



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Carolline Guimarães D'Assunção

**Expressão dos receptores de melatonina e prolactina em ovários de ratas
prenhes após tratamento associativo com metformina e melatonina para a
Síndrome dos Ovários Policísticos**

RECIFE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CAROLLINE GUIMARÃES D'ASSUNÇÃO

**“EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA E PROLACTINA EM
OVÁRIOS DE RATAS PRENHES APÓS TRATAMENTO ASSOCIATIVO COM
METFORMINA E MELATONINA PARA A SÍNDROME DOS OVÁRIOS
POLICÍSTICOS”**

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

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

RECIFE, 2015

Ficha Catalográfica

D231e D'assunção, Carolline Guimarães

Expressão dos receptores de melatonina e prolactina em ovários de ratas prenhes após tratamento associativo com metformina e melatonina para a Síndrome dos Ovários Policísticos / Carolline Guimarães D'assunção. -- Recife, 2015.

83 f.: il.

Orientador (a): Valéria Wanderley Teixeira.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.

Referências.

1. Melatonina 2. Prolactina 3. SOP 4. Metformina
5. Rato – Gestação I. Teixeira, Valéria Wanderley, orientadora
II. Título

CDD 591.4

CAROLLINE GUIMARÃES D'ASSUNÇÃO

**“EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA E PROLACTINA EM
OVÁRIOS DE RATAS PRENHES APÓS TRATAMENTO ASSOCIATIVO COM
METFORMINA E MELATONINA PARA A SÍNDROME DOS OVÁRIOS
POLICÍSTICOS”**

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - Orientadora

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho - UFRPE

Prof. Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório – UFCG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor e dedicação para comigo, por terem sido a peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou.

A minha família e amigos pelo carinho e apoio concedido em todos os momentos que precisei.

AGRADECIMENTOS

Durante o período do Mestrado, muitas histórias aconteceram e pessoas especiais fizeram parte delas. Neste momento, necessito agradecê-las por tal contribuição.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

Ao meu pai, Geraldo, por ter me ajudado e sempre acreditado no meu potencial, me aconselhando da melhor forma possível, e a minha mãe Kátia, por ser tão dedicada, amiga, e a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho;

A minha irmã Camilla, por sempre ter estado comigo me ajudando, a sua maneira, em todos os momentos que precisei;

Agradeço a toda minha família, por todo amor e compreensão que sempre me concederam.

Aos meus orientadores, Dr^a Valéria Wanderley Teixeira e Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, primeiramente por terem me concedido a oportunidade da vivência em seu laboratório, me orientando, desde o período da graduação, e também pela ajuda, compreensão, paciência, amizade, conselhos e principalmente conhecimentos concedidos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço também a meu co-orientador Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, pela ajuda em todos os momentos no desenvolvimento da pesquisa e a Diogo Farias, que foi peça fundamental para conclusão dessa etapa;

A todos do Laboratório de Histologia, em especial a Fernanda Ângelo por todo ensinamento, a Cintia Giselle (Cinti) Solange Bezerra (Sole), Ismaela Melo, Welma Emídio, Aline Mariano, e Hilda Michelle, por todo apoio, e por tornarem meus dias mais felizes, assim como Clovis, Jeanine, Frankilin,

Thiago, Cristiane, Marina e Raionir por toda ajuda, amizade, e momentos de brincadeiras e trabalhos árduos no laboratório;

A Radamés e Prof Romildo por toda ajuda matemática;

Agradeço aos amigos da graduação, que juntamente continuaram nessa jornada especialmente a Rebeka Alves (Rebalvinha), Bruna, e Fernanda Miguel, por serem amigos de todas as horas. Sem vocês a trajetória não teria sido tão prazerosa;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal pela consecção do espaço físico e dos animais para a realização do projeto;

A CAPES pela consecção da bolsa;

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado meu eterno AGRADECIMENTO.

RESUMO

Na síndrome dos ovários policísticos (SOP) a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação crônica, mas também a diminuição dos oócitos e a qualidade do embrião, induzidos pelo estresse oxidativo. Assim, a melatonina associada a tratamentos pré-existentes, como a metformina, pode ser considerada uma alternativa terapêutica para o tratamento da SOP, pois exerce efeitos diretos sobre o sistema reprodutor feminino atuando através de receptores específicos, como o Mel_{1a}, encontrados na superfície de diferentes células ovarianas. Além disso, sabe-se que esta indolamina exerce influência na produção e liberação de prolactina, hormônio encontrado em níveis elevados na SOP. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da administração da melatonina associada ou não a metformina sobre a expressão dos receptores de melatonina (Mel_{1a}) e prolactina (PRLR) em ovários, durante a gestação em ratas, após tratamento para a SOP. Para isso foram utilizadas 75 ratas albinas divididas em 5 grupos: I- ratas sem indução da policistose ovariana (Controle); II - ratas induzidas a policistose ovariana e tratadas com placebo (SOP + Placebo); III - ratas induzidas a policistose ovariana e tratadas com melatonina por 10 dias (SOP + Mel); IV - ratas induzidas a policistose ovariana e tratadas com metformina por 10 dias (SOP + Met); V - ratas induzidas a policistose ovariana tratadas com melatonina e metformina por 10 dias (SOP + Mel + Met). A confirmação da SOP foi realizada mediante imagens ultrassonográficas. Ao final dos tratamentos as fêmeas foram acasaladas e aos 7, 14 e 21 dias de prenhez foram submetidas à eutanásia para coleta dos ovários e extração do mRNA para análise da expressão relativa por Real Time PCR dos receptores de Mel_{1a} e PRLR. Os resultados demonstraram que os níveis de expressão do receptor Mel_{1a}, observando-se o grupo controle, apresentam diminuição gradual ao longo da gestação, contrariamente ao receptor de prolactina (PRL-II) que aumenta no final desse período. Além disso, a expressão do receptor Mel_{1a} foi semelhante a do grupo controle (Grupo I) quando os animais foram tratados com a associação da melatonina e metformina ou apenas com metformina. Já os níveis do receptor PRL-II apresentaram-se semelhantes,

com acentuada diminuição no terço médio da gestação, nos animais dos grupos tratados separadamente, ou seja, com as monoterapias, ou com a associação. Assim é possível concluir que a associação da metformina com a melatonina pode regular a expressão dos receptores Mel1a e PRL-II durante a patologia da SOP.

Palavras – Chave: Melatonina, prolactina, expressão de receptores, síndrome dos ovários policísticos, gestação.

ABSTRACT

In polycystic ovary syndrome (PCOS) female infertility may be attributed not only the tapered anovulation, but also a decrease in the quality of oocytes and embryos induced by oxidative stress, thereby associated with melatonin pre-existing treatments may be considered a therapeutic alternative for the treatment of PCOS because it exerts direct effects on the female reproductive system acting through specific receptors, such as the Mel1a, found on the surface of various ovarian cells, furthermore, it is known that this indoleamine influences the production and release of prolactin, a hormone found in high levels in PCOS through specific receptors found in different tissues. Thus, the objective was to evaluate the effect of administration of exogenous melatonin with or without metformin on the expression of melatonin receptors (Mel1a) and prolactin (PRLR) in ovaries during pregnancy in rats after treatment for PCOS. To this 75 albino rats were used, divided into 5 groups: I. rats without inducing ovarian policistose; II - rats induced ovarian policistose (SOP + Placebo); III - rats induced ovarian policistose and treated with melatonin for 10 days (SOP + Mel); IV - rats induced ovarian policistose and treated with metformin for 10 days (SOP + Met); V - induced ovarian policistose rats treated with melatonin and metformin for 10 days (SOP + Mel + Met). Confirmation of PCOS was made by ultrasound images. At the end of treatment the females were mated and at 7, 14 and 21 days of gestation were euthanized for the collection and extraction of ovaries mRNA expression analysis by Real Time PCR on the Mel1a and PRLR receptor. The results demonstrated that melatonin receptor

expression levels (Mel1a) in control group, have a gradual decrease during pregnancy, contrary to prolactin receptor (PRL-II) that increases at the end of this period. In addition, the Mel1a receptor expression was similar to the control group when the animals were treated with the combination of melatonin and metformin or just with metformin. The prolactin receptor levels (PRL-II) were similar, with marked reduction in the middle third of pregnancy in animals groups treated separately with the monotherapies, or with the combination. Thus it can be concluded that the combination of metformin with melatonin regulates the expression of the receptors Mel1a and PRL-II for the pathology of PCOS.

Key - words: Melatonin, Prolactin, Receptors Expression, Polycystic ovary syndrome, pregnancy.

SUMÁRIO

Preâmbulo

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII

Capítulos		Pág.
I	1. INTRODUÇÃO.....	15
	2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
	2.1. Síndrome dos ovários Policísticos.....	18
	2.2. Fisiopatologia.....	20
	2.2.1. Alterações Gonadotróficas.....	20
	2.2.2. Alterações Androgênicas.....	23
	2.3. Tratamentos para SOP.....	24
	2.3.1. Metformina.....	25
	2.4. Glândula Pineal e Melatonina.....	28
	2.4.1. Melatonina e reprodução.....	31
	2.4.2. Melatonina e SOP.....	35
	2.5. Prolactina e reprodução.....	36
	2.5.1. Prolactina e SOP.....	37
	2.5.2. Prolactina e Melatonina.....	38
	3. REFERÊNCIAS.....	39

Expressão dos receptores de melatonina (<i>Mel1a</i>) e prolactina (<i>PRLR</i>) durante a gestação em ratas, após tratamento com melatonina e metformina para polícistose ovariana	53
RESUMO.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	63
DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Imagens ultrassonográficas das dimensões dos ovários realizadas após a indução da SOP nos grupos experimentais. **A** -Grupo I- Controle: 0,20 x 0,34cm. **B**- Grupo II- SOP + Placebo: 0,59 x 0,85. **C**- Grupo III-SOP + Mel: 0,75 x 0,54cm. **D**- Grupo IV- SOP + Met: 0,54 x 0,82cm. **E**- Grupo V- SOP + Mel + Met: 0,50 x 0,78cm)..... 80

Figura 2: Expressão do receptor Mel1a nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A**- grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B**- grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C**- grupo III com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D**- grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez e **E**- grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 81

Figura 3: Expressão do receptor PRL II nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A**- grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B**- grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C**- grupo III com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D**- grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez e **E**- grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 82

Figura 4: Comparação entre a expressão do receptor Mel 1a e PRL II nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A**- Grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B**- Grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C**- grupo 3 com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D**- grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **E**- grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17 β -HSD- 17 β hidroxisteróide desidrogenase

5HTP- 5 triptofano hidroxilase

5HTPD- 5 hidroxitriptofano hidroxilase

AES- Sociedade de excesso de andrógenos

AMH- Hormônio anti-muleriano

AR- Receptor de andrógenos

CC- Citrato de clomifeno

CHOC- Contraceptivos orais hormonais combinados

CT- Colesterol total

Ct- Curva de Thresholds

CYP17- Citocromo P450c17

EROS- Espécies reativas de oxigênio

ESHRE/ASRM- Sociedade Europeia de Reprodução e Embriologia

FDA- Administração de alimento e drogas

FSH- Hormônio folículo estimulante

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofinas

HIOMT- Hidroxindol-O-metiltransferase

IGF-1- Fator de crescimento de insulina

IGFPB-1- Fator de crescimento semelhante a insulín ligante de proteína 1

kD- Kilodaltons

LDL- lipoproteínas de baixa densidade

LH- Hormônio luteinizante

Mel- Melatonina

Mel 1a, 1b e 1c-Tipos de receptores de melatonina

Met- Metformina

NAS- N-acetilserotonina

NAT- N-acetiltransferase

NIH- Instituto nacional de saúde

NSQ- Núcleos supraquiasmáticos

ONOO⁻ Peroxinitrito

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PRL- Prolactina

PRLR- Receptor de prolactina

PRL-II- Tipo de receptor de Prolactina

RI- Resistência a insulina

RNA- Ácido ribonucleico

RT-PCR- Transcrição reversa

SHBG- Globulinas ligantes de hormônios sexuais

SM- Síndrome metabólica

SOP- Síndrome dos ovários policísticos

TG- Triglicerídeos

TH- Triptofano hidroxilase

TRH- Hormônio liberador de TSH

TSH- Hormônio tireoestimulante

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) foi descrita pela primeira vez na década de 30, e vem sendo considerada como uma das desordens endocrinológicas mais frequentes nas mulheres em idade reprodutiva (EHRMANN, 2005; STEIN; LEVENTHAL 1935). Estima-se que no mundo, cerca de 5 a 10% das mulheres entre 15 e 49 anos de idade apresentem a SOP, entretanto, no Brasil, esse distúrbio pode chegar a acometer 13% da população feminina (CARMINA et al., 2006; CRISOTO et al., 2012; MELO et al., 2011).

Esta síndrome caracteriza-se clinicamente por irregularidades menstruais, com quadros de amenorreia ou oligomenorreia, hiperandrogenismo, e anovulação crônica, podendo causar infertilidade em diversas portadoras, chegando em alguns países, como os Estados Unidos, a representar a principal causa de infertilidade feminina (HOMBURG, 2002).

Por resultar em uma intrínseca desregulação das células da teca interna dos folículos ovarianos, caracterizada por um aumento na expressão dos genes codificadores de enzimas esteroidogênicas (WICKENHEISSER et al., 2000), o hiperandrogenismo portanto, tem sido considerado o principal fator desencadeado pela síndrome (AQUINO; NORI, 2014; JONARD; DEWAILLY, 2004). Além disso, níveis elevados de prolactina circulantes são observados em 35% das pacientes com SOP (EHRMANN, 2005), sendo responsável por estimular a produção de andrógenos pela glândula adrenal (HOMBURG, 2008).

A prolactina exerce ainda regulação das funções gonadais, participando da esteroidogênese, formação do corpo lúteo, e modulando os efeitos das gonadotrofinas (SHIROTA et al., 1990) e desenvolvimento folicular (PARKS, 2004), tendo suas ações moduladas por receptores específicos, PRLRs, localizados nas células ovariana e uterinas (STEWART et al., 2000).

Dentre os tratamentos preconizados para a SOP, a metformina, uma biguanida utilizada para tratar pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se

o agente mais utilizado (CHECA et al., 2005; REZVANFAR et al., 2012). Esta pode restaurar a ciclicidade menstrual, e é altamente eficiente na indução da ovulação e no aumento da ocorrência de gestação (NORMAN, 2004). Sendo também considerada a droga mais segura em comparação com os demais tratamentos (PALOMBA; FALBO; LA SALA, 2013).

Além da utilização da metformina, uma vez que a patogênese das doenças que causam a infertilidade, como a SOP, endometriose e demais desordens no sistema reprodutor feminino estar sendo associada ao estresse oxidativo (CERDA et al., 2008; SEKHON et al., 2010), pesquisas têm sugerido como alternativa terapêutica a utilização de antioxidantes associados a tratamentos já existentes (ANISIMOV et al., 2010; MAN'CHEVA et al., 2011). Destacando-se a melatonina, devido a sua eficiência na eliminação de radicais livres assim como no aumento da taxa de fertilização (VENECEK, 1995).

A melatonina também regula uma variedade de funções importantes relacionadas com o ritmo circadiano e reprodução (REITER; TAN; BURKHARDT, 2002). Altas concentrações deste hormônio estão presentes no fluido folicular, sugerindo que ela desempenhe um papel importante no crescimento e maturação dos ovócitos de mamíferos, atuando através da ligação com seus receptores específicos (TAMURA et al., 2012). Três tipos de receptores estão distribuídos em diferentes tecidos; o receptor Mel1a, associado a efeitos reprodutivos e circadianos, Mel1b, envolvido na sensibilidade da retina à luz, e o receptor Mel1c, apenas encontrado em anfíbios (DUBOCOVICH; MASANA; BENLOUCIF, 1999; EKMEKCIOGLU, 2006; PANDI-PERUMAL et al., 2008; REPPERT, 1997). Além disso, este hormônio também pode modular a liberação de PRL (DÍAZ LÓPEZ et al., 2005; SOARES et al., 2003). De acordo com Freeman et al. (2000) animais tratados com melatonina apresentam uma redução nos níveis de estradiol com consequente diminuição da secreção de PRL, uma vez que o estradiol estimula sua produção, regulação da expressão gênica, bem como sua sensibilidade associada aos níveis de melatonina (CLOSE; FREEMAN, 1997).

Entretanto, embora diversos estudos demonstrem a produção e concentração de melatonina e prolactina durante a gestação e na patologia da

SOP (OTA, et al., 1986; TAMURA et al., 2014) , não há relatos na literatura sobre os níveis de expressão dos receptores desses hormônios a nível ovariano no decorrer da síndrome dos ovários policísticos. Assim, uma vez que a melatonina pode apresentar-se como uma alternativa terapêutica para SOP, e exercer influência direta sobre a produção de prolactina, tivemos como objetivo investigar os efeitos do tratamento com metformina associada a melatonina, para a SOP em ratas, sobre a expressão dos receptores de melatonina e prolactina ovarianos durante a gestação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS

A síndrome dos ovários policísticos foi descrita pela primeira vez em 1935 por dois médicos, Stain e Leventhal, que trataram pacientes que apresentavam características em comum, como amenorreia, hirsutismo, aumento dos ovários e aparecimento de múltiplos cistos neste órgão (SIRMANS; PATE, 2014; STEIN; LEVENTHAL 1935). Após muitas controvérsias, com realização de diversos estudos posteriores, chegou-se a conclusão que as pacientes de Stain e Leventhal faziam parte de um subgrupo de mulheres portadoras de uma doença complexa e heterogênea, que foi então denominada de Síndrome dos ovários policísticos (SOP) (GOLDZIER, 1981; YEN, 1980).

Atualmente a SOP é considerada uma das desordens endocrinológicas mais frequente em mulheres em idade reprodutiva, de causa multifatorial e com susceptibilidade associada a fatores de riscos genéticos e ambientais (SPRITZER, 2014). Sua prevalência varia de acordo com o critério de diagnóstico utilizado, uma vez que possui diferentes formas de apresentação dos sintomas, podendo chegar a acometer cerca de 2,2-26% da população feminina (ASUNCION et al., 2000; AZZIZ et al., 2004; KNOCHENHAUER et al., 1998; MARCH et al., 2010; MICHELMORE et al., 1999).

Os critérios de diagnóstico da SOP são definidos com base em suas manifestações clínicas, que primariamente, caracterizam-se por uma disfunção ovulatória e hiperandrogênica, resultando em irregularidades no ciclo menstrual, com quadros de amenorreia e oligomenorreia, presença de cistos ovarianos e infertilidade, além do desenvolvimento de alopecia, hirsutismo e acne (ASUNCION et al., 2000; AZZIZ et al., 2004). Entretanto, frequentemente, as pacientes com SOP apresentam distúrbios metabólicos, assemelhando-se a Síndrome Metabólica (SM), como resistência a insulina (RI), com consequente aumento do risco de Diabetes tipo 2 (MORAN et al., 2010), dislipidemias, aumento do colesterol, gordura abdominal e hipertensão arterial (LOPES, 2001; SPRITZER, 2014; VAN HOUTEN, VISSER, 2014). Dependendo do estudo, cerca de 38-88% das mulheres com SOP são obesas e 50-70% apresentam

resistência a insulina (BALEN et al., 1995; COOK et al., 2002; SIR-PETERMANN et al., 2009).

Desta forma, foram propostos vários critérios de diagnóstico, o primeiro, definido em 1990 pelo NIH (*National Institute of health*), diagnosticava a presença da SOP em mulheres que apresentassem oligo-anovulação, e hiperandrogenismo clínico ou bioquímico (NORMAN; STANKIEWICZ, 2004; TEEDE; DEEKS; MORAN, 2010). Posteriormente, no consenso de 2003 da *European Society of Human Reproduction and Embriology /American Society for Reproductive Medicine* (ESHRE/ASRM), definiu-se o diagnóstico de Rotterdam, caracterizado pela presença de dois dos três seguintes critérios; hiperandrogenismo, amenorreia, oligo ou anovulação, e aparecimento de ovários policísticos a ultrassonografia (NORMAN; STANKIEWICZ, 2004; SPRITZER, 2014). Em 2006, a *Androgen Excess Society* (AES), definiu a SOP como a presença de hiperandrogenismo associada a uma das demais características (AZZIZ et al., 2006). (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico da SOP.

NIH (1990) * (Todos os critérios necessários)	ROTTERDAN (2003)* (Dois critérios necessários)	AES (2006)* (Hiperandrogenismo associado a outro critério)
Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico	Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico	Hiperandrogenismo clínico ou bioquímico
Oligo/amenorreia Anovulação	Oligo/amenorreia Anovulação	Oligo/amenorreia Anovulação
	Aparecimento de ovário policístico ao ultrassom	Aparecimento de ovário policístico ao ultrassom

*Exclusão de outras causa de hiperandrogenismo; Hiperplasia da Adrenal Congênita, Síndrome de Cushing, tumores secretores de andrógenos, Hiperprolactinemia, doenças da tireóide, e drogas que induzem o excesso de andrógenos. Adaptada de SPRITZER, 2014.

Os critérios da ESHRE/ASRM prevalecem sobre os do NIH e AES, uma vez que incluem critérios ecográficos necessários para o diagnóstico de ovários

policísticos. Esses critérios são baseados na presença de doze ou mais folículos com 2 a 9 mm de diâmetro em um ou em ambos os ovários e/ou aumento do volume ovariano (maior que 10 cm³) (HOMBURG, 2008; POLSON et al., 1988; ROTTERDAM, 2004).

Com base em suas diferentes características e possibilidades de diagnóstico, é possível a identificação 4 fenótipos da SOP (GERARD et al., 2014)

- I- Hiperandrogenismo (clínico ou bioquímico) e anovulação crônica;
- II- Hiperandrogenismo e ovários policísticos, com a permanência dos ciclos ovulatórios;
- III- Anovulação crônica e ovários policísticos, sem hiperandrogenismo;
- IV- Hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos.

2.2. FISIOPATOLOGIA

2.2.1. Alterações gonadotróficas

As características fisiopatológicas da SOP ainda não foram totalmente compreendidas, entretanto observa-se uma interação direta entre as gonadotrofinas, ovários, andrógenos e insulina.

A produção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) é um evento fundamental para função reprodutiva, uma vez que estão relacionados com a produção de esteróides ovarianos, crescimento folicular e ovulação. Para a hipófise produzir e liberar tais hormônios, necessita ser estimulada pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) produzido a nível hipotalâmico (EHRMANN, 2005; RAJU et al., 2013).

Os ovários apresentam duas populações celulares que são estimuladas independentemente por LH e FSH (O'DEA et al., 2008; VASKIVUO, 2002). A camada da teca interna, estimulada pelo LH, é responsável pela produção de andrógenos e a granulosa, estimulada pelo FSH, produz estrógenos. A teca apresenta uma vascularização que aumenta juntamente com o desenvolvimento folicular, que permite receber substâncias da circulação

sanguínea, incluindo os precursores da esteroidogênese, como o colesterol, que estimulados pelo LH são convertidos em andrógenos (PALMA et al., 2012).

Caracteristicamente, a granulosa não contém vasos, assim toda sua produção de estrógeno é limitada aos precursores que recebe, ou seja, apenas os andrógenos provenientes da teca. Esta conversão de andrógenos, principalmente androstenediona e testosterona, em estrógenos (basicamente estradiol), é realizada por ação da enzima aromatase, estimulada pelo FSH (SANDERSON, 2009; SILVA et al., 2006).

O controle da produção hormonal é realizado por mecanismos de interação entre o ovário (folículo e oócito), a hipófise e o hipotálamo (eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal), nos quais os andrógenos e os estrógenos de origem ovariana exercem uma retro-alimentação negativa ou positiva sobre o padrão de produção e secreção de gonadotrofinas. Os pulsos de GnRH, por sua vez, também exercem controle sobre a taxa de LH/FSH secretada (PALMA et al., 2012).

Na SOP, evidências sugerem que as células da teca funcionem de forma diferenciada, com aumento na produção de andrógenos que decorre ou da hipersecreção de LH basal e elevada expressão de seus receptores (HOGG et al., 2012; JAKIMIUK et al., 2001), ou do aumento da atividade da enzima Citocromo P450c17 (CYP17), responsável pela síntese hormonal (GILLING-SMITH et al., 1994).

A elevação dos níveis de LH, portanto, promove o aumento da produção de androstenediona pelas células da teca, a qual é convertida pela 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 5 (17 β -HSD) em testosterona ou aromatizada em estrona. Os andrógenos em excesso são então convertidos em estrona nos tecidos periféricos, esta por sua vez, inibe a dopamina hipotalâmica provocando um aumento dos pulsos de GnRH, tornando maior a produção de LH sobre a do FSH (EHRMAN et al., 2006; HAYES et al., 1998). Este aumento dos pulsos de GnRH, pode também ser atribuído à níveis baixos de progesterona, responsável por retardar os pulsos deste hormônio (HOMBURG, 2008). Tais fenômenos, portanto, têm sido considerados a

anormalidade primária da SOP e, assim, a causa do excesso de andrógenos ovarianos e plasmáticos (YEN et al., 1980).

Outro mecanismo que pode estar diretamente envolvido no aumento da síntese dos andrógenos é a RI, com hiperinsulinemia compensatória, uma vez que os ovários parecem permanecer sensíveis ou até hipersensíveis à insulina, mesmo quando os tecidos alvo habituais, como o músculo e o tecido adiposo, manifestam RI (KABIRI et al., 2014). O excesso de insulina age, portanto de forma sinérgica ao LH, estimulando a resposta estereoidogênica ovariana (VAN HOUTER; VISSER, 2014) (Figura 1).

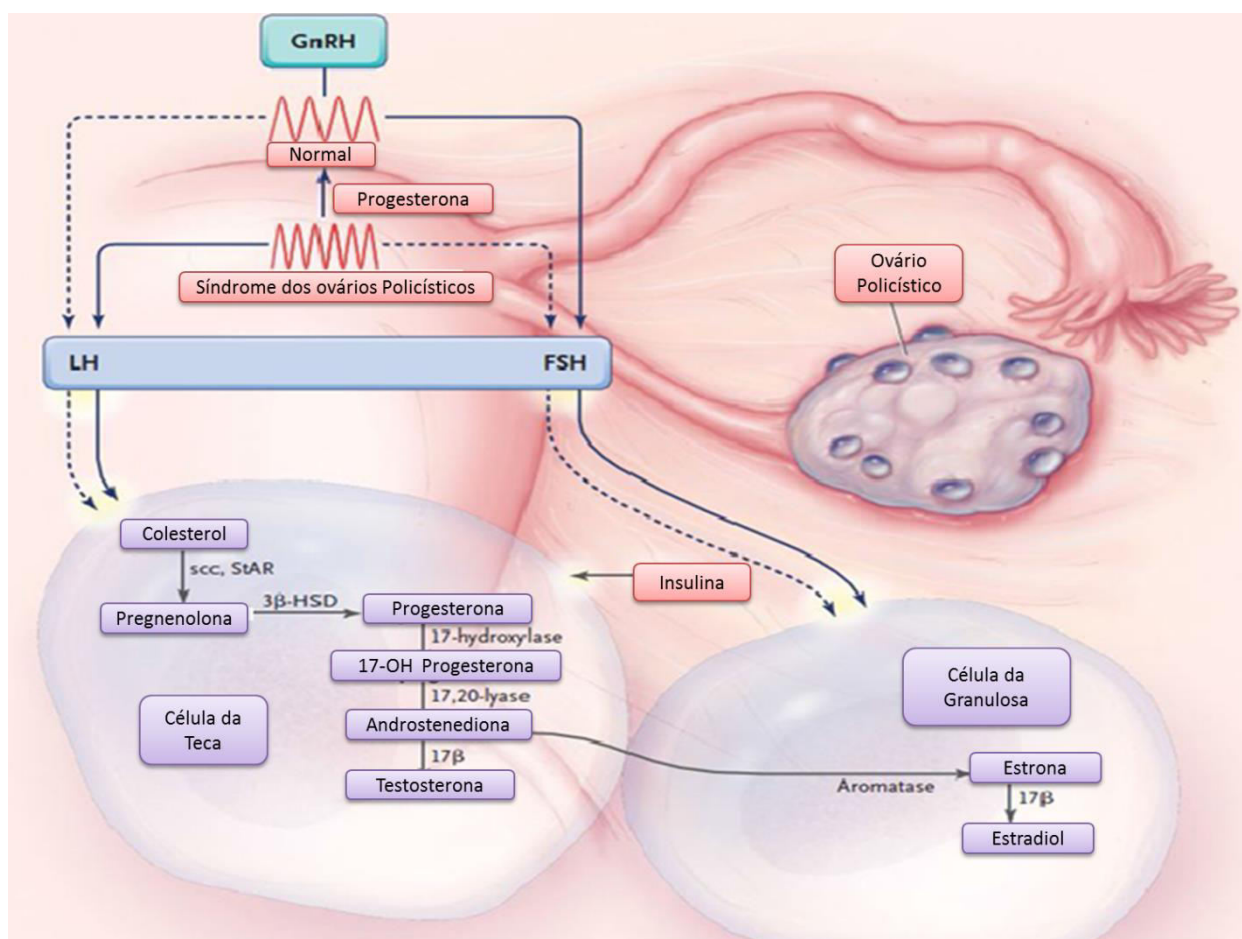


Figura 1: Alterações gonadotróficas e esteroidogênicas durante a SOP e o papel da insulina na atuação sinérgica ao LH na produção de andrógenos. Adaptado de EHRMANN, (2005).

Com relação às disfunções na foliculogênese, foi possível estabelecer com estudos ultrassonográficos e biópsias ovarianas, que mulheres com SOP apresentam um *pool* de folículos em crescimento de duas a três vezes maior que mulheres saudáveis (SIR-PETERMANN et al., 2012). As características histológicas da síndrome demonstram um aumento no número de pequenos folículos pré-antrais e antrais, e um maior recrutamento folicular (HUGHESDON, 1982). Acrescido a esta situação, também observa-se detenção no processo de seleção folicular, que resulta na ausência de ovulação (WEBBER et al., 2003). Desta forma, na SOP há maior recrutamento e menor seleção, mantendo um grande número dos folículos em crescimento produtores de andrógenos (JONARD; DEWAILLY, 2004). Devido a efeitos parácrinos, esta massa folicular aumentada inibe o início do crescimento dos demais folículos primordiais (WEBBER et al., 2003), levando a uma reserva ovariana de folículos em crescimento (TAKAYAMA et al., 1996). Assim, as mulheres com SOP apresentam maiores concentrações de hormônios anti-müllerianos (AMH) e inibina B, marcadores séricos característicos da reserva ovariana durante o período fértil (PILTONEN et al., 2005; SOWERS et al., 2008).

2.2.2 Alterações Androgênicas

O hiperandrogenismo é marca bioquímica da SOP, e estudos sugerem que células da teca interna ovariana em mulheres com esta síndrome, são mais eficientes na conversão de precursores androgênicos em testosterona do que as células da teca normais (HOGG et al., 2012). Roselfield et al. (1990) sugeriram uma hiperfunção da enzima formadora de andrógenos (citocromo P450c17 α) que tem dupla ação e participa na produção androgênica no ovário e na supra-renal, ora com 17-hidroxilase formando 17-hidroxiprogesterona, ora com 17,20 liase formando androstenediona. Fatores como insulina, LH, fatores de crescimento (fator de crescimento de insulina - IGF-1, principalmente) ou outros fatores intrínsecos seriam os responsáveis pela modificação da atividade da enzima (HOGG et al., 2012).

Com base em diferentes estudos, criou-se a hipótese de que a quantidade elevada de receptores de andrógenos (AR) nas células da granulosa e tecais poderia impedir a entrada do excesso de andrógenos nos oócitos, garantindo o crescimento normal dos folículos. Entretanto, se uma disfunção na comunicação entre as células da granulosa e oócito existisse, os andrógenos fisiologicamente desnecessários entrariam no oócito, se ligam aos seus AR e desencadeariam uma série de ações não-genômicas, provocando atresia folicular ou formação de folículos não funcionais no ovário (ABBOTT et al., 2005; DRUMMOND, 2006; LI; SCHATTEN; SUN, 2009).

Além de tais características, em mulheres com SOP o hiperandrogenismo está associado com o aparecimento de hirsutismo, alopecia e acne, bem como a distribuição da gordura corporal, caracterizada pelo acúmulo de gordura principalmente na região abdominal (BLOUIN; BOIVIN; TCHERNOF, 2008). Estudos demonstraram que mulheres com SOP têm níveis mais elevados de triglicerídeos (TG), LDL, e colesterol total (CT), quando comparado com mulheres saudáveis, independentemente do índice de massa corporal (WILD et al., 2011).

2.3 TRATAMENTOS PARA SOP

Os tipos de tratamentos para a SOP dependem dos sintomas que as pacientes apresentam, e podem ser divididos tipicamente em três categorias; terapias para os sintomas relacionados ao hiperandrogenismo, para distúrbios menstruais, e para infertilidade (BADAWEY, 2011).

Para o tratamento do hiperandrogenismo clínico, que inclui hirsutismo, alopecia e acne, a primeira linha de escolha são as pílulas contraceptivas orais (BADAWEY, 2011), entretanto, com a permanência dos sintomas, pode-se optar pela combinação de tais pílulas a antiandrogênicos, que atuam como antagonistas competitivos nos AR, revertendo a ação de tais hormônios (DEPLEWSKI; ROSENFELD, 2000). A perda de peso, como terapia não medicamentosa melhora a circulação dos andrógenos, e fornece numerosos benefícios metabólicos para mulheres com SOP (BADAWEY, 2011).

Os contraceptivos hormonais orais combinados (CHOC) permanecem como tratamento predominante para irregularidades menstruais em mulheres

que não desejam engravidar (URBANETZ et al., 2009). O componente estrogênico suprime o LH e assim diminui a produção de andrógenos nos ovários aumentando também a produção hepática de SHBG (globulina ligante de hormônios sexuais), reduzindo os níveis de testosterona livre (HARWOOD; VUGUIN; DIMARTINO-NARDI, 2007).

A infertilidade é um dos principais problemas decorrentes da SOP, assim muitas tratamentos que induzem a ovulação estão disponíveis, sendo o mais utilizado o Citrato de Clomifeno (CC). Trata-se de um antagonista oral do estrógeno que eleva as concentrações de FSH e induz o crescimento folicular na maioria das mulheres com SOP e anovulação (HOMBURG, 2005). O mecanismo de ação não é inteiramente conhecido, mas sabe-se que sua atividade antiestrogênica no hipotálamo induz uma mudança na frequência dos pulsos do GnRH levando ao aumento na liberação do FSH (SIRMANS; PATE, 2014; THESSALONIKI, 2008).

2.3.1 Metformina

Dentre diversas estratégias terapêuticas, a utilização de drogas insulino-sensibilizantes para o tratamento de anormalidades reprodutivas relacionadas a resistência a insulina, vem se destacando (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2012), desta forma, vários estudos têm avaliado a eficácia da metformina no tratamento da anovulação decorrente da SOP (COSTELLO; EDEN, 2003; SUN; ZHANG; ZHANG, 2013).

A metformina é uma biguanida oral antihiperglicêmica, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1995, para o tratamento de mulheres com *diabetes mellitus* não insulino-dependente, ou seja, diabetes tipo 2 (QUAILE et al., 2010). Os prováveis mecanismos de ação da metformina referem-se à diminuição da gliconeogênese hepática, suprimindo a gliconeogênese de vários substratos, incluindo lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos (DOMINGUEZ et al., 1996; KIRPICHNIKOV; MCFARLANE; SOWERS, 2002). Na melhora da sensibilidade tecidual à insulina, facilita o transporte de glicose, com aumento da atividade tirosina quinase nos

receptores de insulina (DOMINGUEZ et al., 1996). Parte da eficácia da metformina na SOP pode estar relacionada à suas ações diretas na esteroidogênese, devido a seus efeitos insulinosensibilizantes (ARLT; AUCHUS; MILLER, 2001; MANSFIELD et al., 2003).

A ovulação pode ser resultado direto da metformina no ovário levando a uma produção normal de esteroides e um provável efeito de *feedback* que inclui diminuição dos níveis de LH e andrógenos (PALOMBA et al., 2009). Vários estudos sugerem que a metformina poderia atuar no hiperandrogenismo com interferência direta e específica reduzindo a secreção de andrógenos dos ovários e adrenais, e seus níveis circulantes, bem como a secreção de LH da hipófise (BAILEY; TURNER, 1996).

Um efeito direto da metformina na produção de andrógenos pelas células da teca foi demonstrado com experimentos *In vitro*, onde o fármaco inibiu significativamente a produção de androstenediona e testosterona nestas células através da regulação de proteínas esteroidogênicas e da expressão da 17-hidroxilase (ATTIA; RAINEY; CARR, 2009). Nestler e Jakubowicz (1996) demonstraram que a administração da metformina em pacientes obesas com SOP reduz concomitantemente a glicemia de jejum e a atividade do citocromo P450c17 ovariano, induzindo a redução da concentração da testosterona sérica livre (ATTIA; RAINEY; CARR, 2009).

A redução dos níveis de insulina após o tratamento com a metformina em pacientes com SOP está associada com o aumento no IGFBP-1 (fator de crescimento semelhante a insulina ligante de proteína 1) e a diminuição na taxa de IGF-I/IGFBP-1. O IGF-I atua de forma autócrina e parácrina estimulando a produção de estrógenos pelas células da granulosa (ERICKSON et al., 1990) e atua sinergicamente com o LH e FSH no controle dos níveis de aromatase nessas células (PALOMBA et al., 2009).

Além disso, alguns estudos demonstraram que diversos impactos da resistência a insulina durante a gestação (risco de aborto, e diabetes gestacional) podem ser amenizados pela terapia com metformina (GLUECK et al., 2013; JAKUBOWICZ et al., 2002; VANKY et al., 2005).

Por outro lado, esta biguanida pode afetar diretamente o desenvolvimento embriológico e fisiológico fetal, uma vez que tem a capacidade de atravessar a barreira materno/fetal, e é encontrada no sangue da placenta e do cordão umbilical com as mesmas concentrações do sangue venoso materno (CHARLES et al., 2006; KOVO et al., 2008). Carlsen e Vanky (2010) demonstraram um aumento nos níveis de SHBG (glicoproteína que ligam andrógenos e estradiol modulando seus efeitos biológicos), em neonatos cujas mães foram expostas a metformina durante o primeiro trimestre da gestação.

Este fármaco também vem apresentando alguns resultados controversos a nível renal e hepático, com a presença de acidose láctica, alterações de enzimas do fígado e diversos efeitos gastrointestinais (JONES et al., 2002; LAUTATZIS, GOULIS, VRONTAKIS, 2013), além de promover alterações nas células testiculares dos neonatos (TARTARIN et al., 2012) e diminuição da massa corporal destes (KOVO et al., 2008).

Com o objetivo de amenizar possíveis danos decorrentes da utilização da metformina, e melhorar o seu potencial de ação, alguns estudos vêm associando a metformina a outros medicamentos, como a melatonina, para o tratamento de algumas patologias (ANISIMOV et al., 2010). Man'chevea et al. (2011), realizaram experimentos induzindo câncer de pele em animais e observaram que o tratamento com a associação da melatonina e metformina reduziu o crescimento tumoral quando comparado aos animais tratados apenas com as monoterapias. Já Anisimov et al. (2010), observaram que em animais induzidos ao câncer de mama a melatonina e metformina simultâneas promoveram um aumento no tempo de vida dos animais e inibiram o crescimento de tumores.

Como a Melatonina é um potente agente antioxidante e eliminador de radicais livres, e o estresse oxidativo é uma condição presente na SOP, a utilização da melatonina associada a metformina para o tratamento desta enfermidade poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz.

2.4. GLÂNDULA PINEAL E MELATONINA

Nos mamíferos, a integração entre a temporalidade externa e interna é fornecida pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo (FUCHS et al., 2010), que recebem informações da luminosidade, advindas diretamente do ambiente, através do feixe nervoso retino-hipotalâmico (BUENO; WEY, 2012). As mensagens, que partem dos NSQ, são então transmitidas para neurônios do segmento cervical da medula, em seguida, enviadas para os gânglios simpáticos cervicais superiores, e destes para a glândula pineal (HIRIART, et al., 2012).

Esta glândula, também conhecida como epífise, está localizada no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais, originando-se do diencéfalo (MAGANHIN et al., 2008). É um órgão endócrino ativo, formado por células com função neurosecretora, os pinealócitos, e por células intersticiais semelhantes às células da glia (COMMENTZ; HELMKE, 1995). Seus produtos bioquimicamente específicos são indolaminas e peptídeos. A melatonina, uma indolamina, é o mais bem estudado dos produtos da pineal (CARRILLO-VICCO et al., 2003; MATHEUS et al., 2012). Possui baixo peso molecular e característica anfifílica, ou seja, difunde-se tanto nos meios lipofílicos como hidrofílicos (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008). Também é conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, um composto orgânico de coloração amarelo-claro, que é transportada no plasma ligado a proteínas, em especial à albumina, tendo sua vida média variando entre 30 e 60 minutos (MAGANHIN et al., 2008).

A melatonina é sintetizada pelos pinealócitos a partir do neurotransmissor serotonina, o qual, por sua vez, tem como precursor o aminoácido triptofano (MAGANHIN et al., 2008). Esse processo ocorre quando a enzima triptofanhidroxilase (TH) converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Posteriormente a 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) remove o grupo alfa-carboxil terminal do 5-HTP e o transforma em serotonina. A N-acetiltransferase (NAT) catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a

reação de conversão da NAS em melatonina (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; MACCHI; BRUCE, 2004; MARONDE et al., 2011). Como a HIOMT só pode ser fabricada na ausência de luz, o mesmo ocorre com a melatonina, que é então denominada de agente endócrino da escuridão (HIRIART, et al., 2012; PEKELMAN et al., 2003). (Figura 2)

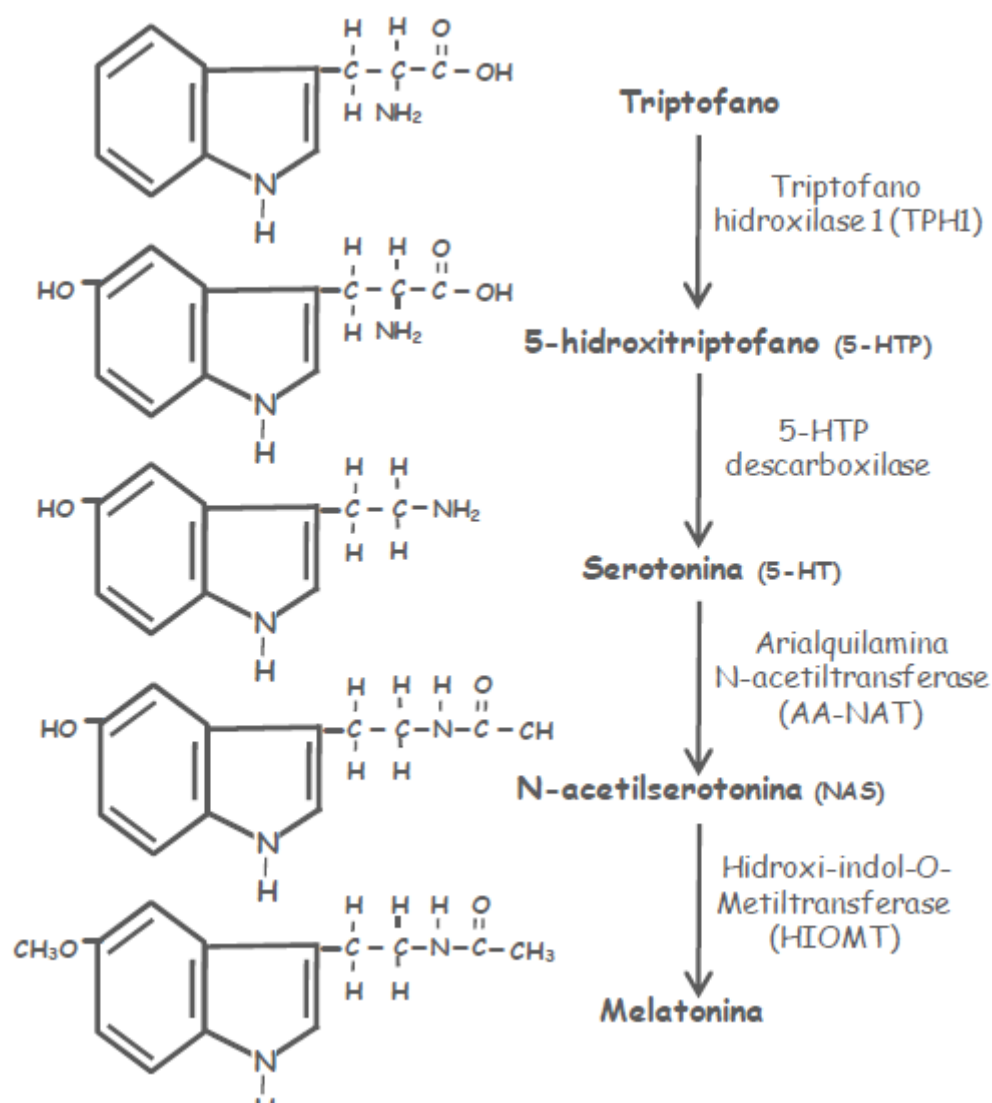


Figura 2. Via Biosintética da melatonina (REITER et al., 2000)

Além da pineal, outras fontes podem produzir melatonina, tais como: retina, células imunocompetentes, trato gastrointestinal, fígado, testículos e ovários (HARDELAND et al., 2011). Essas fontes extrapineal contribuem minimamente

para a concentração plasmática da melatonina, porém, possuem importância considerável para ação parácrina e/ou autócrina desse hormônio (MACCHI; BRUCE, 2004; PONTES et al., 2006).

O pico de secreção da melatonina em roedores é alcançado na primeira metade da noite, decaindo gradualmente (HIRIAT, et al., 2012). Durante esse período, banha as células e tecidos, fornecendo uma série de informações rítmicas, permitindo a diferenciação entre o dia e a noite (CARILLO-VICO et al., 2004; OKATANI et al., 2003). Em virtude das estações do ano, conforme os dias vão ficando mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite, e conseqüentemente, o período do ano correspondente (HARDELAND et al., 2011).

Essa indolamina participa de uma grande variedade de processos celulares, neuroendócrinos e neurofisiológicos, como a regulação do ciclo sono-vigília, do sistema imunológico, cardiovascular, além de influenciar o ritmo de vários outros processos, como por exemplo, o metabolismo de lipídios e carboidratos, a regulação da temperatura corporal, processos carcinogênicos, fisiologia gastrointestinal, e a pressão sanguínea (HIRIART, et al., 2012; SOARES JR et al., 2003).

Sabe-se, ainda, que a melatonina é um potente agente antioxidante, e eliminador de radicais livres. Regula vários processos fisiológicos no fígado, apresentando receptores, tanto na membrana quanto na carioteca das células hepáticas (NAJI et al., 2004), podendo também inibir o crescimento de hepatocarcinomas (BLASK et al., 2004; CARRILLO-VICO et al., 2005).

Existem três principais vias de degradação deste hormônio, sendo a hepática considerada a via clássica, onde a enzima CYP P450 do fígado metaboliza a melatonina em 6- hidroximelatonina, que em seguida é conjugada com um sulfato ou glucoronida, sendo então secretada na urina (SLOMINSKI et al., 2012). Quando a melatonina reage com o peroxinitrito (ONOO^-) forma o metabólito 6- hidroximelatonina que manifesta uma atividade antioxidante maior em determinados modelos *in vitro* (REITER; TAN; BURKHARDT, 2002).

2.4.1. Melatonina e reprodução

Em diversos animais, tais como os roedores, as variações no ciclo reprodutivo ocorrem em função das mudanças no fotoperíodo (ROCHA et al., 2011), sendo regulada, portanto, através da modulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal pela melatonina (VÁZQUEZ et al., 2004). Esse processo ocorre através da ativação de receptores desse hormônio encontrados em diferentes tecidos (FRUNGIERI et al., 2005; ROY et al., 2001).

O primeiro receptor de melatonina foi isolado a partir de linhagens de melanóforos da derme de anuros, o *Xenopus laevis*, em 1994, sendo expresso apenas em espécies não-mamíferas (EBISAWA et al., 1994). Depois, cDNAs que codificam duas diferentes formas de receptores de melatonina humana foram clonados e denominados de receptor de melatonina tipo 1 e tipo 2 (MT1 e MT2, respectivamente) (REPPERT et al., 1994 ; 1995).

Posteriormente, os receptores foram divididos baseando-se em diferentes cinéticas de ligação e afinidade em duas classes, e denominados de ML-1 (MT1, MT2 e Mel_{1c}), e ML-2 (MT3). Os receptores da classe ML-1 representam os receptores acoplados a proteínas transmembranas G, e ambos, MT1 (Mel_{1a}) e MT2 (Mel_{1b}), são encontrados em todos os grupos de vertebrados, já o Mel_{1c} é apenas encontrado em anfíbios, aves e peixes (VANECEK, 1998). O receptor da classe ML-2 (MT3), diferentemente dos demais receptores, apresenta 95% de homologia com a sequência de aminoácidos presente na enzima quinona redutase 2, e controvérsias se realmente se trata de um receptor ou uma quinona redutase 2 sensível a melatonina ainda são observadas (DUBOCOVICH, 1988; MAILLIET et al., 2005; MOLINARI; NORTH; DUBOCOVICH 1996).

O receptor Mel_{1a} está relacionado com os efeitos reprodutivos e circadianos da melatonina, o Mel_{1b} está envolvido na sensibilidade à luz pela retina e o Mel_{1c} é encontrado nos anfíbios. Já o receptor Mel 2 está relacionado com o N-acetilserotonina (DUBOCOVICH et al., 1999; REPPERT, 1997).

As características de ligação das duas classes de receptores são semelhantes, apresentando afinidades subnanomolares para a melatonina (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005). Este hormônio, após a ligação com seu receptor específico pode atuar de diferentes maneiras. Evidências demonstram sua capacidade de ligação com a calmodulina, que apresenta diversas funções na regulação de enzimas, canais iônicos e receptores, e sua ligação com receptores nucleares, podendo ser de forma direta, ou promovida por cascatas de reações citoplasmáticas para chegar ao núcleo (CHAN; WONG, 2013). (Figura 3)

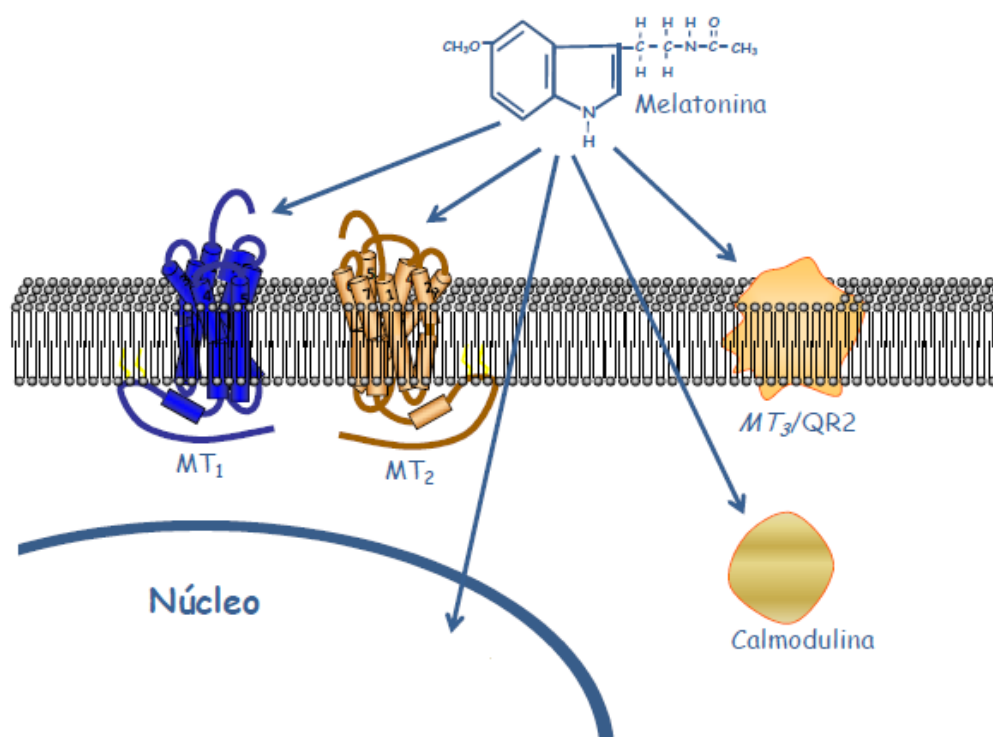


Figura 3. Melatonina e alguns de seus mecanismos de ação. MT-receptores de melatonina, MT₁ e MT₂, receptores acoplados a proteína G. QR2 (quinona redutase 2). Adaptada de TAMURA, (2009).

Ambos MT1 e MT2 são distribuídos em tecidos neuronais e periféricos (EKMEKCIOGLU, 2006; PANDI-PERUMAL et al., 2008), sendo encontrados nos núcleos supraquiasmáticos (LIU et al., 1997) com níveis altos de expressão sincronizados com o ritmo circadiano (REITER, 1991). Além dos NSQ, receptores de melatonina funcionais estão principalmente localizadas no cérebro (DUBOCOVICH et al., 2003) e em outros tecidos (FRUNGIERI et al., 2005), incluindo artérias (MASANA et al., 2002), fígado, rins (NAJI et al., 2004), adipócitos (ZALATAN; KRAUSE; BLASK, 2001), no sistema imune (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; GUERRERO; REITER, 2002; SKWARLO-SONTA et al., 2003), nos testículos e ovários (CLEMENS; JARZYNKA; WITT-ENDERBY, 2001). A melatonina, portanto, pode regular a função ovariana por diversos mecanismos, incluindo a ativação de seus receptores e caminhos de sinalização em diferentes tipos de células alvo, especialmente as células da teca e granulosa (SOARES JR et al., 2003; TAMURA et al., 2013).

Os mecanismos de ovulação têm sido comparados aos de uma reação inflamatória, estando as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) intimamente relacionadas a esse processo (ESPEY, 1994). São produzidas durante a ovulação por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais vasculares presentes nos folículos (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). Embora as EROS desempenhem um papel importante na ruptura do folículo durante a ovulação, podem causar danos aos oócitos e as células da granulosa (BEHRMAN et al., 2001), além de ser relatada sua capacidade de inibir a produção de progesterona pelas células luteínicas, através da inibição de enzimas esteroidogênicas, e atuar em proteínas intracelulares envolvidas no transporte de colesterol para as mitocôndrias (BEHRMAN; ATEN, 1991).

Devido a suas características, a melatonina atua na regulação de estrógeno e progesterona, na atividade funcional e o crescimento ovariano, reduzindo o estresse oxidativo nos folículos, e proteção dos oócitos contra radicais livres, além na modulação das gonadotrofinas (GnRH) que regulam a concentração de LH e FSH (DEVOTO et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2002). É considerada antiestrogênica, por sua interferência nos receptores de

estrógeno, e na síntese desse hormônio pela inibição da enzima aromatase, que controla a interconversão a partir de precursores androgênicos, alterando todo o processo de desenvolvimento folicular (OKATANI; SAGARA, 1995).

Em estudos realizados com ratas prenhes, onde ocorreu à remoção da glândula pineal, os níveis baixos de melatonina promoveram diminuição da implantação embrionária, sugerindo a atuação deste hormônio sobre algumas características morfofuncionais do endométrio estritamente relacionadas com a implantação do embrião (DAIR et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2004). Além disso, também foram detectadas altas concentrações de melatonina no fluido folicular (ROONNBERG et al., 1990). Sua atuação bem documentada como antioxidante pode estar associada ao desenvolvimento folicular e à qualidade oocitária, interferindo em processos como a maturação oocitária e ovulação (TAMURA et al., 2008).

Quando ratas foram expostas a estímulo luminoso contínuo ou foram pinealectomizadas apresentam queda na quantidade da melatonina produzida, levando a alterações no ciclo estral que prolongou a fase de estro. No entanto, a administração exógena de melatonina nessas ratas foi capaz de regularizar o ciclo (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005).

Também foi observado que, durante o período gestacional, a produção e concentração da melatonina apresentam mudança gradual, atingindo valores elevados no final desse período, sugerindo que esse hormônio desempenha um importante papel em sua manutenção (NAKAMURA et al., 2001). Esta indolamina lipofílica atravessa a placenta livremente sem ser alterada, atingindo a circulação fetal com facilidade, fornecendo informações periódicas para o feto, o que influencia o fotoperíodo pré-natal através de receptores específicos para este hormônio em diversos tecidos, mediando diversas interações fisiológicas fetais (GOLDMAN, 2003).

Entretanto, apesar de vários estudos demonstrarem a concentração sérica e ovariana da melatonina no processo gestacional, pouco se sabe sobre a expressão de seus receptores durante esse período.

2.4.2 Melatonina e SOP

Na síndrome dos ovários policísticos a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação cônica, mas também a diminuição dos oócitos e a qualidade do embrião (PLACHOT et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidas pelo estresse oxidativo podem ser responsáveis pela qualidade dos oócitos, e a geração de tais espécies a partir das células mononucleares é elevada em mulheres com a síndrome, assim como o produto da peroxidação lipídica aumenta consideravelmente no soro das portadoras (GONZALEZ et al., 2006).

Os níveis de 6-sulfatoximelatonina, metabólito enzimático da melatonina, na urina é significativamente maior em mulheres com SOP (LUBOSHITZKY et al., 2001). Níveis baixos deste hormônio, devido a pinealectomia ou exposição constante a luz, induz alguns aspectos da SOP em ratos (PRATA LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004) podendo decorrer de uma diminuição na absorção da melatonina no folículo ovariano (TAMURA et al., 2009). Estudos demonstraram que a concentração de melatonina intrafolicular foi significativamente menor em mulheres com SOP quando comparadas a mulheres saudáveis, mesmo existindo elevadas concentrações da indolamina no soro, sendo esse aumento sérico, por sua vez, devido a um *feedback* para os níveis insuficientes de melatonina no ovário (TAMURA et al., 2009), onde o elevado nível de melatonina no fluido folicular é necessário para o crescimento do folículo, ovulação e qualidade dos oócitos (TAMURA et al., 2014).

Desta forma a melatonina apresenta-se como alternativa terapêutica para o tratamento da infertilidade e consequentemente da SOP, uma vez que foi capaz de reduzir o dano oxidativo intrafolicular (TAMURA et al., 2008). Em estudos realizando-se fertilizações *in vitro*, observou-se que a administração da melatonina durante a evolução clínica do processo promoveu aumento na taxa de gravidez quando comparado as pacientes que apenas foram fertilizadas e não receberam melatonina (TAMURA et al., 2009).

2.5 PROLACTINA E REPRODUÇÃO

A prolactina (PRL) caracteriza-se como um peptídeo de 23-kD, composta por 199 AA, é um hormônio protéico primariamente produzido pela hipófise anterior, mas também por outros órgãos e tecidos incluindo células decíduais da placenta (LEE; MARKOFF, 1986), útero, e linfócitos (CLARKE; BERN, 1980; COOKE, 1989; PELLEGRINI et al., 1992) sendo muito conhecida por sua capacidade em estimular a lactação e sua ação reguladora no crescimento e diferenciação da glândula mamária, além de suas ações luteotróficas (GIBORI, 1992). O gene que codifica a PRL está localizado no cromossomo 6, sendo composto de cinco exons e quatro introns e possui um comprimento médio de 10kb. Sua expressão é influenciada por dopamina, estrógeno e TRH (hormônio liberador do hormônio estimulante da tireóide- TSH) (MELMED; KLEINBERG, 2003).

A prolactina caracteriza-se por participar e influenciar as atividades reprodutivas tais como estimulação do desenvolvimento da glândula mamária durante a gravidez e regulação da lactação pós-parto (ROSSI et al., 2002), podendo ainda influenciar a atividade normal de glândulas como a próstata (COSTELLO; FRANKLIN, 1994), glândula lacrimal (WARREN et al., 1994), e fornecer um estímulo proliferativo para tumores de mama e próstata (BISWAS; VONDERHAAR, 1987; COSTELLO; FRANKLIN, 1994).

Sabe-se que além dessas funções, a prolactina regula as funções gonadais, participando da esteroidogênese, formação do corpo lúteo, e modulação dos efeitos das gonadotrofinas (SHIROTA et al., 1990), estimula também a produção de leite pelas mulheres durante a fase pós parto, o crescimento, desenvolvimento e metabolismo fetal e é importante para a degradação do corpo lúteo e redução dos níveis dos esteróides sexuais no ciclo menstrual, além de estimular o processo de ovulação, implantação e desenvolvimento placentário (PERKS et al., 2003).

Tais ações hormonais durante a gestação são mediadas através de receptores específicos, os PRLRs, localizados na superfície celular do útero e ovário (LEE et al., 2003; SHAO et al., 2008).

Os PRLRs pertencem à superfamília dos receptores da PRL, que enviam sinais para o núcleo e ativando genes envolvidos em processos celulares tais como a proliferação, diferenciação, e a sobrevivência celular, durante a prenhez (ROSSI et al., 2002). Sendo, portanto, considerado como um marcador para o desempenho e manutenção da reprodução (ARIE et al., 2000; TANAKA et al., 2005).

Foi demonstrado também que a prolactina pode regular genes de múltiplos eventos no ovário como desenvolvimento folicular, pois ratos nulos para o gene da prolactina apresentaram folículos reduzidos, com consequente diminuição da ovulação, atraso na liberação e maturação do oócito (PARKS, 2004).

Sabe-se ainda que há uma relação diretamente proporcional entre prolactina e progesterona durante a gestação, onde estudos realizados com ratas *knockout* para o gene da prolactina, apresentaram níveis de progesterona insuficientes para implantação, suporte e posterior desenvolvimento e manutenção placentária, levando assim a um quadro de infertilidade (RUAN et al., 1995).

Em úteros não-gravídicos, a síntese de PRL foi detectada no pico das fases secretora e menstrual, coincidindo com os primeiros sinais histológicos de decidualização. Se a gravidez ocorre, o número de células deciduais diferenciadas e a síntese de PRL decidual aumentam após a implantação, alcançando o ápice entre 20 e 25 semanas, declinando próximo ao termo (WU et al., 1995).

Com relação ao aspecto clínico, algumas disfunções associadas a PRL são bem documentadas. Altos níveis deste hormônio no soro, por exemplo, podem ser associados a disfunções gonadais, galactorreia, anovulação com amenorreia, hipoenstrogonismo e infertilidade feminina (MOLTICH, 1978).

2.5.1. Prolactina e SOP

Na SOP, níveis elevados de prolactina circulantes são observados em 35% das pacientes (EHRMANN, 2005). Um dos mecanismos envolvidos neste

aumento de PLR parece estar relacionado a anormalidades dos neurotransmissores, particularmente do controle dopaminérgico na liberação de PRL (LUCIANO et al., 1984). A dopamina hipotalâmica é conhecida por ser o principal fator de inibição da liberação de PRL. O LH também é suprimido por este neurotransmissor (PEHRSON et al., 1983), assim a deficiência de dopamina poderia resultar em um quadro de hiperprolactinemia e elevação nos níveis de LH. Em estudos realizados com mulheres com SOP associada a hiperprolactinemia, onde foram analisados diferentes níveis hormonais, observou-se que as mulheres com hiperprolactinemia apresentavam elevações séricas de estrógenos, principalmente de estrona (CARMINA et al., 1984).

2.5.2. Prolactina e Melatonina

Em animais sazonais, a melatonina, hormônio produzido pela pineal, regula o ritmo circadiano e os níveis de prolactina (PRL) durante a gestação (LEE et al., 2003).

A relação entre melatonina e PRL pode ser afetada por meio da pinealectomia, iluminação constante, ausência de luz e/ou pelo tratamento com estes hormônios, pois carneiros expostos à ausência de luz apresentaram grande diminuição da ciclicidade estral, e quando tratados com PRL apresentaram uma reversão da ciclicidade. Entretanto, carneiros submetidos à iluminação constante ou pinealectomia, e tratados com PRL apresentaram estro permanente com um consequente estímulo esteroidogênico (SANTIAGO-MORENO et al., 2004). A ação fisiológica entre melatonina e PRL depende das espécies de animais estudados. Estudos com ovelhas em anestro demonstraram que quando estas foram tratadas com PRL apresentaram estímulo à ovulação e sucesso no processo de implantação (KING; ROSER; JONES, 2008). No entanto, Freeman et al. (2000) relataram que a maioria dos primatas quando submetidos à iluminação constante e/ou pinealectomia, apresentam elevação nos níveis de PRL durante a prenhez, provocando uma inibição à receptividade reprodutiva.

Portanto, são necessários maiores investigações para elucidar os possíveis mecanismos e as relações existentes entre a melatonina e prolactina.

3. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. H. et al. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome?. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 357-374, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 28, 2005.
- ANISIMOV, V. N. et al. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. **Cell Cycle**, v. 9, n. 1, p. 188-197, 2010.
- AQUINO, C. I.; NORI, S. L. Complementary therapy in polycystic ovary syndrome. **Translational Medicine**, v. 9, n. 11, p. 56-65, 2014.
- ARIE M. H. et al. Endometrial prolactin in hyperprolactinemic women. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 69, p. 119-126, 2000.
- ARLT, W.; AUCHUS, R. J.; MILLER, W. L. Thiazolidinediones but not metformin directly inhibit the steroidogenic enzymes P450c17 and 3-hydroxysteroid dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 16767–16771, 2001.
- ASUNCION, M. et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 2434–2438, 2000.
- ATTIA, G. R.; RAINEY, W. E.; CARR, B. R. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 517–524, 2001.
- AZZIZ, R. et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, p. 4237-4245, 2006.
- AZZIZ, R. et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2745–2749, 2004.
- BADAWY, A.; ELNASHAR, A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. **International Journal of Womens Health**, v. 3, p. 25–35, 2011.
- BAILEY, C. J; TURNER, R. C. Metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 574–579, 1996.
- BALEN, A. H. et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. **Human Reproduction**, v. 10, n. 8, p. 2107–11, 1995.

BEHRMAN, H. R. et al. Oxidative stress and the ovary. **Journal of the Society for Gynecology Investigation**, v. 8, p. S40–S42, 2001.

BEHRMAN, H. R.; ATEN, R. F. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. **Endocrinology**, v.128, p. 2958–2966, 1991.

BISWAS, R.; VONDERHAAR, B.K. Role of serum in the prolactin responsiveness of MCF 7 human breast cancer cells in long term tissue culture. **Cancer Research**, v. 47, p. 3509-351, 1987.

BLASK, D. E. et al. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor mediate-inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13 hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. **Carcinogenesis**. v. 25, n. 6, p. 951-960, 2004.

BLOUIN, K.; BOIVIN, A.; TCHERNOF, A. Androgens and body fat distribution. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 3–5, p. 272–280, 2008.

BUENO, C.; WEY, D. Gênese e ontogênese do ritmo de sono/ vigília em humanos. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 3, p. 62-67, 2012.

CARLSEN, S. M.; VANKY, E. Metformin influence on hormone levels at birth, in PCOS mothers and their newborns. **Human Reproduction** v. 25, p. 786–790, 2010.

CARMINA, E. et al. Prolactin secretion in polycystic ovary syndrome (PCO): correlation with the steroid pattern. **Acta Endocrinologica**, v. 105, n. 1, p. 99-104, 1984.

CARMINA, E. et al. Relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 91, p. 2-6, 2006.

CARRILLO-VICO, A. et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. **Journal of pineal research**, v.39, n. 4, p. 400–408, 2005.

CARRILLO-VICO, A. et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. **Cellular and molecular life science: CMLS**, v. 60, n. 10, p. 2272–2278, 2003.

CARRILO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experiemntal Biology**. v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.

CERDA, C.et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and Esterility**, v. 89, p.1299-1604, 2008.

CHAN, K. H.; WONG, Y. H. A Molecular and Chemical Perspective in Defining Melatonin Receptor Subtype Selectivity. **International Journal of Molecular Science**. v. 14, p.: 18385-18406, 2013.

CHARLES, B. et al. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 28, p. 67–72, 2006.

CHECA, M. A. et al. Insulin-sensitizing agents: use in pregnancy as therapy in polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 375–390, 2005.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: Aires MM (Ed.) **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008, p. 981-990.

CLARKE, W.C.; BERN, H.A. Comparative endocrinology of prolactin. **Hormonal Proteins and Peptides**, v. 8, p. 105-197, 1980.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep medicine reviews**. v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

CLEMENS, J.; JARZYŃKA, M.; WITT-ENDERBY, P. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. **Life Science**. v. 69, p. 27–35, 2001.

COMMENTZ, J. C.; HELMKE, K. Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. **Hormone Research**. v.44, n. 6, p. 271-275, 1995.

COOK, C. L. et al. Relationship between serum mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. **Fertility and Sterility**, v. 77, n.1, p. 141–146, 2002.

COOKE, N.E. Prolactin: normal synthesis, regulation and actions. **Endocrinology**, p. 384-407, 1989.

COSTELLO, L.C.; FRANKLIN, R.B. Effect of prolactin on the prostate. **Prostate**, v. 24, p. 162-166, 1994.

COSTELLO, M. F.; EDEN, J. A. A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 1–13, 2003.

CRISOSTO, N. et al. Improvement of hyperandrogenism and hyperinsulinemia during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: possible effect in the ovarian follicular mass of their daughters. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 218-224, 2012.

DAIR, E. L. et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 5, p. 1299-1305, 2008.

DEPLEWSKI, D.; ROSENFELD, R. L. Role of hormones in pilosebaceous unit development. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 4, p. 363-392, 2000.

DEVOTO, L. et al. Control of human luteal steroidogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 137-141, 2002.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Insulin resistance and polycystic ovary syndrome through life. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, n. 34, p. 5569-5576, 2012.

DÍAZ LÓPEZ, B. et al. Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1057, p. 337-64, 2005.

DOMINGUEZ, L. J. et al. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 113-121, 1996.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, p. 4-16, 2006.

DUBOCOVICH, M. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontier in Bioscience**. v. 8, p.; 1093–1108, 2003.

DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; BENLOUCIF, S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 460, p. 181-190, 1999.

DUBOCOVICH, M. Pharmacology and function of melatonin receptors. **FASEB Journal**. v. 2, n. 2, p.: 2765-2773, 1988.

DUBOCOVICH, M.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**. v. 27, p.: 101–110, 2005.

EBISAWA, M. et al. Expression cloning of high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 91, n. 13, p.: 6133-6137, 1994.

EHRMANN, D. A. Polycystic Ovary Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 24, n. 352, p. 1223-1236, 2005.

EHRMANN, D. A. et al. Prevalence and Predictors of the metabolic syndrome in woman with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Endocrinology Metabolic**, v. 9, n. 1, p. 48-53, 2006.

EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.60, p.: 97–108, 2006.

ERICKSON, G. F. et al. The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 70, p. 894–902, 1990.

ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**; v. 50, p. 233–238, 1994.

FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. **Physiology Reviews**, v. 80, p. 1523-1631, 2000.

FRUNGIERI, M. et al. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: Melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. **Endocrinology**, v. 146, p.; 1541–1552, 2005.

FUCHS, L. F. P. et al. Ação da melatonina sobre a apoptose e fator de crescimento endotelial vascular no córtex da adrenal de ratas pinealectomizadas. **Revista brasileira de ginecologia e obstetría**, v. 32, n. 8, p. 374-380, 2010.

FUJIMOTO, A. et al. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low-late midluteal estradiol levels in IVF cycles. **Journal of assisted reproduction and genetic**, v. 19, n. 12, p. 550-554, 2002.

GERARD, C. et al. The Polycystic Ovary Syndrome: an Endocrinological Perspective from the European Society of Endocrinology. **European Society of Endocrinology**, p. 1- 88, 2014.

GIBORI, G. The corpus luteum of pregnancy. In: Adashi EY, Leung PCK (eds) The Ovary. **Raven Press**, p. 261-317, 1992.

GILLING-SMITH, C. et al. Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 79, p. 1158-1165, 1994.

GLUECK, C. J. et al. Effects of metformin-diet intervention before and throughout pregnancy on obstetric and neonatal outcomes in patients with polycystic ovary syndrome. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n.1, p. 55-62, 2013.

GOLDMAN, B. D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 192, p. 29-31, 2003.

GOLDZIEHER, J.W. Polycystic ovarian disease. **Fertility and Sterility**, v.35: p.371- 394,1981.

GONZALEZ, F. et al. Reactive oxygen species induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, p. 336–340, 2006.

GUERRERO, J.; REITER, R. Melatonin-immune system relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p.: 167–179, 2002.

HARDELAND, R. et al. Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.

HARWOOD, K.; VUGUIN, P.; DIMARTINO-NARDI, J. Current approaches to the diagnosis and treatment of polycystic ovarian syndrome in youth. **Hormone Research**, v. 68, n. 5, p. 209-217, 2007.

HAYES, F. J. et al. Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine

and androgen dynamics. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.83, n. 7, p. 2343-2349, 1998.

HIRAI, M. et al. Androgen receptor mRNA in the rat ovary and uterus. *The Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology*, v., n.1, p. 1-7, 1994.

HIRIART, B. M. et al. Hormona de la oscuridad. **Revista latinoamericana de patologia clinica**. v. 59, n. 4, p. 222-232 , 2012.

HOGG, K. et al. Enhanced Thecal Androgen Production Is Prenatally Programmed in an Ovine Model of Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrinology**, v. 153, n. 1, 2012.

HOMBURG, R. Clomiphene citrate – end of an era? **Human Reproduction**, v. 20, p. 2043–2051, 2005.

HOMBURG, R. Should patients with polycystic ovarian syndrome be treated with metformin? A note of cautious optimism. **Human Reproduction**, v. 17, p. 853-856, 2002.

HUGHESDON, P. E. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called “hyperthecosis”. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 37, p. 59-77, 1982.

JAKIMIUK, A J. et al. Luteinizing Hormone Receptor, Steroidogenesis Acute Regulatory Protein, and Steroidogenic Enzyme Messenger Ribonucleic Acids Are Overexpressed in Thecal and Granulosa Cells from Polycystic Ovaries. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1318-1323, 2001.

JAKUBOWICZ, D. J. et al. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 524-529, 2002.

JONARD, S.; DEWAILLY, D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 107–117, 2004.

JONES, K. L. et al. Effect of metformin in pediatric patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 1, p. 89-94, 2002.

KABIRI, N.; TABANDEH, M. R.; TABATABAIE, S. R. F. Beneficial effects of pioglitazone and metformin in murine model of polycystic ovaries via improvement of chemerin gene up-regulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 22-39, 2014.

KIRPICHNIKOV, D.; MCFARLANE, S. I.; SOWERS, J. R. Metformin: an update. **Annals of Internal Medicine**, v. 37, n. 1, p. 25-33, 2002.

KNOCHENHAUER, E. S. et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 3078–3082, 1998.

KOVO, M. et al. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. **European Journal**

of **Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 136, p. 29–33, 2008.

LAUTATZIS, M. E.; GOULIS, D. G.; VRONTAKIS, M. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. **Metabolism clinical and experimental**, v. 62, p. 1522-1534, 2013.

LEE, C.K. et al. Circadian expression of Mel1a and PL-II genes in placenta: effects of melatonin on the PL-II gene expression in the rat placenta. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 200, p. 57-66, 2003.

LEE, D.W.; MARKOFF, E. Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 62, p. 990-994, 1986.

LI, M.; SCHATTE, H.; SUN, Q. Y. Androgen receptor's destiny in mammalian oocytes: a new hypothesis. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n. 3, p. 149–154, 2009.

LIU, C. et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. **Neuroscience**. v. 19, p.: 91–102, 1997.

LOPES, L.C.T. Risco cardiovascular em mulheres com síndrome de ovários policísticos. **Siicsalud**, v. 4, p.1-6, 2001.

LUBOSHITZKY, R. et al. Increased 6-sulfatoxymelatonin excretion in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 506–510, 2001.

LUCIANO, A. A. A. et al. Hiperprolactinemia in Polycystic Ovary Syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 41, p.719-725, 1984.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in neuroendocrinology**. v. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

MAGANHIN, C. C. et al. Melatonin effects on the female genital system: a brief review. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.54, n.3, p. 267-271, 2008.

MAILLIET, F. et al. Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH: quinone oxidoreductase 2 enzyme. **Biochemical Pharmacology**. v. 71, n.1-2, p. 74-88, 2005.

MAN'CHEVA, T.A. et al. Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrene in female mice. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 151, n. 3, 2011.

MANSFIELD, R. et al. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 956–962, 2003.

MARCH, W. A. et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 544-51, 2010.

MARONDE, E. et al. Dynamics in enzymatic protein complexes offer a novel principle for the regulation of melatonin synthesis in the human pineal gland. **Journal of Pineal Research**. v. 51, n. 1, p.145–155, 2011.

MASANA, M. et al. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p.: 1295–1302, 2002.

MATHEUS, N. et al. La melatonina um potente imunomodulador. **Revista del colégio del médicos veterinários del estado Lara**, v. 2, n. 1, 2012.

MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. **10th Ed. Saunders Inc.**, p.177-279, 2003.

MELO, A. S. et al. Mulheres com síndrome dos ovários policísticos apresentam maior frequência de síndrome metabólica independentemente do índice de massa corpóreo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 34, n. 1, p. 4-10, 2011.

MICHELMORE, K. F. et al. Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. **Clinical Endocrinology**, v. 51, p.779–786, 1999.

MOLINARI, E. J.; NORTH, P. C.; DUBOCOVICH, M. L. 2-Iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. **European Journal of Pharmacology**. v. 301, p.: 159-168, 1996.

MOLTICH, M. Pregnancy and the hyperprolactinaemic woman. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 1364-1369, 1978.

MORAN, L. J. et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 16, p. 347–363, 2010.

NAJI, L. et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life Science**. v. 74, p.: 2227–2236, 2004.

NAKAMURA, Y. et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto- placental unit during pregnancy. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 1, p. 29-33, 2001.

NESTLER, J. E.; JAKUBOWICZ, D. J. Decreases in ovarian cytochrome P450c17_ activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 617–623, 1996.

NORMAN, R. J. Metformin – comparison with other therapies in ovulation induction in polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 89, p. 4797-4800, 2004.

NORMAN, R. J.; WU, R.; STANKIEWICZ, M. T. Polycystic ovary syndrome. **The Medical Journal of Australia**, v. 2, n. 180, p. 132-137, 2004.

O'DEA, L. et al. Follicular development induced by recombinant luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in anovulatory women with LH and FSH deficiency: Evidence of a threshold effect. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, p. 2785–2793, 2008.

OKATANI, Y. et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. **European journal of pharmacology**, v. 469, n. 1-3., p. 145-152, 2003.

OKATANI, Y.; SAGARA, Y. Enhanced nocturnal melatonin secretion in women with functional secondary amenorrhea: relationship to opioid system and endogenous estrogen levels. **Hormonal Research**, v. 43, n. 5, p. 194-199, 1995.

OTA, H. et al. Ovarian membranes receptors for LH, FSH and Prolactina during the Menstrual Cycle and in Polycystic ovary Syndrome. **The Journal of Experimental Medicine**, v.149, p. 231-240, 1986.

PALMA, G. A. Review Article Biology and Biotechnology of Follicle Development. **The Scientific World Journal**, v.1, p. 1-14, 2012.

PALOMBA, S. et al. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 1–50, 2009.

PANDI-PERUMAL, S. et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, p.: 335–353, 2008.

PARKS, J.S. Hormones of the hypothalamus and pituitary. **Elsev Pennsylv.**, p. 1845-1869, 2004.

PEHRSON, J. J. W. L. Effect of Dopamine on gonadotropine-releasing hormone-induced gonadotropine secretion in postmenopausal woman. **The Journal of Clinical Endocrinology**, v. 48, p. 718-720, 1983.

PEKELMANN, R. M. et al.. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v. 1, p. 143-148, 2003.

PELLEGRINI, I. et al.. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. **Molecular Endocrinology**, v. 6, p. 1023-1031, 1992.

PEPPARD, H. R. et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome among premenopausal women with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1050-1052, 2001.

PERKS, C.M. et al. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 18, n. 12, p. 2672-2677, 2003.

PILTONEN, T. et al. Serum anti-mullerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 20, p. 1820-1826, 2005.

PLACHOT, M. et al. Oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome. **Gynecologie, Obstetrique & Fertilité**, v. 31, p. 350–354, 2003.

POLSON, D. W. et al. Polycystic ovaries: a common finding in normal women. **Lancet**, v. 1, p. 870-872, 1988.

PONTES, G. N. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of pineal research**. v. 41, n. 2, p. 136–141, 2006.

PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 987–95, 2004.

QUAILE, M. P. et al. Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology** , v. 243, p. 340–347, 2010.

RAJU, G. A. R. et al. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. **Journal of Human Reproductive Science**, v. 6, n. 4, p. 227–234, 2013.

REITER, R. J. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 917, p.: 376-386, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanism of ageing and development**, v. 123, n. 8, p. 1007-1019, 2002.

REITER, R. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**. v, 12, p.: 151–180, 1991.

REPERT, S et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel1b melatonin receptor. **Proceedings of the Natinal Academy of Science**. v. 92, p.: 8734–8738, 1995.

REPERT, S. M. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 12, p. 528-531, 1997.

REZVANFAR, M. et al. Mechanistic links between oxidative/nitrosative stress and tumor necrosis letrozole-induced murine polycystic ovary: biochemical and pathological evidences for beneficial effect of pioglitazone. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, p. 887–897, 2012.

ROCHA, R. M. P. et al. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta veterinaria brasílica**, v.5, n. 2, p.147-157, 2011.

ROONNBERG, L. et al. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, n. 2, p. 492-496, 1990.

ROSEFIELD, R. L. et al. Dysregulation of cytochrome P450c 17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. **Fertility and Sterility**, v.53, n. 5, p. 785-791, 1990.

ROSSI, A. G. et al. Metoclopramide induced hyperprolactinemia affects mouse endometrial morphology. **Gynecological and Obstetric Investigation**, v. 4, n. 54, p. 185-190, 2002.

ROTTERDAM EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 81, p. 19-25, 2004.

ROY, D. et al. Cyclical regulation of GnRH Gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4711-4720, 2001.

RUAN, W. et al. Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. **Endocrinology**, v. 136, p. 1296-1302, 1995.

SANDERSON, J. T. Placental and fetal steroidogenesis. Methods. **Molecular Biology**, v. 550, p. 127-133, 2009.

SANTIAGO-MORENO, J. et al. Effect of constant-release melatonin implants and prolonged exposure to a long day photoperiod on prolactin secretion and hair growth in mouflon (*Ovis montanus*). **Endocrinology**, v. 26, p. 303-314, 2004.

SEKHON, L.H. et al. Female infertility and antioxidants. **Current Women Health Reviews**, v. 6, n. 2, p.84-95, 2010.

SEN, A.; HAMMES, S.R. Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 7, p. 1393–1403, 2010.

SHAO, R. et al. Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 748-757, 2008.

SHIROTA, M.D. et al. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. **Molecular Endocrinology**, v. 41, p. 1136-1142, 1990.

SHOKEIR, T.; EL-KANNISHY, G. The effects of laparoscopic ovarian drilling on flow mediated dilation in women with PCOS: relationship with insulin resistance and IGF-I. **Minerva Ginecologica**, v. 66, n. 2, p. 209-18, 2014.

SILVA, A. C. J. R. et al. Aspectos Fisiológicos do LH na Foliculogênese. **Femina**, v. 34, n. 7, p. 469-476, 2006.

SIRMANS, S. M.; PATE, S. K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 1-13, 2014.

SIR-PETERMANN, T. et al. Síndrome de ovario poliquístico y embarazo. **Revista Medicina Chilena**, v. 140, p. 919-925, 2012.

SIR-PETERMANN, T. et al. Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 6, p. 1923–1930, 2009.

SKWARLO-SONTA, K. et al. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. **Canadian Journal of Physiology Pharmacology**. v. 81, p.: 342–349, 2003.

SLOMINSKI, R M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.

SOARES, J. M. et al. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 306, p.: 694-702, 2003.

SOWERS, M. R. et al. Anti-Mullerian Hormone and Inhibin B in the Definition of Ovarian Aging and the Menopause Transition. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 3478-3483, 2008.

SPRITZER, P. M. Polycystic ovary syndrome: reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 58, n. 2, p.182-187, 2014.

STEIN, I. F.; LEVENTHAL, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **America Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 181–191, 1935.

STEWART, M. D. et al. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*. 2000; **62**: 1779-1789.

SUN, X.; ZHANG, D.; ZHANG ,W. Effect of metformin on ovulation and reproductive outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 288, p. 423–430, 2013.

TAKAYAMA, K. et al. Immunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1387-1392, 1996

TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**. v. 44, p.: 280-287, 2008.

TAMURA, H. et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v. 5, n. 5, p. 1-9, 2012.

TAMURA, H. et al. Melatonin and female reproduction. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 40, n. 1, p.: 1–11, 2014.

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. v. 92, p.: 328-343, 2009.

TAMURA, H. et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, v. 60, n. 1, p.; 1-13, 2013.

TAMURA, H. M. D. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

TANAKA, M. et al. Differential effects of sex steroid hormones on the expression of multiple first exons including a novel first exon of prolactin receptor gene in the rat liver. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 34, p. 667-673, 2005.

TARTARIN, P. et al. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 11, p. 3304–3314, 2012.

TEEDE, H.; DEEKS, A.; MORAN, L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. **BMC Medicine**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2010.

TEIXEIRA, A. A. C. et al. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **International journal of morphology**, v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.

THESSALONIKI ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 3, p. 505-522, 2008.

URBANETZ, A. A. et al. Síndrome do ovário policístico: aspectos atuais das abordagens terapêuticas – Parte 2. **FEMINA**, v. 37, n. 6, p. 339-345, 2009.

VAN HOUTEN, E. L. A.F.; VISSER, J. A. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function? **Reproductive Biology**, v. 14, p. 32-43, 2014.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiology reviews**, v. 78, n. 3, p.: 687-721, 1998.

VANECEK, J. Cellular mechanism of melatonin action in neonatal rat pituitary. **Neuroendocrinology**, v. 61, n.1, p. 27-30, 1995.

VANKY, E. et al. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 5, p.1575-1578, 2005.

VASKIVUO, T. Regulation of Apoptosis in the Female Reproductive System. PhD [dissertation] Oulu, Finland: University of Oulu; 2002.

VÁZQUEZ, N. et al. Efecto de la glándula pineal materna en las variaciones hormonales estacionales del eje neuroendocrino-reproductor de los descendientes. **Endocrinology nutritional**, v. 51, n. 10, p. 534-41, 2004.

WARREN,D.M. et al. Effects of dihydrotestosterone and prolactin on lacrimal gland function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 350, p. 99-104, 1994.

WEBBER, L. J. et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. **Lancet**, v. 362, p. 1017-1021, 2003.

WICKENHEISSER, J. K. et al. Differential activity of the cytochrome P450 17 α -hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 85, p. 2304-2311, 2000.

WILD, R. A. et al. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 1-11, p. 1073-1079, 2011.

WU, W. X. et al. The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. **The Journal of Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 255-261, 1995.

YEN, S.S.C. The polycystic ovary syndrome. **Clinical Endocrinology**, v.12: p.177-182, 1980.

ZALATAN, F.; KRAUSE, J.; BLASK, D. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes *in vitro* by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. **Endocrinology**, v. 142, p.: 3783–3790, 2001.

CAPÍTULO 2

Título curto: Receptores Mel1a e PRLR na SOP.

Título: Expressão dos receptores de melatonina (*Mel1a*) e prolactina (*PRLR*) durante a gestação em ratas, após tratamento com melatonina e metformina para policistose ovariana

Carolline Guimarães D'assunção¹; Ana Janaína Jeanine Martins Lemos¹; Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório¹; Manoel Adrião Gomes Filho¹; Diogo Manoel Farias da Silva¹; Fabrício Bezerra de Sá¹; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹; Valéria Wanderley Teixeira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Brasil

* Autor de correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s / n Dois irmãos-Recife-PE, Brasil. CEP 52171-900. Tel +55 81 33206389
Email: valeria@dmfa.ufrpe.br (Wanderley-Teixeira, V)

Sumário: Metformina e melatonina para o tratamento da SOP atuam diretamente na expressão dos receptores de prolactina e melatonina ovarianos durante a gestação

RESUMO

A melatonina exerce efeitos diretos sobre o sistema reprodutor feminino atuando através de receptores específicos, como o Mel1a, encontrado na superfície de diferentes células ovarianas. Este hormônio também apresenta uma correlação com a síntese e liberação de prolactina, hormônio encontrado elevado em diversas portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Assim, objetivou-se avaliar o efeito da administração da melatonina exógena associada ou não a Metformina sobre a expressão dos receptores de melatonina (Mel1a) e prolactina (PRL II) em ovários, durante a gestação em ratas, após tratamento para a SOP. Para isso, utilizou-se 75 ratas albinas divididas em cinco grupos: I- ratas sem indução da policistose ovariana (controle); II – ratas com SOP (SOP + placebo); III – ratas com SOP e tratadas com melatonina (SOP + Mel); IV - ratas com SOP e tratadas com metformina (SOP + Met); V – ratas com SOP e tratadas com melatonina e metformina (SOP + Mel + Met). Após confirmação da SOP por ultrassonografia ovariana, os animais foram tratados com melatonina (200 µg/100g de peso corporal do animal) e metformina (50mg/100g de peso do animal) durante 10 dias, para posterior acasalamento. Os ovários foram então coletados nos tempos de 7, 14 e 21 dias de prenhez, para extração e quantificação por Real Time PCR, do mRNA dos receptores de Mel1a e PRL II. Os resultados mostraram que para o receptor Mel1a, a utilização da metformina ou a associação desta com a melatonina restaura a expressão desse receptor a níveis semelhantes aqueles observados no grupo controle durante a gestação. Já para o receptor PRL II, os tratamentos com as monoterapias, ou com a combinação dos fármacos

promoveu um mesmo padrão de expressão do receptor. Assim, pode-se concluir que o tratamento associativo utilizando Melatonina e Metformina para a SOP promove uma regulação nos níveis de expressão dos receptores Mel1a e PRL II durante a gestação.

Palavras-chave: Gestação, Melatonina, Prolactina, SOP, Receptores

INTRODUÇÃO

A melatonina, conhecida também como N-acetil-5-metoxitriptamina, é um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, que participa de uma grande variedade de processos celulares, neuroendócrinos e neurofisiológicos (1,2). Intimamente relacionada com a reprodução, a habilidade desta indolamina na modulação da função ovariana depende não somente dos seus níveis circulantes, mas também da expressão dos seus receptores (2,3). Três tipos de receptores de melatonina estão distribuídos em diferentes tecidos, sendo o receptor Mel1a associado a efeitos reprodutivos e circadianos, o Mel1b envolvido na sensibilidade da retina à luz, e o Mel1c, apenas encontrado em anfíbios (4-7). Embora desempenhe importante papel nas funções reprodutivas, com elevação característica dos seus níveis séricos durante a gestação, pouco se sabe sobre a expressão dos seus receptores no decorrer desse período (8,9).

Além disso, a melatonina é considerada também um potente agente antioxidante e eliminador de radicais livres (10). Vários estudos têm demonstrado que diferentes doenças do sistema reprodutor feminino são

decorrentes do estresse oxidativo (11), como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), na qual a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação cônica, mas também a diminuição dos oócitos e a qualidade do embrião (12) e sabe-se que a concentração de melatonina intrafolicular foi significativamente menor em mulheres com SOP quando comparadas a mulheres saudáveis, mesmo existindo elevadas concentrações de indolamina no soro, sendo esse aumento sérico, por sua vez, devido a um *feedback* para os níveis insuficientes de melatonina no ovário (37).

Outra característica pode ser observada nas pacientes com esta síndrome são os altos níveis de prolactina (hiperprolactinemia), que podem ser associados a disfunções gonadais, anovulação e infertilidade feminina (13), sendo tal condição observada em 35% das portadoras da SOP (14). A prolactina regula as funções gonadais, participando da esteroidogênese, formação do corpo lúteo, e modulação dos efeitos das gonadotrofinas, estimula também a produção de leite pelas mulheres durante a fase pós parto, o crescimento, desenvolvimento e metabolismo fetal e é importante para a degradação do corpo lúteo e redução dos níveis dos esteróides sexuais no ciclo menstrual, além de estimular o processo de ovulação, implantação e desenvolvimento placentário (14). As ações deste hormônio são mediadas através de receptores específicos, os PRLRs, localizados na superfície celular do útero e ovários (15,16).

Em animais sazonais, é possível observar uma relação direta entre os níveis de prolactina e melatonina, onde esta indolamina regularia a síntese e

liberação de prolactina, entretanto controvérsias com relação a esta regulação e seus possíveis mecanismos ainda são frequentemente observadas (17).

Devido a tais características, pesquisas têm sugerido a utilização de antioxidantes, como a melatonina, associados a tratamentos já existentes, para terapia de patologias que causam infertilidade (18,19).

Dentre os tratamentos preconizados para a SOP a metformina, uma biguanida utilizada para tratar pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se o agente mais utilizado devido a suas ações diretas na esteroidogênese (19,20). Para as portadoras que desejam tratar a infertilidade, com o objetivo de engravidar, torna-se muito comum a necessidade de utilização de drogas que não apresentem riscos teratogênicos (21), entretanto, permanecem escassos estudos realizados durante o período gestacional em pacientes que foram tratados com metformina para SOP (21-23).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a expressão dos receptores de melatonina e prolactina nos ovários de ratas durante a gestação, após tratamento associativo da melatonina e metformina para a polícistose ovariana.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 75 ratas albinas, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando 200 ± 30 g, procedentes do

Biotério do mesmo Departamento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 23081.009130/2010.

As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, ao acaso, em cinco grupos, nos tempos de 7, 14 e 21 dias de prenhez, cada um contendo cinco animais;

Grupo I - ratas sem indução da policistose ovariana mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas por 100 dias (Controle) e acasaladas em seguida;

Grupo II - ratas induzidas a policistose ovariana e acasaladas em seguida (SOP + Placebo);

Grupo III - ratas induzidas a policistose ovariana e tratadas com melatonina por 10 dias e acasaladas em seguida (SOP + Mel);

Grupo IV - ratas induzidas a policistose ovariana e tratadas com metformina por 10 dias e acasaladas em seguida (SOP + Met);

Grupo V - ratas induzidas a policistose ovariana tratadas com melatonina e metformina por 10 dias e acasaladas em seguida (SOP + Mel + Met).

Indução da Síndrome dos ovários policísticos

Para indução da SOP, as ratas dos grupos II, III, IV e V, foram submetidas a estímulo luminoso constante, utilizando-se uma caixa de madeira com área 0,5 m³, com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas

fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 400 lux. Estas lâmpadas permaneceram acesas ininterruptamente por um período de 100 dias, tempo suficiente para o desenvolvimento da SOP (24,25). A confirmação da SOP foi realizada mediante observações em ultrassonografias.

Ultrassonografia Ovariana

As análises ultrassonográficas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE e o exame diagnóstico definido por médico veterinário experiente na avaliação. As imagens foram capturadas após a indução da policistose ovariana com a utilização da máquina de ultrassom da marca ESAOTE/ Modelo MyLab™ 30 GOLD com transdutor linear de frequência 10MHz. Para tanto, as ratas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular e imobilizadas manualmente. O abdômen da rata foi umedecido com álcool 70% e em seguida, identificou-se a posição e tamanho dos ovários tomando-se como referencia a posição caudal dos rins e a hipoecogenicidade do órgão.

Tratamento com Cloridrato de Metformina

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos IV e V, na dosagem de 50mg/100g diluído em 0,05mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al. (26), durante dez dias consecutivos. O grupo II recebeu apenas água destilada.

Tratamento com Melatonina

O tratamento com melatonina foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima (24), nas ratas do grupo III e do grupo V. A melatonina (Sigma, *St. Louis, MO, USA*) foi administrada na dose de 200 µg/100g de peso corporal do animal, dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em 0,2mL de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl), por meio de injeções subcutâneas no início da noite (18:00h) por dez dias consecutivos.

Acasalamento dos animais e confirmação de cópula

Após 100 dias de experimento e respectivos tratamentos, as fêmeas foram submetidas ao acasalamento na proporção de um macho para duas fêmeas, diariamente, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã seguinte (06:00h), foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozóides nos esfregaços vaginais, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

Extração do RNA

Ao final dos experimentos as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular aos 7, 14 e 21 dias de prenhez para coleta do órgão.

As amostras dos ovários, devidamente identificadas, foram acondicionadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA. Posteriormente, a amostra foi transferida para um almofariz resfriado com N₂,

para ser submetida a um processo de maceração. Após esta etapa, o material foi transferido para um tubo tipo eppendorf e o RNA foi extraído e isolado utilizando Trizol.

O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Bionate3 da Thermocientific) e analisado em gel de agarose a 1,5%, (Pronadisa), corado com Syber Green II (RNA- LCG Biotecnologia), analisado em luz ultravioleta e fotografado (Olympus – Digital Câmara – C-7070 Wide) para verificação de sua qualidade.

Transcrição reversa (RT- PCR)

A primeira fita do cDNA sintetizada pela transcriptase reversa foi acoplada ao sistema RT-PCR usando um adaptador 3'-Oligo(dT)18 (Quiagen), 1 µg de RNA total e 1U de transcriptase reversa (Promega, Madison, WI) nas condições recomendadas pelo fabricante, usando 0,5 µg de primers randômicos (Roche, Nonnenwald, Germany). As amplificações dos cDNA dos genes Mel1a e PRL II foram carreadas no Rotor-Gene 3000 operados com o software versão 6.0.19 (Corbett Research, Mortlake, 2137 NSW, Austrália; www.corbettlifescience.com).

Reação de amplificação (PCR) Real Time

As amplificações foram realizadas no Rotor-geneq (Quiagen) consistindo de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C (3min), seguida de 60 ciclos com 95°C (3seg), posteriormente, 60°C por 30 minutos, para o anelamento das sondas (temperaturas específicas para cada sonda dependendo da região a

ser amplificada) a extensão final foi de 45°C por 40 segundos. Após a ciclagem, foi estabelecida uma curva de amplificação adequada para cada gene amplificado para estabelecimento de amplificações inespecíficas (14).

Curva de padronização das expressões gênicas

Para quantificação relativa dos receptores Mel1a e PRL-II foram utilizadas separadamente sondas de hidrólise TaqMan® obtida da Quiagen® para amplificar cada receptor, Mel1a e o PRL II, e o outra para um controle endógeno, β -actina, que serviu como padrão de comparação . Os genes Mel1a e PRL II foram normalizados a partir do β -actina. A análise da expressão foi realizada pela comparação da diferença nos valores das curvas thresholds (Ct) entre as amostra analisadas e o gene basal, seguindo a fórmula ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (27).

Análise estatística

A análise estatística da expressão dos receptores Mel1a e PRL II foi realizada em um programa computacional GraphPad Prism 5, onde dados foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$), os valores apresentados nos gráficos estão expressos, no eixo Y, em logaritmo na base 10 .

RESULTADOS

Ultrassonografia ovariana

As análises ultrassonográficas permitiram mensurar as dimensões ovarianas das ratas e identificaram a porção hipoeecogênica dos ovários policísticos dos grupos II (SOP+Placebo), III (SOP + Mel), IV (SOP + Met) e V (SOP + Mel + Met), os quais apresentaram evidencia dos seus cistos foliculares, diferindo significativamente do grupo I (Controle) (Fig.1).

Expressão do receptor Mel 1a e PRLR

Comparando-se cada grupo durante o período gestacional, foi possível observar que nos ovários das ratas do grupo controle o receptor de Melatonina (Mel1a), em condições fisiológicas, apresenta uma diminuição gradual significativa de sua expressão com o decorrer da gestação (Fig. 2A). Por outro lado, não foram evidenciadas diferenças na expressão do receptor nos animais com Policistose ovariana que não receberam tratamento, grupo II (SOP + Placebo) (Fig. 2B). Os animais do grupo com SOP tratados com Melatonina, apresentaram uma evidente diminuição do receptor Mel 1a no terço médio da gestação, ou seja, com 14 dias de prenhez (Fig. 2C). Já nos grupos tratados com Metformina, Grupo IV, e com as drogas associadas (Metformina e Melatonina), Grupo V, foi observada uma redução significativa na expressão desse receptor ao longo da gestação, como observado no grupo controle (Fig. 2D e 2E).

Com relação ao receptor de prolactina (PRL-II), analisando cada grupo no decorrer da gestação, foi possível observar que a expressão desse receptor aumenta com o decorrer desse período, apresentando diferenças significativas entre os animais do grupo I (Controle) (Fig. 3A). Diferenças que não foram observadas no grupo II (SOP + Placebo) (Fig. 3B). Já os animais do grupo III (SOP + Mel) apresentam uma acentuada diminuição da expressão de PRL II no terço médio da gestação, com diferenças significativas entre 14 e 21 dias (Fig. 3C). Já os grupos IV (SOP + Met) e V (SOP + Mel + Met), o receptor de prolactina apresentou-se diminuição significativa em sua expressão no terço médio da gestação, com diferenças significativas entre 7 e 14 dias (Fig. 3D e E).

Para identificar uma possível influência da melatonina sobre a prolactina, uma análise comparativa entre a expressão de ambos os receptores foi realizada nos diferentes grupos experimentais. Analisando o grupo controle no decorrer da gestação, foram observadas diferenças significativas entre os genes (Mel1a e PRL-II), onde no início da gestação o receptor de melatonina encontra-se com expressão elevada e o receptor de prolactina com baixa expressão, demonstrando que com 7 dias de prenhez esses receptores se apresentam de forma antagônica, além disso, diferença entre o receptor Mel 1a com 7 dias de prenhez e PRL-II com 14 dias também foram observadas (Fig. 4A). Por outro lado, não foram evidenciadas diferenças entre os genes no grupo II (SOP + Placebo) durante toda a gestação (Fig. 4B). Nos demais grupos (Grupos III, IV e V), as diferenças apresentadas foram semelhantes as observadas no grupo controle, ou seja, entre o gene do receptor Mel1a com 7

dias de prenhez, e o gene do receptor PRL II com 14 dias de prenhez, (Fig. 4C, D e E).

DISCUSSÃO

As imagens ultrassonográficas são comumente utilizadas na prática clínica, e vem se tornando uma ferramenta indispensável para o diagnóstico de diversas patologias (28). Dentre estas, pode-se citar a síndrome dos ovários policísticos, na qual uma das manifestações clínicas e também um critério de diagnóstico utilizado se baseia no aumento ovariano e aparecimento de múltiplos cistos nesse órgão (29). Nossos resultados mostraram que a indução da SOP, utilizando-se o método de luz constante, promoveu o desenvolvimento de tais características, com o aumento ovariano dos animais induzidos a síndrome, comparando-se com menores dimensões observadas no grupo controle. A indução da SOP em modelos experimentais pelo método de luz constante vem sendo utilizada em vários estudos uma vez que mimetiza diversas características observadas nas pacientes com a síndrome, como as alterações ovárias (foliculares), diminuição dos níveis de FSH, de progesterona, bem como aumento nos níveis de testosterona e estrógeno (30-32).

Durante a gestação, sabe-se que a melatonina apresenta um aumento gradual em sua concentração sérica, atingindo valores elevados no final desse período e decaindo após o parto (9,33). Entretanto, a expressão do seu receptor Mel1a, encontrado na superfície de diversas células ovarianas, não apresenta essas mesmas características, como observado em nosso estudo,

com diminuição significativa na sua expressão com o decorrer desse período. Tais características podem ser decorrentes de uma correlação inversa entre os níveis séricos e expressão do receptor, onde a melatonina endógena poderia ter um papel regulatório nessa expressão (34), ou seja, o aumento do nível hormonal no soro acarretaria em uma diminuição da expressão do receptor Mel1a com o intuito de manter a concentração de melatonina intrafolicular em níveis fisiológicos adequados para o desenvolvimento e crescimento do folículo além de promover posteriormente uma proteção embrionária (33,35). Trabalhos também demonstram esta correlação inversa, como Chatteraj et al. (36), em estudos realizados com peixes, onde a expressão dos receptores de melatonina ovarianos (ambos, MT1 e MT2) em diferentes fases reprodutivas, durante um ciclo anual, apresentou-se de forma contrária aos níveis séricos de melatonina.

Na síndrome dos ovários policísticos (SOP), sabe-se que a concentração de melatonina intrafolicular é reduzida, entretanto observa-se um aumento nos seus níveis plasmáticos decorrente provavelmente de um *feedback* para os níveis insuficiente no ovário (37). Como os níveis séricos de melatonina são elevados na SOP, e durante o período gestacional ocorre um aumento gradual desse hormônio (9), não foram evidenciadas alterações na expressão do receptor Mel 1a, uma vez que os níveis de melatonina já se encontravam elevados a partir do momento da indução da síndrome, permanecendo assim durante todo o período gestacional.

O tratamento com a metformina e com a associação dos fármacos (Met+ Mel) promoveu um padrão de expressão do receptor Mel1a durante o período

gestacional semelhante ao observado no grupo controle. A metformina pode atuar nos ovários através de diversos mecanismos, podendo exercer efeitos diretos na esteroidogênese, através da ativação da enzima AMPK (Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase), que promove a inibição da atividade da CYP17 (enzima 17- α hidroxilase-17,20-liase) e consequentemente diminui a produção dos hormônios esteróides (38). Além disso, sabe-se que os níveis de tais hormônios, principalmente do estrógeno, podem afetar diretamente a expressão do receptor Mel1a, através de um aumento na ligação do receptor acoplado a proteína G, como demonstrado por Buhimschi et al. (39) e Soares Jr. et al. (40).

Já o tratamento com melatonina exógena, pode regular a expressão e a atividade da aromatase, atuando como uma enzima moduladora, e ainda contribuindo para um menor nível de estrógenos (41). Prévios estudos indicaram que a ligação da melatonina com seu receptor é alta durante o estro, proestro, e diestro, em contraste com baixos níveis no metaestro, quando as concentrações de estrógeno e progesterona são baixas (42,43). Assim, pode-se inferir que o estrógeno e a progesterona regulam a expressão e atividade de ligação do receptor MT1 (44). Além disso, sabe-se que tratamentos com melatonina exógena podem apresentar um efeito modulador sobre a expressão do seu receptor, sendo intimamente dependente da dose a ser utilizada e durante o período de tratamento (44-47), na qual doses elevadas e longo tempo de administração promovem um aumento na expressão desse receptor (44).

Durante a gestação, a produção de progesterona é um evento fundamental para o sucesso reprodutivo, em diversos mamíferos e roedores a sobrevivência do corpo lúteo e sua capacidade de produzir progesterona são altamente dependentes da ação da PRL (48,49).

Vários estudos demonstraram que os níveis séricos desse hormônio apresentam aumento gradual durante a gestação (50). Contrariamente ao receptor Mel1a, a expressão do receptor de PRL aumentou durante a gestação, atingindo valores elevados no terço final desse período. Em estudos semelhantes, onde a expressão desse receptor foi analisada durante o período gestacional foi observado que na fase final da gestação, por volta do 21º dia de prenhez, ocorre uma queda na expressão do PRLR (51). Tais características diferiram de nossos dados uma vez que a expressão do receptor foi analisada apenas no corpo lúteo. Entretanto, em estudo semelhante onde ocorreu a análise da expressão do receptor de PRL em todo conteúdo ovariano, observou-se também um aumento da expressão desse receptor ao longo da gestação (52), logo, o aumento sérico de prolactina leva a um aumento na expressão de seu receptor ovariano. Esta relação entre hormônio e receptor foi demonstrada por Telleria et al. (51), onde a PRL e o lactógeno placentar de ratas poderia super-regular a expressão de PRLR em ratos, ou seja seriam responsáveis pelo alto nível de expressão de PRLR durante a gestação.

Na SOP, estudos demonstram uma correlação entre essa patologia e níveis séricos elevados de PRL, condição que pode ser observada em 35% das pacientes (14). Desta forma os níveis de PRL são elevados na SOP e durante a gestação, provavelmente não ocorrendo variações na concentração sérica

deste hormônio que pudessem exercer um mecanismo de feedback interferindo assim na expressão de seu receptor, fazendo com que não houvessem alterações durante a gestação nos animais induzidos a SOP.

A administração da melatonina exógena promoveu uma diminuição na expressão do receptor Mel1a no terço médio da gestação, ou seja com 14 dias de prenhez. Essa mesma característica foi observada no receptor de PRL quando os animais foram submetidos aos tratamentos, tanto com as monoterapias quanto com a associação dos fármacos. Coincidentemente, nesse período, a partir do 7º dia de gestação, o blastocisto está completamente implantado e se inicia a fase de formação da placenta, que passa a ser responsável pela manutenção da gestação (53). Tais características podem ter afetado a expressão de ambos os receptores na fase intermediária da gestação, uma vez que nesse período a produção hormonal será principalmente realizada pela placenta, e sabe-se que os níveis de estrógeno, progesterona e prolactina podem influenciar diretamente a expressão do receptor Mel1a e PRLR (33) e que os tratamentos influenciam diretamente essa produção hormonal.

Além disso, em trabalhos realizados com ratas, onde os níveis de PRL foram mensurados durante o período gestacional, foi possível observar uma queda na concentração sérica desse hormônio na fase intermediária da gestação, entre 9 e 18 dias de prenhez, com posterior elevação sérica do hormônio na fase final, tal característica no padrão de produção da PRL poderia justificar a diminuição na expressão do receptor desse hormônio na

fase intermediária da gestação, como foi observado no nosso estudo, tanto com as monoterapias, quanto com a associação dos fármacos (54).

A melatonina e a prolactina são hormônios que desempenham diversas funções reprodutivas e parecem estar correlacionados, embora os mecanismos de regulação de tais hormônios não estejam totalmente elucidados (17). Em seus estudos Villauna et al. (55) observaram os efeitos da administração de melatonina na secreção de prolactina em hipófise de ratos, onde a melatonina administrada antes do período escuro resultou em uma diminuição acentuada dos níveis basais de prolactina no plasma dos ratos, sugerindo assim que a melatonina parece modificar a secreção de PRL através de múltiplos mecanismos complexos que pode depender do estado fisiológico (hormonal e neurotransmissor) dos animais.

Por outro lado, o estudo realizado por Agha, Mir e Jahan (56) defende que a melatonina aumenta ligeiramente a concentração de prolactina suprimindo a via dopaminérgica, uma vez que os receptores de melatonina apresentam alta afinidade na *pars tuberalis* da hipófise que aciona a ritmicidade sazonal do hormônio, mas, depois de uma hora a secreção de PRL era suprimida mostrando que o efeito da melatonina sobre a secreção de prolactina no plasma depende do tempo de administração da indolamina. Recentemente também foram encontrados receptores nucleares para melatonina, que pode atuar através destes receptores afetando o sistema adenohipofisário para modular a secreção de prolactina (56). Tais correlações observadas entre a melatonina e prolactina também foram observadas em nosso trabalho com relação a expressão de receptores, onde na fase inicial da gestação tais

receptores se comportaram de forma antagônica, bem como com as monoterapias e associação dos fármacos.

Conclusão

Desta forma foi possível concluir que a administração da melatonina associada a metformina para o tratamento da Síndrome dos Ovários Policísticos estabeleceu um padrão de expressão dos receptores Mel1a e PRL II durante a gestação, semelhante ao observado em condições fisiológicas.

REFERÊNCIAS

1. Hiriart BM, Morffis YS, Torres KU, Michel YDT, Sosa JLB. Hormona de la oscuridad. Rev latinoamer patol clin 2012; 59:222-232.
2. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. Phys. Reviews 1998; 78: 687-721.
3. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. Endocr J 2013; 60:1-13.
4. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother 2006; 60:97-108.
5. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Prog Neurobiol 2008; 85:335-53.

6. Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 1997; 12:528-31.
7. Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 460:181-90.
8. Tamura H, Takasaki A, Taketani T. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res* 2012; 5: 5.
9. Tamura H, Akihisa T, Toshiaki T, Manabu T, Lifa L, Isao T, Ryo M, Hiromi A, Yoshiaki Y, Norihiro S. Melatonin and female reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2014; 40: 1–11.
10. Maganhin, C. C. Carbonel AA, Hatty JH, Fuchs LF, Oliveira-Júnior IS, Simões Mde J, Simões RS, Baracat EC, Soares-Jr JM. Melatonin effects on the female genital system: a brief review. *Ass. Méd. Bra .* 2008; 54: 267-271.
11. Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, Agarwal A. Female infertility and antioxidants. *Cur Wom Heal Rev* 2010; 6:84-95.
12. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier A, Serkine AM, Boujenah A, Abirached F. Oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31:350-4.
13. Moltich M. Pregnancy and the hyperprolactinemic woman. *N Engl J Med* 1985; 312:1364-70.
14. Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223-36.
15. Lee DW, Markoff E. Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:990-4.

16. Shao R, Nutu M, Weijdegård B, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Tallet E, Goffin V, Ling C, Billig H. Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. *Biol Reprod* 2008; 79:748-57.

17. Lee CK, Moon DH, Shin CS, Kim H, Yoon YD, Kang HS, Lee BJ, Kang SG. Circadian expression of Mel1a and PL-II genes in placenta: effects of melatonin on the PL-II gene expression in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 200:57-66.

18. Dair EL, Simoes RS, Simões MJ, Romeu LR, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, Baracat EC, Soares JM Jr. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril* 2008; 89:1299-305.

19. Checa MA, Requena A, Salvador C, Tur R, Callejo J, Espinós JJ, Fábregues F, Herrero J; Insulin-sensitizing agents: use in pregnancy as therapy in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2005; 11:375-90.

20. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Ahmadi A, Saadi HA, Baeeri M, Abdollahi M. Mechanistic links between oxidative/nitrosative stress and tumor necrosis letrozole-induced murine polycystic ovary: biochemical and pathological evidences for beneficial effect of pioglitazone. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31:887-97.

21. Mota ELA, Domingues TS, Junior JM. O uso de sensibilizadores de insulina no tratamento de infertilidade em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP). *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2012; 34(3).

22. Silva FMS, Silva MHRA, Bracht A, Eller GJ, Constantin RP, Yamamoto NS. Effects of metformin on glucose metabolism of perfused rat livers. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; 340: 283–289.

23. Raso GM, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Cuzzocrea S, Canani RB. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 604: 125–131.

24. Prata Lima MF, Baracat EC, Simões MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:987-95.

25. Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley- Teixeira V, Soares Junior JM. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Intern jour morphol* 2004; 22:189-194.

26. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The mechanism involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:475-81.

27. Livak KJ, Schmittgen TD. *Methods.* 2001; 25: 402-408.

28. Marcondes JAM, Barcellos CRG, Rocha MP. Dificuldades e armadilhas no diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55:6-15.

29. Azziz, R. Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J. Cli. Endoc. Met.* 2006; 91:4237-4245.

30. Shi D, Vine DF. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fert. and Ster.* 2012; 98,1.
31. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:168–77.
32. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JI, Villuendas G, Sancho J, San Millan JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:806–11.
33. Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Reiter RJ, Sugino N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J Pineal Res* 2008; 44: 335–340.
34. Ligo, M, Furukawa, K, Tabata, M. Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* 2003; 347:49–52.
35. Roonnberg L. Kauppila A, Leppäluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J. Clin. Endo. Met.* 1990; 71: 492-496.
36. Chatteraj A, Seth M, Maitra SK. Localization and dynamics of Mel1a melatonin receptor in the ovary of carp *Catla catla* in relation to serum melatonin levels. *Comp. Bioch. Physio.* 2009; 152: 327–333.
37. Tamura HMD, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fert. Ster.* 2009; 92: 328-343, 2009.

38. Diamanti-Kandarakis E, Economou F, Palimeri S, Christakou C. Metformin in polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Sep;1205:192-8.

39. Buhimschi IA, Hall G, Thompson LP, and Weiner CP. Pregnancy and estradiol decrease GTPase activity in the guinea pig uterine artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2001;2812:168–2175.

40. Soares JM Jr, Masana MI, Erşahin C, Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:694-702.

41. Martínez-Campa CM, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ, Cos S: Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 94:249-254.

42. Okatani Y, Watanabe K, Morioka N, Hayashi K, Sagara Y: Nocturnal change in pineal melatonin synthesis during puberty: relation to estrogen and progesterone levels in female rats. *J Pineal Res* 1997, 22:33-41.

43. Moujir F, Bordon R, Santana C, Abreu P, Hernandez G, Alonso R: Ovarian steroids block the isoproterenol-induced elevation of pineal melatonin production in the female rat. *Neurosci Lett* 1990, 119:12-14.

44. Chuffa LG, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PF, Seiva FR, Novelli EL, de Mello Júnior W, Martinez M, Almeida-Francia CC, Martinez FE: Long-term exogenous melatonin treatment modulates overall feed efficiency and protects ovarian tissue against injuries caused by ethanol-induced oxidative stress in adult UChB rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2011, 35:1498-1508.

45. Díaz E, Fernández C, Castrillón PO, Esquifino AI, Marín B, Díaz López B: Effect of exogenous melatonin on neuroendocrine-reproductive function of middle-aged female rats. *J Reprod Fertil* 1999; 117:331-337.
46. Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smitz J: Melatonin has dosedependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* 2006; 228:333-343.
47. Wu-Cai Yang, Ke-Qiong Tang, Chang-Zhen Fu, Hasan Riaz, Qiong Zhang, Lin-Sen Zan. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. 2014;147:10-16
48. Gibori G. The corpus luteum of pregnancy. In: Adashi EY, Leung PCK (eds) *The Ovary*. Raven Press, 1994; 261–317.
49. Stocco, C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function and regression. *Endocr. Rev.* 2007;28:117–149.
50. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010:362–368.
51. Telleria CM, Parmer TG, Zhong L, Clarke DL, Albarracin CT, Duan WR, Linzer DIH, Gibori G. The Different Forms of the Prolactin Receptor in the Rat Corpus Luteum: Developmental Expression and Hormonal Regulation in Pregnancy*. *Endocrinology*, 1997; 138: 11, 1997.
52. Clarke DL, Linzer DI. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1993;133:224-32.
53. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Kuroda Y, Ogawa I. Effect of estrogen on rat placental development depending on gestation stage. 2013; 65:695–702.

54. Merchant F. Prolactin and Luteinizing Hormone Cells of Pregnant and Lactating Rats as Studied by Immunohistochemistry and Radioimmunoassay. Am. J. Anat.1997;139: 245-268.
55. Villanua MA, Agrasal C, Tresguerres JAF, Vaughan MK, Esquifino AI. Melatonin Effects on Prolactin Secretion in Pituitary-Grafted Male Rats. J Pineal Res.2007;6(1):33–41.
56. Zehra Agha, Asif Mir, Sarwat Jahan effect of single oral dose of melatonin on plasma concentration of prolactin and cortisol in male rhesus monkeys. Pak J Physiol 2010;6(2).

Legenda das Figuras

Figura 1: Imagens ultrassonográficas das dimensões dos ovários realizadas após a indução da SOP nos grupos experimentais. (A) Grupo I: 0,20 x 0,34cm. (B) Grupo II: 0,59 x 0,85. (C) Grupo III: 0,75 x 0,54cm. (D) Grupo IV: 0,54 x 0,82cm. (E) Grupo V: 0,50 x 0,78cm).

Figura 2: Expressão do receptor Mel1a nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A-** grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B-** grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C-** grupo III com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D-** grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez e **E-** grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

Figura 3: Expressão do receptor PRL II nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A-** grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B-** grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C-** grupo III com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D-** grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez e **E-** grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

Figura 4: Comparação entre a expressão do receptor Mel 1a e PRL II nos ovários das ratas dos diversos grupos experimentais, apresentando média $\pm$ desvio padrão. GI- Controle, GII- SOP + Placebo, GIII- SOP + Mel, GIV- SOP + Met, e GV- SOP + Mel + Met. **A-** Grupo I com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **B-** Grupo II com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **C-** grupo III com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **D-** grupo IV com 7, 14 e 21 dias de prenhez, **E-** grupo V com 7, 14 e 21 dias de prenhez. (*) grupos que diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

ANEXO

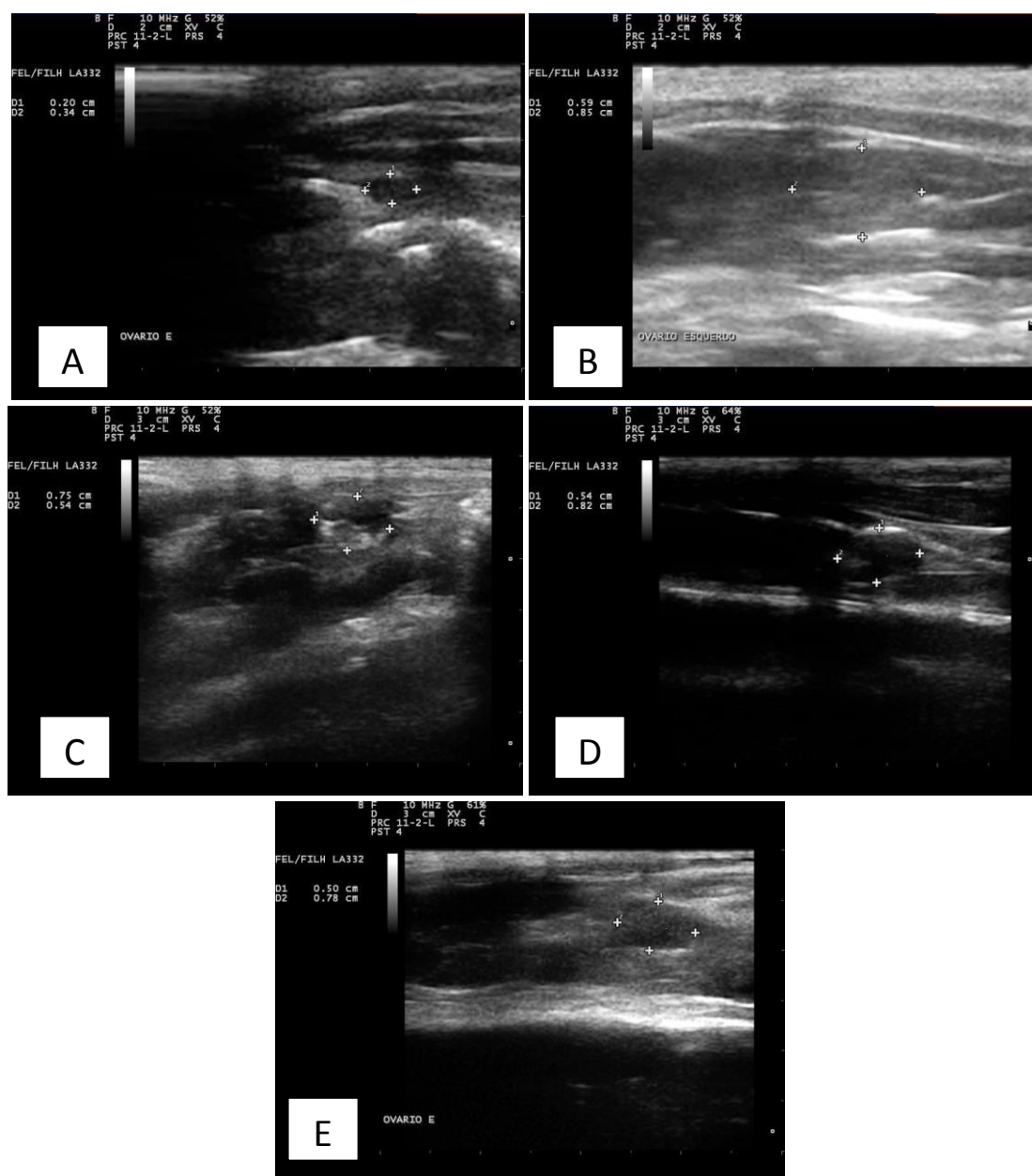


Figura 1.

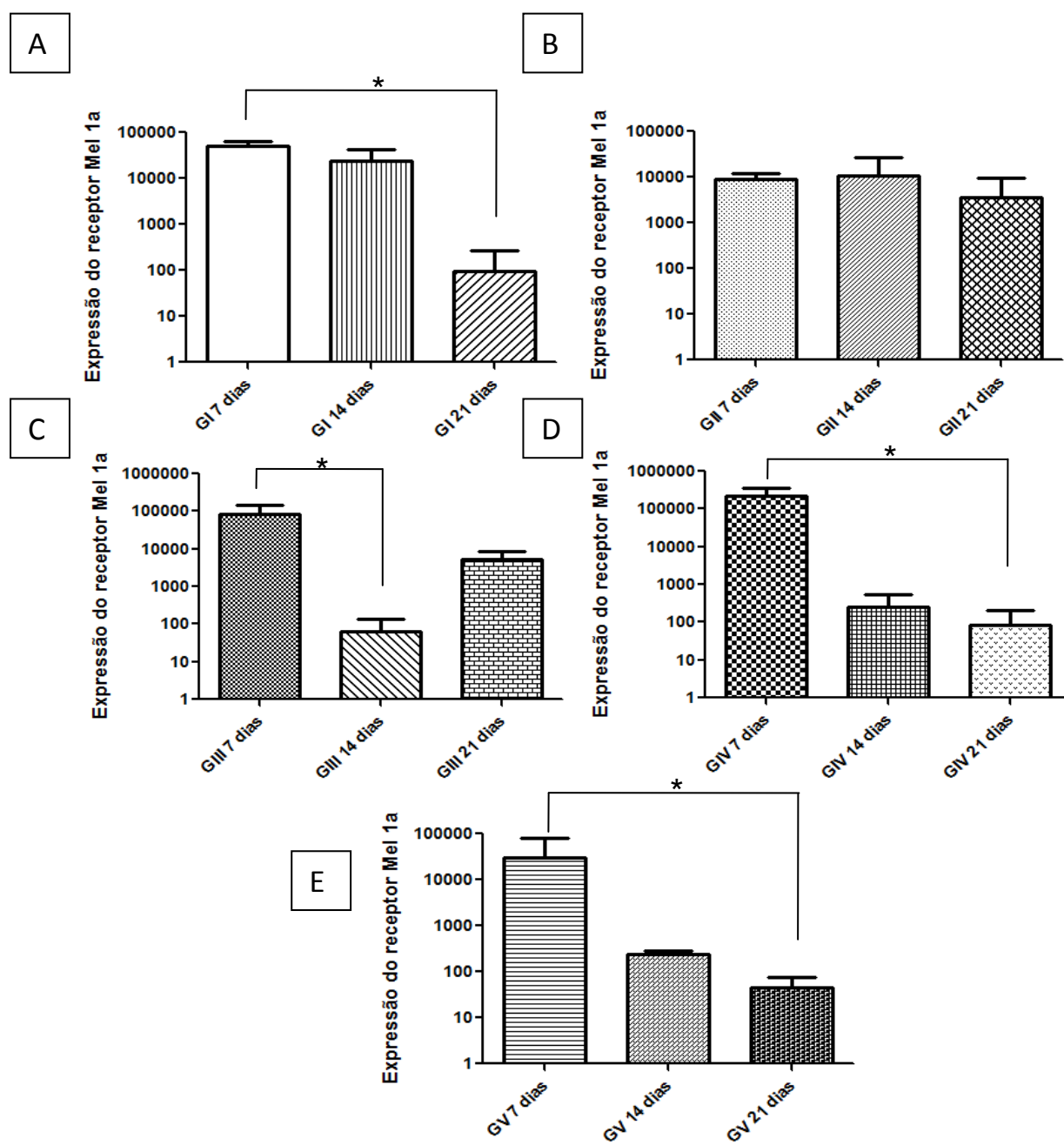


Figura 2.

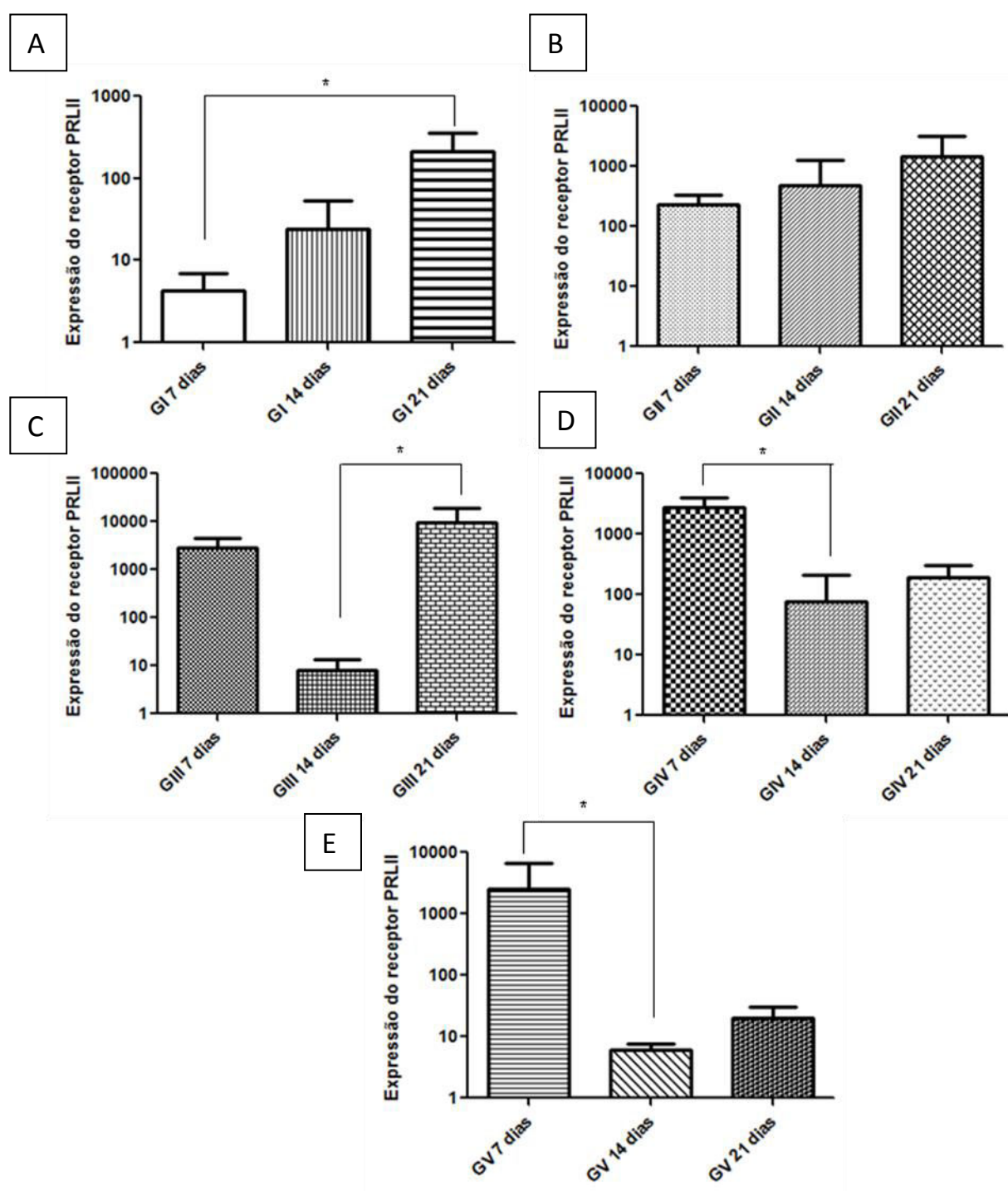


Figura 3.

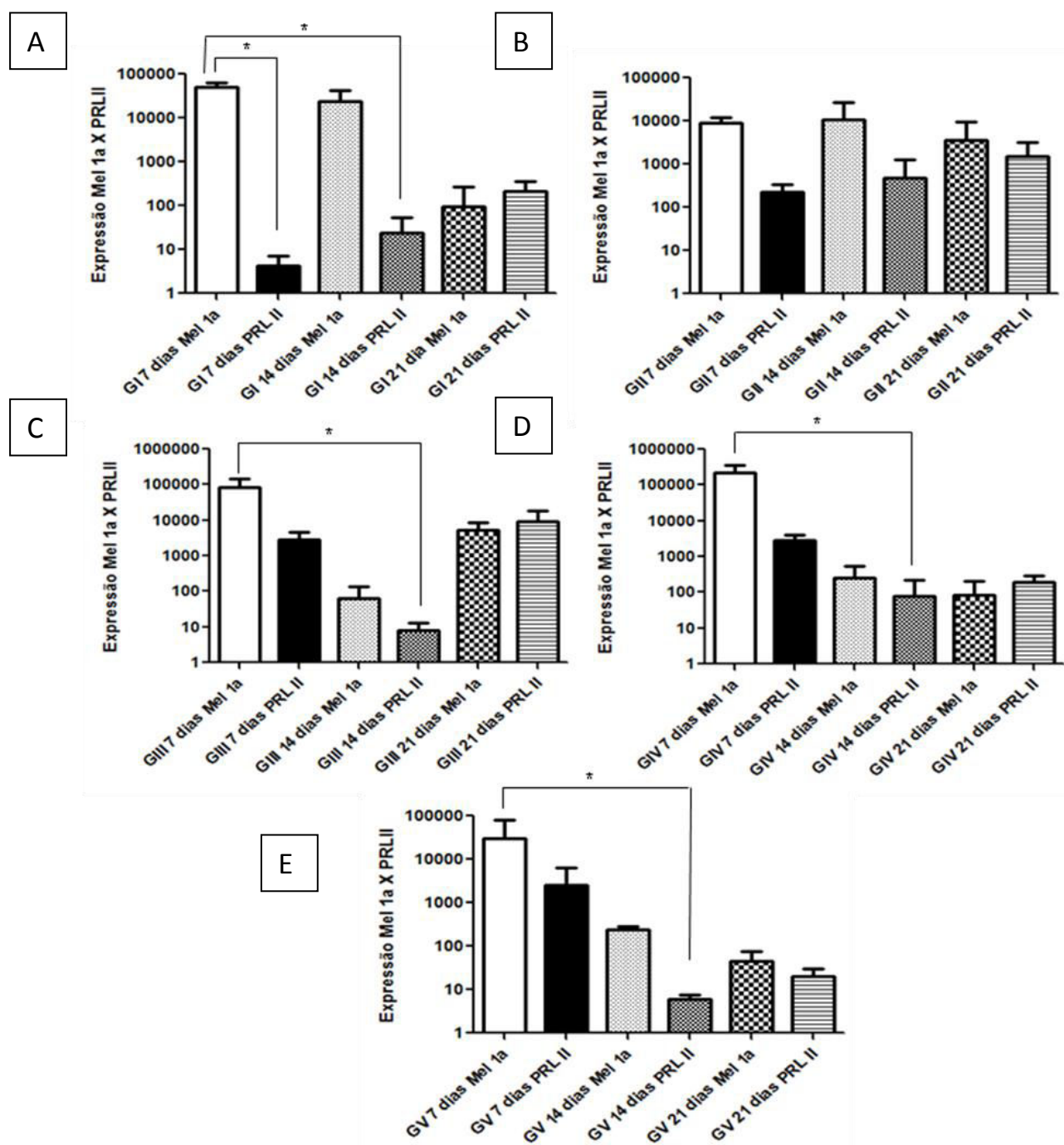


Figura 4.