)

Parvathi, V.D., Rajagopal, K. (2014). Nanotoxicology testing: Potential of *Drosophila* in toxicity assessment of nanomaterials. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 5, 25-35.

Rezende, A.A.A. de, Silva, M.L.A., Tavares, D.C., Cunha, W.R., et al. (2011). The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 49, 1235–1241. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.001.

Rezende, A.A.A de, Munari, C.C., Oliveira, P.F., Ferreira, N.H., et al. (2013). A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. Food and Chemical Toxicology, 55, 645-52. doi:

10.1016/j.fct.2013.01.050.

Ribeiro, A.G., Cruz, L.P., Marchi, K.C., Tirapeli, C.R., et al. (2014). Antidepressants: use, adherence and awareness among medical students. *Ciência & Saúde Coletiva*, 19, 1825-1833. doi: 10.1590/1413-81232014196.06332013.

Roberts, D.B. (2006). *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121, 93–103. doi: 10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x.

Sánchez, C., Bøgesø, K.P., Ebert, B., Reins, E.H., et al. (2004). Escitalopram versus citalopram: the surprising role of the R-enantiomer. *Psychopharmacology*, 174(2), 163-176. doi: 10.1007/s00213-004-1865-z.

Sánchez, C. (2008). The pharmacology of citalopram enantiomers: the antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram. *Basic Clinical Pharmacologic Toxicology*, 99(2), 91-95. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_295.x.

Schaik, N. van, Graf, U. (1993). Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants and related compounds in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 286(2), 155-163. doi: 10.1016/0027-5107(93)90179-J.

Sekelsky J. (2017). DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics*, 205(2), 471–490. doi: 10.1534/genetics.116.186759.

Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K., Dhawan, A. (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 20, 285-290. doi: 10.1093/mutage/gei032.

Sinigaglia M., Lehmann, M., Baumgardt, P., Amoral, V.S., et al. (2006). Vanillin as a modulator agent in SMART test: inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutation Research*, 607, 225-230. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.012.

Spanó, MA, Frei H, Würzler FE, Graf U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16, 385-394. doi: 10.1093/mutage/16.5.385.

Vasconcelos, M.A., Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., Spanó, M.A. (2017). Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 101, 1-7. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.028.

Vogel, E.W., Zijlstra, J.A. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 182(5), 243-264. doi: 10.1016/0165-1161(87)90010-0.

Wang Y, Hilton BA, Cui K, Zhu M.Y. (2015). Effects of antidepressants on DSP4/CPT-induced DNA damage response in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurotoxicity research*,

28(2), 154-170. doi: 10.1007/s12640-015-9534-z.

Zhao, E.Y., Shen Y., Pleasance, E., Kasaian, K., et al. (2017). Homologous Recombination Deficiency and Platinum-Based Therapy Outcomes in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(24), 7521-7530. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1941.

## Tabelas

**Tabela 1.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento Padrão (ST), tratados com Água ultrapura e Uretano 10 mM (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de Citalopram.

| Genótipos e<br>Concentração (mM)      | Nº de<br>Indiv.<br>(N) | Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup> |                                                |                    |                    | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>(n) | Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup><br>células <sup>d</sup> |                    | Recombinação<br>(%) |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                       |                        | MSP<br>(1-2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                       | MSG<br>(>2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 | MG<br><i>m</i> = 5 | TM<br><i>m</i> = 2 |                                                    | Observado                                                                | Controle Corrigido |                     |
|                                       |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |                     |
|                                       |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |                     |
| <b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b>     |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                           | 40                     | 0,45 (18)                                                             | 0,05 (02)                                      | 0,00 (00)          | 0,50 (20)          | 18                                                 | 0,92                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                           | 40                     | 2,13 (85) +                                                           | 0,23 (09) +                                    | 0,10 (04) i        | 2,45 (98) +        | 93                                                 | 4,71                                                                     | 3,79               | 9,77                |
| 0,625                                 | 40                     | 0,28 (11) -                                                           | 0,23 (09) +                                    | 0,05 (02) i        | 0,55 (22) -        | 18                                                 | 0,92                                                                     | 0,00               |                     |
| 1,25                                  | 40                     | 0,38 (15) +                                                           | 0,20 (08) i                                    | 0,00 (00) i        | 0,58 (23) -        | 23                                                 | 1,18                                                                     | 0,26               |                     |
| 2,5                                   | 40                     | 0,58 (23) i                                                           | 0,23 (09) +                                    | 0,03 (01) i        | 0,83 (33) +        | 29                                                 | 1,48                                                                     | 0,55               | 64                  |
| <b><i>mwh/TM3, Bd<sup>e</sup></i></b> |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                           | 40                     | 0,30 (12)                                                             | 0,05 (02)                                      | e                  | 0,35(14)           | 14                                                 | 0,72                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                           | 40                     | 2,03 (81) +                                                           | 0,05 (02) i                                    |                    | 2,08 (83) +        | 83                                                 | 4,25                                                                     | 3,53               |                     |
| 2,5                                   | 40                     | 0,29 (09) -                                                           | 0,29 (09) -                                    |                    | 0,45 (18) i        | 18                                                 | 0,92                                                                     | 0,20               |                     |

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (p<0,05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr<sup>3</sup>*.

**Tabela 2.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultrapura e Uretano 10 mM (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de Citalopram.

| Genótipos e<br>Concentração (mM)  | Nº de<br>Indiv.<br>(N) | Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup> |                                                |                    |                    | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>(n) | Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup><br>células <sup>d</sup> |                    |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|                                   |                        | MSP<br>(1-2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                       | MSG<br>(>2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 | MG<br><i>m</i> = 5 | TM<br><i>m</i> = 2 |                                                    | Observado                                                                | Controle Corrigido |
|                                   |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |
| <b><i>mwh/flr<sup>3</sup></i></b> |                        |                                                                       |                                                |                    |                    |                                                    |                                                                          |                    |
| Contr. Neg.                       | 40                     | 0,58 (23)                                                             | 0,03 (01)                                      | 0,03 (01)          | 0,63 (25)          | 24                                                 | 1,23                                                                     |                    |
| Contr. Pos.                       | 40                     | 9,33 (373) +                                                          | 0,75 (30) +                                    | 1,20 (48) i        | 11,28 (451) +      | 437                                                | 22,39                                                                    | 21,16              |
| 0,625                             | 40                     | 0,28 (15) -                                                           | 0,18 (07) +                                    | 0,05 (02) i        | 0,60 (24) -        | 22                                                 | 1,13                                                                     | -0,10              |
| 1,25                              | 40                     | 0,68 (23) -                                                           | 0,08 (03) i                                    | 0,03 (03) i        | 0,725 (29) -       | 26                                                 | 1,33                                                                     | 0,10               |
| 2,5                               | 40                     | 0,35 (14) -                                                           | 0,20 (08) +                                    | 0,08 (03) i        | 0,625 (28) -       | 25                                                 | 1,29                                                                     | 0,05               |

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (p<0,05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr<sup>3</sup>*.

**Tabela 3.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento Padrão (ST), tratados com Água ultrapura e Uretano 10 mM (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de Escitalopram.

| Genótipos e<br>Concentração (mM) | Nº de<br>Indiv.<br>( <i>N</i> ) | Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup> |                                                |                        |                        | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>( <i>n</i> ) | Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup><br>células <sup>d</sup> |                    | Recombinação<br>(%) |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                  |                                 | MSP<br>(1-2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                       | MSG<br>(>2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 | MG<br><br><i>m</i> = 5 | TM<br><br><i>m</i> = 2 |                                                             | Observado                                                                | Controle Corrigido |                     |
|                                  |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| <i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>      |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                      | 40                              | 0,43 (17)                                                             | 0,03 (01)                                      | 0,00 (00)              | 0,45 (18)              | 17                                                          | 0,87                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                      | 40                              | 2,58 (103) +                                                          | 0,35 (14) +                                    | 0,25 (10) +            | 3,18 (127) +           | 125                                                         | 6,35                                                                     | 5,48               | 43,46               |
| 0,625                            | 40                              | 0,45 (18) -                                                           | 0,40 (16) +                                    | 0,03 (01) i            | 0,88 (35) +            | 32                                                          | 1,64                                                                     | 0,77               | 20                  |
| 1,25                             | 40                              | 1,45 (58) +                                                           | 0,43 (17) +                                    | 0,05 (02) i            | 1,93 (77) +            | 73                                                          | 3,74                                                                     | 2,87               | 82                  |
| 2,5                              | 40                              | 0,68 (27) i                                                           | 0,25 (10) +                                    | 0,03 (01) i            | 0,95 (38) +            | 37                                                          | 1,90                                                                     | 1,02               | 90                  |
| <i>mwh/TM3, Bd</i> <sup>s</sup>  |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                      | 40                              | 0,35(14)                                                              | 0,03 (01)                                      | e                      | 0,38 (15)              | 15                                                          | 0,77                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                      | 40                              | 1,63 (65) +                                                           | 0,13 (05) +                                    |                        | 1,75 (70) +            | 70                                                          | 3,59                                                                     | 2,82               |                     |
| 0,625                            | 40                              | 0,65 (26) +                                                           | 0,03 (01) i                                    |                        | 0,68 (27) +            | 27                                                          | 1,38                                                                     | 0,61               |                     |
| 1,25                             | 40                              | 0,55 (22) i                                                           | 0,00 (00) i                                    |                        | 0,55 (22) i            | 22                                                          | 1,23                                                                     | 0,50               |                     |
| 2,5                              | 40                              | 0,33 (13) i                                                           | 0,10 (04) +                                    |                        | 0,43 (17) +            | 17                                                          | 0,87                                                                     | 0,10               |                     |

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würdler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (p<0,05).

<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr<sup>3</sup>*.



**Tabela 4.** Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano 10 mM (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de Escitalopram.

| Genótipos e<br>Concentração (mM) | Nº de<br>Indiv.<br>( <i>N</i> ) | Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup> |                                                |                        |                        | Total<br>manchas<br><i>mwh</i> <sup>c</sup><br>( <i>n</i> ) | Frequência de formação de clones/10 <sup>5</sup><br>células <sup>d</sup> |                    | Recombinação<br>(%) |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                  |                                 | MSP<br>(1-2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 2                       | MSG<br>(>2 cells) <sup>b</sup><br><i>m</i> = 5 | MG<br><br><i>m</i> = 5 | TM<br><br><i>m</i> = 2 |                                                             | Observado                                                                | Controle Corrigido |                     |
|                                  |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| <i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>      |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                      | 40                              | 0,43 (17)                                                             | 0,05 (02)                                      | 0,03 (01)              | 0,50 (20)              | 20                                                          | 1,02                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                      | 40                              | 13,93 (557) +                                                         | 1,98 (79) +                                    | 1,08 (43) +            | 16,98 (679) +          | 656                                                         | 34,8                                                                     | 33,78              | 35                  |
| 0,625                            | 40                              | 0,75 (30) i                                                           | 0,40 (16) +                                    | 0,13 (05) i            | 1,28 (51) +            | 51                                                          | 2,61                                                                     | 1,59               | 44                  |
| 1,25                             | 40                              | 0,88 (35) i                                                           | 0,33 (13) +                                    | 0,03 (01) i            | 1,23 (49) +            | 46                                                          | 2,36                                                                     | 1,33               | 26                  |
| 2,5                              | 40                              | 1,05 (42) i                                                           | 0,05 (02) i                                    | 0,03 (01) i            | 1,13 (45) +            | 45                                                          | 2,30                                                                     | 1,28               | 11                  |
| <i>mwh/TM3, Bd</i> <sup>5</sup>  |                                 |                                                                       |                                                |                        |                        |                                                             |                                                                          |                    |                     |
| Contr. Neg.                      | 40                              | 0,40 (16)                                                             | 0,03 (01)                                      | e                      | 0,43 (17)              | 17                                                          | 0,87                                                                     |                    |                     |
| Contr. Pos.                      | 40                              | 10,63 (425) +                                                         | 0,48 (19) +                                    |                        | 11,10 (444) +          | 444                                                         | 22,74                                                                    | 21,74              |                     |
| 0,625                            | 40                              | 0,75 (30) +                                                           | 0,08 (03) i                                    |                        | 0,83 (33) +            | 33                                                          |                                                                          |                    |                     |
| 1,25                             | 40                              | 0,85 (34) +                                                           | 0,03 (01) i                                    |                        | 0,88 (35) +            | 35                                                          |                                                                          |                    |                     |
| 2,5                              | 40                              | 0,88 (35) +                                                           | 0,08 (03) i                                    |                        | 0,95 (38) +            | 38                                                          |                                                                          |                    |                     |

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o respectivo controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (p<0.05).

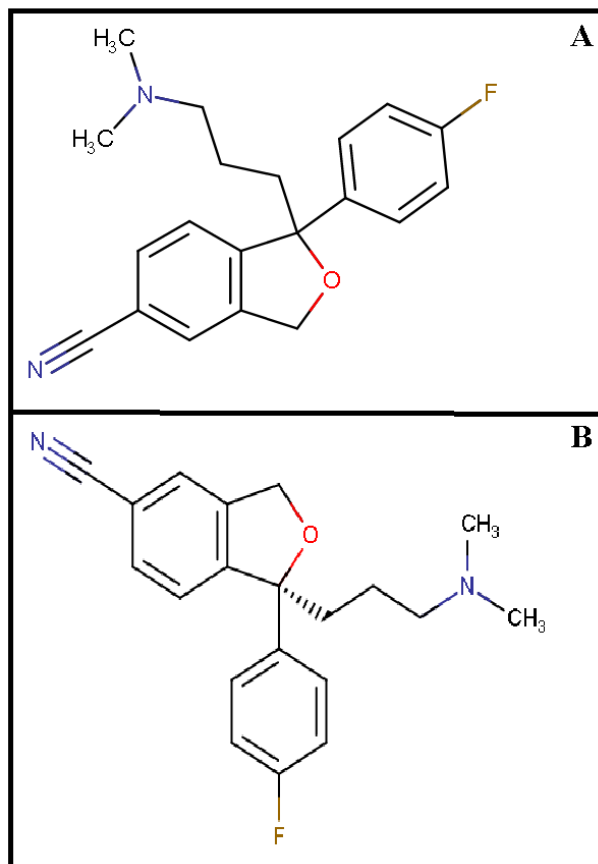
<sup>b</sup> Incluindo raras manchas simples *flr<sup>3</sup>*.

<sup>c</sup> Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

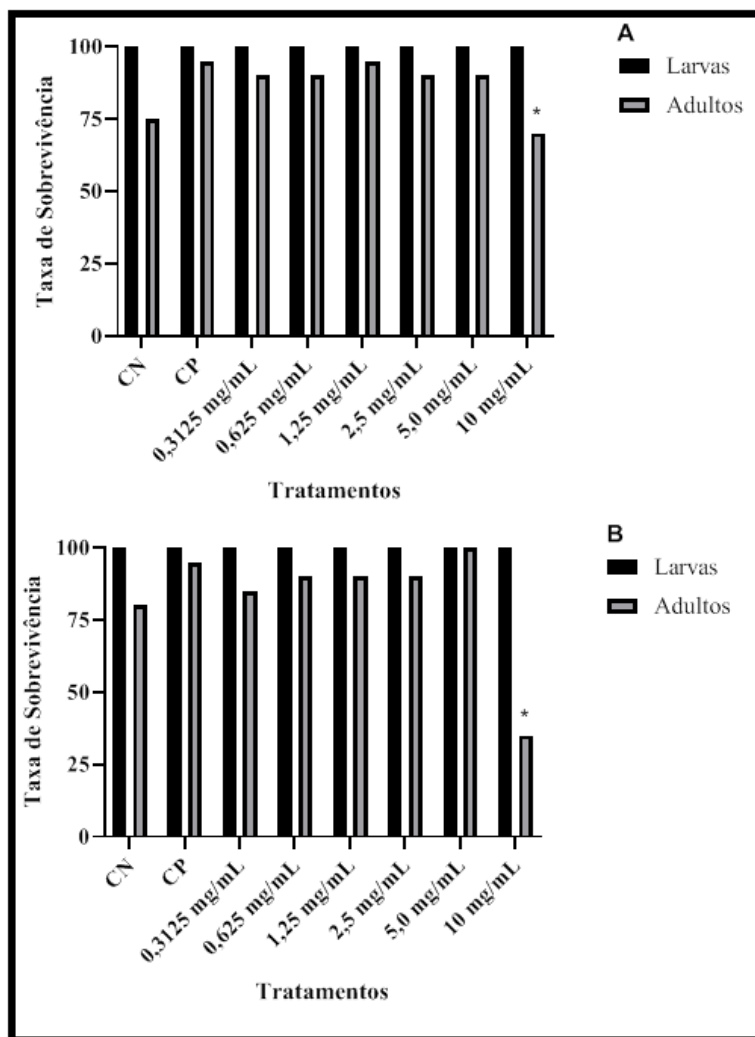
<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr<sup>3</sup>*.

## Figuras

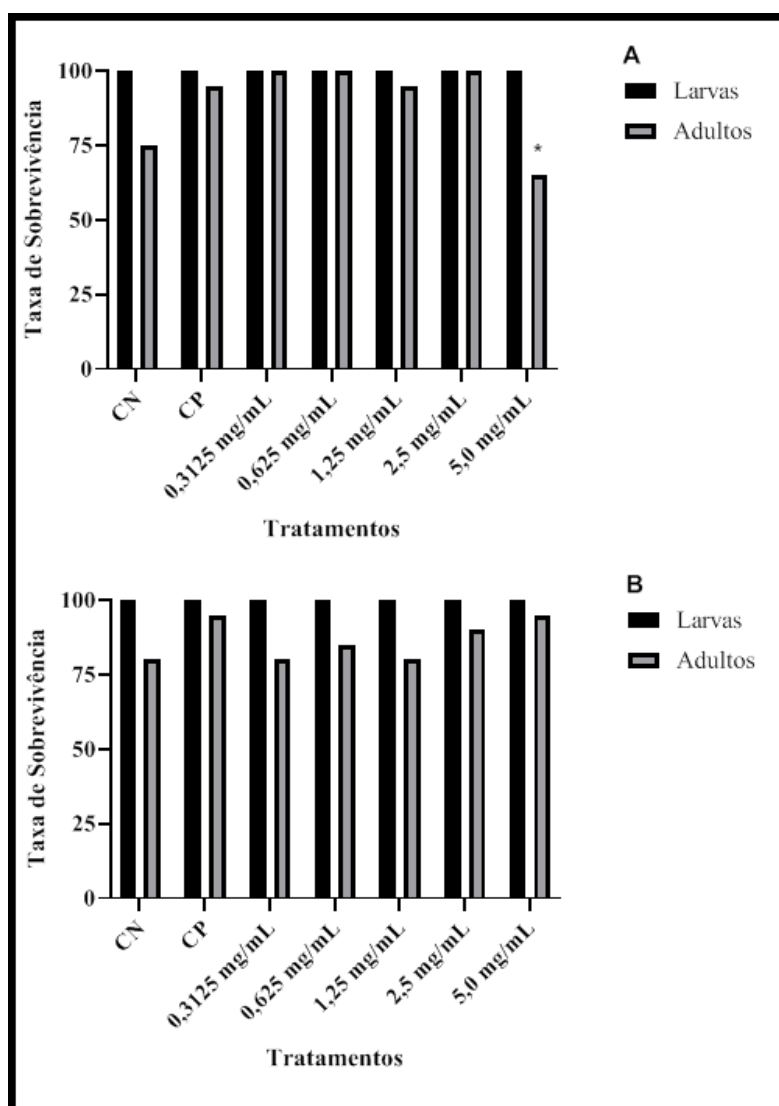


**Figura 1.** Fórmula estrutural do Citalopram (A) (Fonte: <https://www.drugbank.ca/structures/DB00215/image.svg>). Fórmula estrutural do Escitalopram (B) (Fonte: <https://www.drugbank.ca/structures/DB01175/image.svg>).



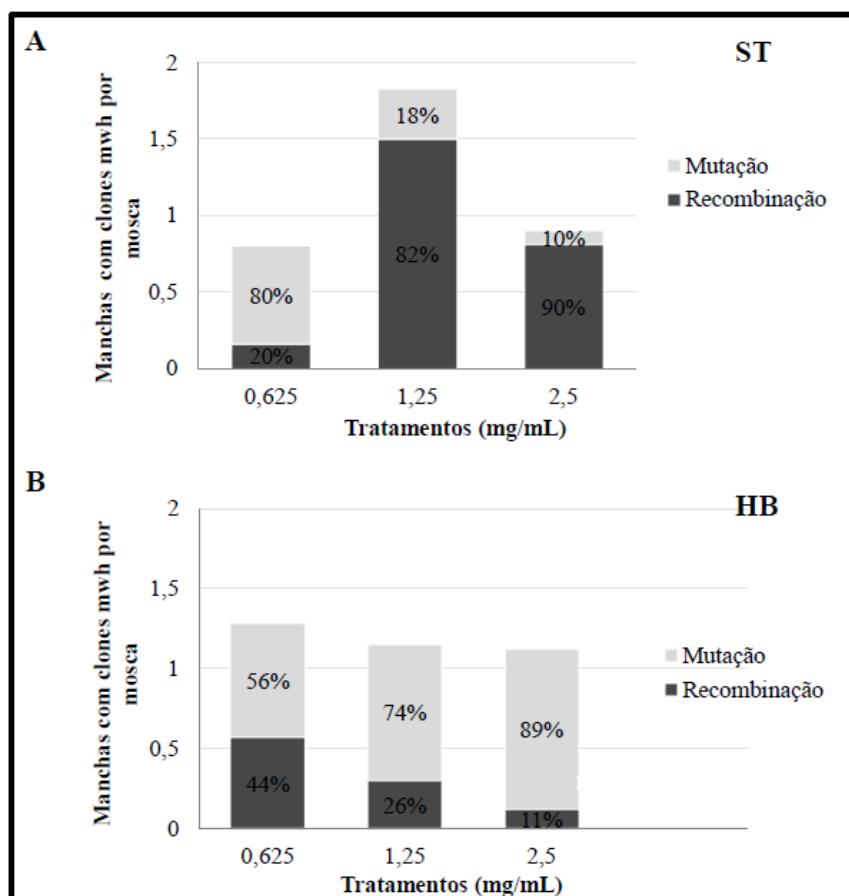
**Figura 2.** Taxa de Sobrevivência (%) dos indivíduos dos cruzamentos ST (A) e HB (B) tratados com diferentes concentrações de Citalopram.

\* Concentrações com diminuição significativa na taxa de sobreviventes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Taxa de Sobrevivência (%) dos indivíduos dos cruzamentos ST (A) e HB (B) tratados com diferentes concentrações de Escitalopram.

\* Concentrações com diminuição significativa na taxa de sobreviventes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Contribuição (%) de Recombinação e Mutação pela frequência total de Manchas observadas em indivíduos MH dos cruzamentos ST (A) e HB (B) tratados com diferentes concentrações de Escitalopram.

## **Anexo 1.**

### **Normas da revista Food and Chemical Toxicology**

#### **GUIDE FOR AUTHORS: PREPARATION**

##### **NEW SUBMISSIONS**

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

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

##### **References**

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

##### **Formatting requirements**

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

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

Divide the article into clearly defined sections.

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

##### **Figures and tables embedded in text**

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

### **Peer review**

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

## **REVISED SUBMISSIONS**

### **Use of word processing software**

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

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

### **Article structure**

#### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

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

### **Introduction**

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

### **Material and methods**

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a

reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

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

### **Conclusions**

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

### **Essential title page information**

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

### **Highlights**

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the



discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

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

### **Graphical abstract**

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

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

### **Keywords**

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

### **Abbreviations**

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

### **Acknowledgements**

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

### **Nomenclature and units**

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

### **Footnotes**

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

### **Artwork**

#### **Electronic artwork General points**

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

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

### **Formats**

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

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

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum

of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

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

**Please do not:**

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

**Color artwork**

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

**Figure captions**

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

**Tables**

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

**References**

**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should

follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Reference links**

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

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

### **Data references**

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

### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

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

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

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

### **Reference formatting**

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

#### **Reference style**

##### **Text: All citations in the text should refer to:**

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

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

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

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

#### **Examples:**

##### **Reference to a journal publication:**

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

##### **Reference to a journal publication with an article number:**

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

**Reference to a book:**

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

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

**Reference to a website:**

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

**Reference to a dataset:**

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

**Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

**Video**

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

please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

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

### **Research data**

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

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

### **Data linking**

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

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you

can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

### **Mendeley Data**

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

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### **Data in Brief**

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

### **MethodsX**

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of



their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

### **Data statement**

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

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Online proof correction**

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

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

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

#### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via

the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

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

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.