



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Carolline Guimarães D'assunção

**Avaliação da metformina associada à melatonina no tratamento da
Síndrome dos Ovários Policísticos durante a gestação em ratas e seus efeitos
sobre a prole**

RECIFE

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CAROLLINE GUIMARÃES D'ASSUNÇÃO

**“AVALIAÇÃO DA METFORMINA ASSOCIADA À MELATONINA NO
TRATAMENTO DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE A
GESTAÇÃO EM RATAS E SEUS EFEITOS SOBRE A PROLE”**

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

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

RECIFE, 2019

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

D999a D'assunção, Carolline Guimarães

Avaliação da metformina associada à melatonina no tratamento da Síndrome dos Ovários Policísticos durante a gestação em ratas e seus efeitos sobre a prole / Carolline Guimarães D'assunção. – 2019. 109 f. : il.

Orientadora: Valéria Wanderley Teixeira.

Coorientadores: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Melatonina 2. Stein-Leventhal, Síndrome de 3. Ratos - Gestação 4. Infecundidade em animais I. Teixeira, Valéria Wanderley, orient. II. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, coorient. III. Título

CDD 636.089

CAROLLINE GUIMARÃES D'ASSUNÇÃO

**“AVALIAÇÃO DA METFORMINA ASSOCIADA À MELATONINA NO
TRATAMENTO DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE A
GESTAÇÃO EM RATAS E SEUS EFEITOS SOBRE A PROLE”**

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Prof. Dra. Ana Janaína Jeanine Martins de Lemos Jordão - UFCG

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

Prof. Dra. Ismaela Maria Ferreira de Melo -UFRPE

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. À minha família e amigos pelo carinho e apoio concedido em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

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

Primeiramente agradeço á 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;

À minha irmã Camilla, por sempre ter estado comigo me ajudando em todos os momentos que precisei;

Ao meu namorado, Augusto, por toda paciência e incentivo nessa caminhada, por não me deixar desistir e mostrar que tudo está apenas começando.

Agradeço á 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.

À todos do Laboratório de Histologia, em especial a Cintia Giselle, amiga de sempre, desde a graduação, por todos os momentos compartilhados, todas as angústias e comemorações, minha amiga da VIDA. Á Aline Mariano, Solange Bezerra (Sole), Ismaela Melo, Welma Emídio, Hilda Michelle, Rebeka Alves, Marina Baptista, Yuri Albuquerque por todo apoio, e por tornarem meus dias mais felizes, assim como Laíse Souza, Érique, Clovis, Laís, Glaucilane,

Hilton, Camila, Carol, Cris e Andrezo por toda ajuda, amizade, e momentos de brincadeiras e trabalhos árduos no laboratório;

À Fernanda Ângelo e Jeanine Lemos por todo ensinamento desde o início da minha jornada

À Diogo, Sandrinha e Suzy, por toda amizade e conhecimentos partilhados em genética e Biologia Molecular, amizade de laboratório que será pra todos os momentos.

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

À FACEPE pela conceção da bolsa;

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

RESUMO

A Síndrome dos ovários policísticos (SOP) reduz a taxa de ovulação além aumentar o risco de complicações durante a gestação, como o desenvolvimento de diabetes gestacional, hipertensão, de pré-eclampsia, nascimentos prematuros e abortos. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da melatonina associada a um tratamento pré-existente, a metformina, como uma alternativa terapêutica para o tratamento da SOP administradas antes e durante o período gestacional, e seus efeitos sobre a prole. Para isso foram utilizadas 40 ratas divididas em 5 grupos: Grupo I- Sem indução da SOP; II- Induzidos à SOP; III- Induzidos à SOP e tratados com Metformina; IV- Induzidos à SOP e tratados com Melatonina e V- Induzidos a SOP e tratados com Metformina e Melatonina. A indução foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos. A metformina foi administrado 10 dias antes e durante todo o período gestacional na dosagem de 50 mg/100g, também por gavagem, assim como a melatonina, na dose de 0,5mg/kg, por via oral, diluída na água de beber. Foram realizadas análises hormonais, bioquímicas, imunohistoquímicas, morfológicas e morfométricas, além do acompanhamento do ganho de peso dos animais e o índice organossomático tanto da matrizes, quanto dos neonatos. Foi possível observar que a melatonina exógena foi mais eficiente em reverter os parâmetros decorrentes da indução da SOP nas matrizes, como a aciclicidade estral, aumento do peso corporal, alterações metabólicas (elevação nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, e LDL) ovarianas (cistos ovarianos) e hormonais, do que sua associação com a metformina. Essa por sua vez, também apresentou efeitos benéficos em relação a alguns parâmetros decorrentes da policistose, entretanto, sua utilização durante a gestação promoveu algumas alterações nos filhotes, como diminuição do peso dos ovários, vacuolização e degeneração dos túbulos seminíferos, alterações nos níveis de estrógeno e testosterona e na expressão dos receptores androgênicos testiculares. Já os filhotes das matrizes que receberam melatonina durante a gestação, apresentaram os parâmetros analisados semelhantes aos filhotes do grupo controle. Assim, a utilização da melatonina

mostrou-se mais eficaz do que a associação dos fármacos uma vez que as alterações decorrentes da SOP e da utilização da metformina durante a gestação puderam ser normalizadas com a sua utilização no período gestacional, não apresentando efeitos adversos sobre a prole.

Palavras-Chave: Melatonina, Metformina, Gestação, SOP, ratas, filhotes, gônadas

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) reduces ovulation rate and increases the risk of complications during pregnancy, such as the development of gestational diabetes, hypertension, preeclampsia, preterm births and abortions. The aim of this study was to evaluate the effects of melatonin associated with a pre-existing treatment, metformin, as a therapeutic alternative for the treatment of PCOS administered before and during the gestational period, and its effects on the offspring. For this 40 rats were divided into 5 groups: Group I- No induction of PCOS; II- Induced to SOP; III- Induced to SOP and treated with Metformin; IV- Induced to SOP and treated with Melatonin and V- Induced to SOP and treated with Metformin and Melatonin. Induction was performed by gavage of Letrozole at the dosage of 1mg / kg / day for 21 consecutive days. Metformin was administered 10 days before and throughout the gestational period at the dose of 50 mg / 100g, also by gavage, as well as melatonin at a dose of 0.5mg / kg orally diluted in the drinking water. Hormonal, biochemical, immunohistochemical, morphometric and morphometric analyzes were performed, as well as the monitoring of the animals' weight gain and the organosomal index of both matings and neonates. It was possible to observe that exogenous melatonin was more efficient in reverting parameters due to induction of PCOS in the matrices, such as estrous aciclicity, increase in body weight, metabolic (elevation in total cholesterol, triglycerides, and LDL) ovary (ovarian cysts) and hormonal alterations, than its association with metformin. This, in turn, also presented beneficial effects in relation to some parameters resulting from polycystic disease, however, its use during pregnancy promoted some changes in the pups, such as decreased ovarian weight, vacuolization

and degeneration of the seminiferous tubules, changes in estrogen levels and testosterone and expression of testicular androgen receptors. However, the offspring of the matrices that received melatonin during gestation presented the parameters analyzed similar to the control group. Thus, the use of melatonin was more effective than the combination of drugs since the alterations due to PCOS and metformin during gestation could be normalized with its use in the gestational period and did not present adverse effects on offspring.

Key words: Melatonin, Metformin, Gestation, SOP, rats, puppies, gonads

SUMÁRIO

Preâmbulo

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII

Capítulos	Pág.
-----------	------

I	1. INTRODUÇÃO.....	19
	2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
	2.1. Síndrome dos ovários Policísticos.....	21
	2.2. Fisiopatologia.....	24
	2.2.1. Alterações Gonadotróficas.....	24
	2.2.2. Alterações Androgênicas.....	27
	2.2.3. Alterações Gestacionais.....	28
	2.3. Tratamentos para SOP.....	30
	2.3.1. Metformina.....	31
	2.4. Glândula Pineal e Melatonina.....	34
	2.4.1. Melatonina e reprodução.....	38
	2.4.2. Melatonina e SOP.....	42
	3.REFERÊNCIAS.....	44

II	Efeitos da administração da metformina e melatonina durante o período gestacional para o tratamento da síndrome dos ovários policísticos em ratas albinas.....	60
	RESUMO.....	60
	INTRODUÇÃO.....	62
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
	RESULTADOS.....	67
	DISCUSSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	79
III	Melatonina previne os efeitos da metformina nas gônadas da prole de ratas tratadas para a síndrome dos ovários policísticos antes e durante a gestação.....	95
	RESUMO.....	95
	INTRODUÇÃO.....	96
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
	RESULTADOS.....	98
	DISCUSSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Pg.
Tabela 1: Critérios de diagnóstico da SOP.....	23
CAPÍTULO II	
Tabela 1: Média $\pm$ desvio padrão do peso (g) dos animais nos diferentes tempos de tratamento.....	88
Tabela 2: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de colesterol total (CT) dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	88
Tabela 3: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de triglicerídeos (TG) dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	88
Tabela 4: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de HDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	89
Tabela 5: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de LDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	89
Tabela 6: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de VLDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	89

Tabela 7: Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de glicose dos diferentes grupos experimentais (mg/dL).....	90
---	----

Tabela 8: Análise morfométrica (percentual) dos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais.....	90
---	----

CAPÍTULO III

Quadro 1: Média $\pm$ desvio padrão do peso (g) dos filhotes dos diferentes grupos experimentais.....	105
--	-----

Quadro 2: Média $\pm$ desvio padrão do Comprimento (cm) dos filhotes dos diferentes grupos experimentais.....	105
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pg.

Figura 1: Alterações gonadotróficas e esteroidogênicas durante a SOP e o papel da insulina na atuação sinérgica ao LH na produção de andrógenos..... 26

Figura 2: Via Biosintética da melatonina..... 36

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)..... 39

CAPÍTULO II

Figura 1: Gráfico da ciclicidade estral dos grupos experimentais. Comparação entre o grupo controle (GI), grupo induzido á SOP tratado com solução placebo (GII), e grupos que foram induzidos à SOP após 10 dias dos respectivos tratamentos (GIII, GIV e GV)..... 91

Figura 2: A- Gráfico representando o tempo de acasalamento dos animais, ou seja, quantidade de dias necessários para que houvesse a cópula. B- Gráfico do número de neonatos de cada grupo experimental. C- Índice organossomático dos ovários dos diferentes grupos experimentais..... 91

Figura 3: Gráfico dos níveis séricos de progesterona dos diferentes grupos experimentais durante o período gestacional..... 92

Figura 4: Gráfico dos níveis séricos de estradiol dos diferentes grupos experimentais durante o período gestacional..... 92

Figura 5: Fotomicrografias dos ovários das ratas dos diferentes grupos

experimentais. A-Ovário dos animais do grupo I, observar presença de folículos (F) em diferentes estágios de desenvolvimento e presença de corpos lúteos (CL). B-Ovário dos animais do grupo II, observar a presença de diversos cistos, com diminuição na quantidade de corpos lúteos e presença de folículos atresícos (FA). C –D – E-Ovário dos demais grupos experimentais com características semelhantes ao grupo I. Coloração H.E..... 93

Figura 6: A- Gráfico das medidas em pixels dos grânulos de glicogênio dos diferentes grupos experimentais. B- Gráfico das medidas em pixels das fibras colágenas dos diferentes grupos experimentais..... 93

Figura 7: Análise imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (RA) nos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais. A- ovário dos animais do grupo I. B- ovário dos animais do grupo II, apresentando maior índice de marcação. C-D-E - ovário dos demais grupos experimentais (GIII, GIV e GV, respectivamente). Observar marcação na coloração castanha..... 94

CAPÍTULO III

Figura 1: Gráfico do peso e índice organossomático dos animais. (A)- peso dos ovários. (B)-peso dos testículos. (C)-IO dos ovários. (D)-IO dos testículos..... 105

Figura 2: Níveis hormonais. (A)- Níveis de estradiol dos filhotes fêmeas. (B)- Níveis de testosterona total dos filhotes machos..... 105

Figura 3: Fotomicrografia dos ovários dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- ovário dos filhotes do grupo I; (B)- Ovário dos filhotes do grupo II; (C)- ovário dos filhotes do grupo III; (D)- ovário dos filhotes do grupo IV; (E)- ovário dos filhotes do grupo V e F- gráfico da análise morfométrica ovariana. Observar a ausência de diferenciação entre camada cortical e medular, corpos-lúteos , além da presença de diversos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo (FS)- Folículo

secundário, (FT)- Folículo terciário..... 106

Figura 4: Fotomicrografia dos testículos dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- testículo dos filhotes do grupo I; (B)- Testículo dos filhotes do grupo II; observar a presença de vacuolização (seta) e degeneração tubular (círculo) (C)- testículo dos filhotes do grupo III; (D)- testículo dos filhotes do grupo IV; (E)- testículo dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da análise morfométrica testicular. Observar a presença de diversos túbulos seminíferos (TS) e interstício (IT), onde alguns túbulos já apresentam a formação do lúmen (L). As espermatogônias- triângulo- e espermatócitos asteriscos (*), externamente observar a presença da cápsula (CP)..... 107

Figura 5: Fotomicrografia dos ovários dos fihotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- ovário dos filhotes do grupo I; (B)- Ovário dos filhotes do grupo II; (C)- ovário dos filhotes do grupo III; (D)- ovário dos filhotes do grupo IV; (E)- ovário dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da quantificação da marcação em pixels. Observar a coloração acastanhada da marcação do receptor de andrógeno (RA)..... 108

Figura 6: Fotomicrografia dos testículos dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- testículo dos filhotes do grupo I; (B)- testículos dos filhotes do grupo II; (C)- testículo dos filhotes do grupo III; (D)- testículo dos filhotes do grupo IV; (E)- testículo dos filhotes do grupo V e F- gráfico da quantificação da marcação em pixels. Observar a coloração acastanhada da marcação do receptor de andrógeno (RA)..... 109

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

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 $\cdot$ - Peroxinitrito

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RI- Resistência a insulina

RNA- Ácido ribonucleico

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 em mulheres com idade reprodutiva (EHRMANN, 2005). Estima-se que no mundo, cerca de 2,2 a 26% da população feminina entre 15 e 49 anos de idade apresente a SOP, já no Brasil, esse distúrbio pode chegar a acometer 13% da população (AZZIS et al., 2016; CRISOTO et al., 2012; YAO et al., 2017).

Estudos sugerem que nessa síndrome as células da teca dos folículos ovarianos funcionem de forma diferenciada, levando ao aumento na produção de andrógenos que pode decorrer de uma hipersecreção de LH basal e elevada expressão de seus receptores (LHR) (HOGG et al., 2012), ou do aumento da atividade da enzima Citocromo P450c17 (CYP17), responsável pela síntese desse hormônio (GILLING-SMITH et al., 1994).

Outro mecanismo que está diretamente envolvido no aumento da síntese dos andrógenos é a resistência à insulina (RI) com hiperinsulinemia compensatória, manifestada em cerca de 50-80% das portadoras da SOP (KABIRI et al., 2014; STEPTO et al., 2013). O excesso de insulina age, portanto, de forma sinérgica ao LH estimulando a resposta estereoidogênica ovariana (VAN HOUTER; VISSER, 2014).

Devido a tais características, além de reduzir a taxa de ovulação, a SOP aumenta o risco de complicações durante a gestação, como o desenvolvimento de diabetes gestacional, hipertensão, riscos de pré-eclampsia, nascimentos prematuros e abortos (POLAK et al., 2017). Estima-se que na população em geral a taxa de diabetes gestacional é cerca de 3,25%, enquanto que nas mulheres portadoras da SOP, ocorre um aumento para 20-41% (JOHAM et al., 2014; MIKOLA et al., 2001).

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

se o agente mais utilizado (McGRATH et al., 2018; SIVALINGAN et al., 2014). Parte da eficácia da metformina pode estar relacionada a suas ações diretas na esteroidogênese, devido a seus efeitos insulinosensibilizantes (MANSFIELD et al., 2003). Vários estudos têm indicado que a manutenção do tratamento com metformina durante a gravidez, principalmente nas portadoras de diabetes tipo 2, reduz o risco de abortos no primeiro trimestre (JAKUBOWICZ et al., 2002), e nascimentos prematuros, melhorando os resultados da gestação, (GLUECK et al., 2013). Consequentemente, muitas pacientes com ovários policísticos continuam o tratamento com a metformina durante a gravidez. Assim, o número de pacientes que utilizam esta biguanida durante o período gestacional vem aumentando consideravelmente (JOHNSON, 2011; MORIN-PAPUNEN et al., 2012).

Por outro lado, a metformina pode afetar diretamente o desenvolvimento embriológico, uma vez que tem a capacidade de atravessar a barreira materno/fetal livremente sendo encontrada no sangue da placenta e do cordão umbilical com as mesmas concentrações do sangue venoso materno (KOVO et al., 2008). Em estudo recente, observaram-se efeitos abortivos e malformações dos neonatos decorrentes da utilização da metformina (PANCHAUD et al., 2018), além de resultados controversos a nível renal e hepático, com a presença de acidose láctica, alterações enzimáticas e diversos efeitos gastrointestinais (LAUTATZIS; GOULIS; VRONTAKIS, 2013), como também alterações nas células testiculares dos neonatos (TARTARIN et al., 2012) e diminuição da massa corporal desses (HANEM et al., 2018; KOVO et al., 2008).

Com o objetivo de amenizar possíveis danos decorrentes da utilização da metformina, alguns estudos vêm associando esta biguanida a outras substâncias, como a melatonina, para o tratamento de algumas patologias (LE MOS et al., 2014). 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. Lemos et al (2014), em estudos com ratas prenhes, induzidas à SOP,

observaram melhoras a nível hepático, tanto histopatologicamente quanto bioquimicamente, e na defesa antioxidante dos animais que foram tratados com a associação das drogas.

Além disso, sabe-se que a melatonina atua na liberação de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), do eixo pituitário-gonadal, regulando assim a secreção pituitária de Hormônio Luteinizante (LH) e Folículo Estimulante (FSH) para o controle do estro e ovulação. Atua também na produção de estrógeno e progesterona, na atividade funcional e crescimento ovariano, e devido as suas funções antioxidantes, reduz o estresse oxidativo nos folículos, protegendo assim os oócitos contra radicais livres (DEVOTO et al., 2002). Essa indolamina lipofílica também atravessa a placenta livremente sem ser alterada, atingindo a circulação fetal com facilidade, fornecendo informações fotoperiódicas para o feto, mediando diversas interações fisiológicas (GOLDMAN, 2003).

Assim, avaliar o efeito da metformina e sua associação com a melatonina durante o período gestacional para o tratamento da SOP se faz necessário, bem como seus possíveis efeitos sobre os neonatos.

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 estudos posteriores, chegou-se a conclusão de 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 (YAO et al., 2017). 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; YAO et al., 2017).

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 à insulina (RI), com consequente aumento do risco de Diabetes tipo 2 (MORAN et al., 2010), dislipidemias, aumento do colesterol, gordura abdominal e hipertensão arterial (DARGHAM et al., 2018; SPRITZER, 2014; VAN HOUTEN; VISSER, 2014). Dependendo do estudo, cerca de 38-88% das mulheres com SOP são obesas e 50-70% apresentam resistência à insulina (BALEN et al., 1995; COOK et al., 2002; SIR-PETERMANN et al., 2009).

Dessa 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 á 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) *	ROTTERDAN (2003)*	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 causas de hiperandrogenismo, como por exemplo: 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 obrigatoriedade de imagens ecográficas 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). 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, que ocorrem em 50%-80% de mulheres com SOP, agindo de forma sinérgica ao LH, estimulando a resposta estereoidogênica ovariana de forma direta, ativando a CYP 17 ou indiretamente reduzindo os níveis de produção da SHBG (globulina ligante de hormônios sexuais) hepático, resultando em um aumento da biodisponibilidade dos andrógenos livres. Além disso, a RI leva a um aumento do estresse oxidativo acompanhado da diminuição da defesa antioxidante nos ovários (GONZALES et al., 2006; YAO et al, 2017) (Figura 1).

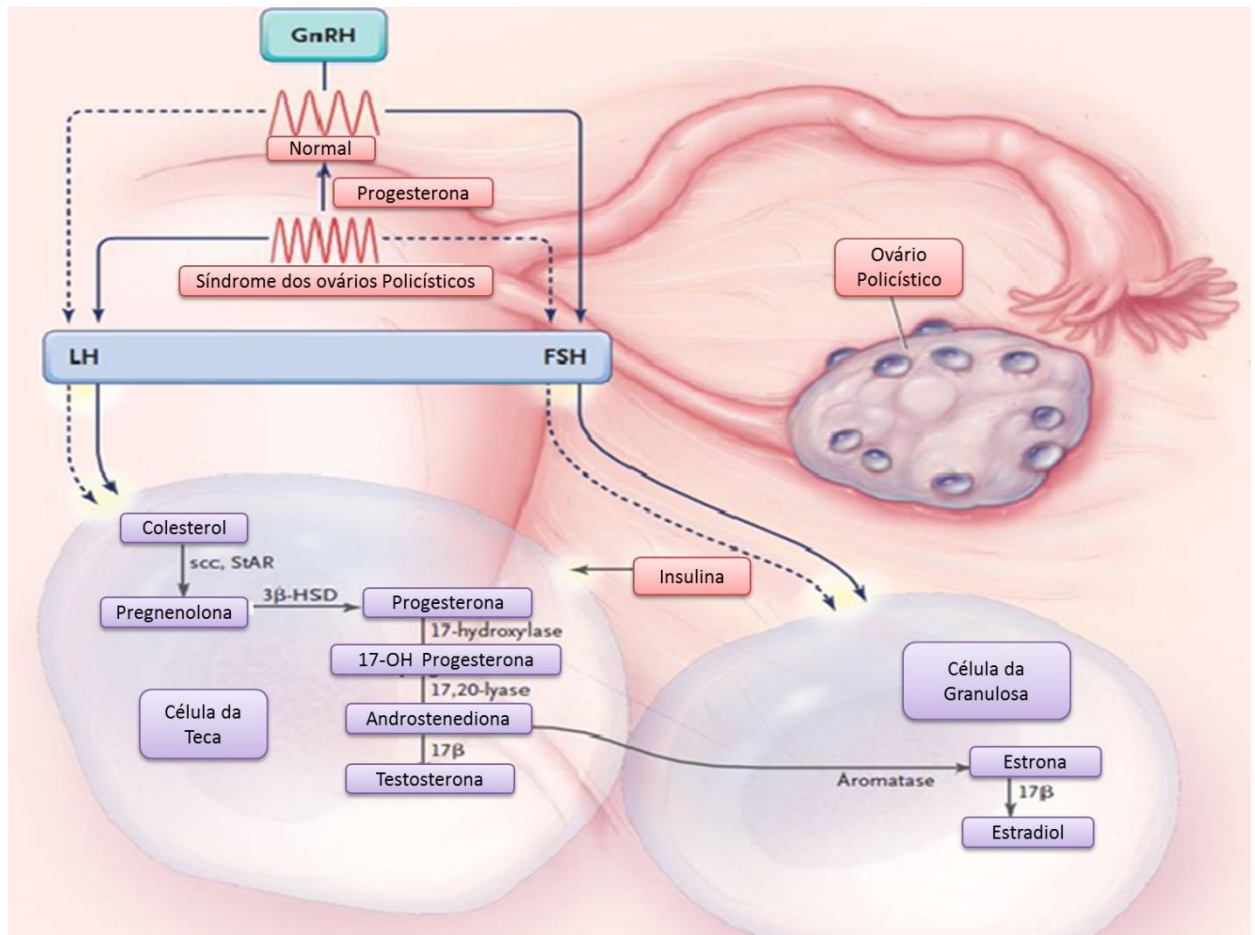


Figura 1: Alterações gonadotróficas e esteroidogênicas durante a SOP e o papel da insulina na atuação sinérgica ao LH na produção de andrógenos. Adaptado de EHRMANN, (2005).

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 do folículo, 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-mullerianos (AMH) e diminuição da 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 menor quantidade de receptores de andrógenos (RA) 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 nessa comunicação existisse, os andrógenos fisiologicamente desnecessários entrariam no oócito, desencadeando uma série de ações não-genômicas, provocando atresia folicular ou formação de folículos não funcionais no ovário (ABBOTT et al., 2005; DRUMMOND, 2006; LI; SCHATTEEN; 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 má 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).

Outras alterações decorrentes do hiperandrogenismo crônico também são observadas nas portadoras dessa síndrome, como patologias renais, onde em estudo realizado por Patil et al. (2017) mulheres tratadas com DHT (dihidrotestosterona) apresentaram aumento da pressão arterial média, peso do rim, proteinúria e maior dano renal comparando-se ao grupo controle. Além disso, também observou-se uma redução de 60% na taxa de filtração glomerular, 40% no fluxo plasmático renal e uma redução significativa na excreção urinária de nitrato e nitrito. O exame morfológico dos órgãos mostrou glomeruloesclerose focal e segmentar significativa, esclerose global e fibrose intersticial, decorrentes desse aumento androgênico.

Assim como o rim, o fígado das portadoras da SOP também é afetado apresentando manifestações de NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica) como demonstrado no trabalho de Kumarendran et al., (2018) onde os níveis de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), bem como da proteína C-reativa (PCR) encontraram-se elevados, decorrentes de um estado de inflamação observado na obesidade e nos casos de resistentes à insulina, característicos da SOP. Alterações histopatológicas também foram encontradas, com áreas de necrose e hiperemia, aumento das fibras colágenas levando a um quadro de fibrose, além de toxicidade hepática, com alterações enzimáticas como na alanina aminotransferase (ALT), oxido nítrico (ON) e glutatona total (GT), com consequente elevada resposta imunológica tecidual (LEMOS et al., 2014; MOHAMMADI et al., 2017).

2.2.3. Alterações gestacionais

Mesmo apresentando todas essas características patológicas decorrentes da SOP, algumas mulheres conseguem engravidar, entretanto, são

classificadas em um grupo de mulheres que apresentam gravidez de risco, necessitando de cuidados pré-natais adicionais. Essas pacientes podem apresentar manifestações que incluem distúrbios endócrinos, diabetes, obesidade, aborto e gravidez múltipla. Para aquelas já diagnosticadas com SOP, avaliação do IMC, pressão arterial e glicose oral são recomendadas pelas diretrizes da Endocrine Society para tratamento gestacional adequado (LEGRO et al., 2013).

Estudos demonstram um aumento de 2-4 vezes no risco de aborto espontâneo em mulheres com SOP, que pode ser decorrente de alterações estruturais e funcionais do endométrio, uma vez que as pacientes apresentam 2-3 vezes mais chances de desenvolverem hiperplasia e câncer endometrial (BARRY et al., 2014; KUYUCU et al., 2018) ou também pode ser resultante da hiperinsulinemia em conjunção com hiperandrogenismo que contribuem para a perda da gravidez através de interferências no implante placentário normal (YU et al., 2016).

Complicações da gestação nas mulheres com SOP podem levar ao parto prematuro e aumento no risco de mortalidade perinatal, que pode ser decorrente do aumento da taxa de gestações múltiplas, principalmente quando não se trata da primeira gestação. Também são observadas alterações fetais, com controvérsias, uma vez que estudos em animais, incluindo roedores, sugerem que o hiperandrogenismo pode alterar o crescimento embrionário, podendo alternativamente aumentar o tamanho fetal. Por outro lado, a hiperinsulinemia crônica, decorrente da RI manifestada na maioria das pacientes com SOP, pode restringir o crescimento fetal através da interferência na função vascular normal (NOVI et al., 2017)

Outra característica que pode ser observada nas mulheres grávidas que são diagnosticadas com SOP é um maior risco de desenvolver diabetes gestacional (DG). Além disso, DG e SOP são fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 após a gestação, uma vez que algumas portadoras de SOP podem apresentar inicialmente uma fase de pré-diabetes, também conhecida como hiperglicemia intermediária, que está diretamente associada a combinação de resistência à insulina e disfunção das células beta

pancreáticas. Dessa forma, é relatado que 5-10% das mulheres com sintomas clínicos de pré-diabetes e diabetes gestacional tornem-se portadoras de diabetes tipo 2 (DARGHAM et al., 2018).

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 (BADAWY, 2011).

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

Os contraceptivos hormonais orais combinados (CHOC) permanecem como a intervenção medicamentosa 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 muitos tratamentos que induzem a ovulação estão disponíveis, sendo o mais utilizado o Citrato de Clomifeno (CC). Trata-se de um antagonista oral do estrogênio 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 ovariana induz uma mudança na frequência dos

pulsos do GnRH levando ao aumento na liberação do FSH (SIRMANS; PATE, 2014; THESSALONIKI, 2008).

Entretanto, devido a sua ampla utilização, algumas pacientes vêm apresentando resistência ao CC, fazendo-se necessária a busca por fontes terapêuticas alternativas (NEMATI et al., 2017), surgindo assim o interesse por substâncias insulinosensibilizantes, dentre elas as biguanidas, como a metformina.

2.3.1 Metformina

Dentre diversas estratégias terapêuticas, a utilização de drogas insulinosensibilizantes para o tratamento de anormalidades reprodutivas relacionadas à 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 primeira síntese de metformina ocorreu em 1922, realizada por Werner e Bell na Irlanda. Já o Dr. Jean Sterne, um clínico francês, e seus colegas propuseram pela primeira vez a utilização da metformina como tratamento para diabetes nos anos 60 em Paris (STERNE, 1969). Trata-se de uma biguanida oral hipoglicemiante, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1995, para o tratamento de portadores de *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).

A metformina é absorvida pelo duodeno e jejuno dentro de aproximadamente 6 horas e tem uma biodisponibilidade oral de cerca de 40% a 60%. A droga é distribuída rapidamente após absorção não se ligando à proteínas plasmáticas e sem produzir metabólitos ou conjugados sendo

excretada pelos rins e na bile sem ser alterada. As taxas de liberação no rim são variáveis, dessa forma a dose de metformina deve ser ajustada de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) e aproximadamente 30% da droga é excretada diretamente pelas fezes (GRAHAM et al., 2011).

Os mecanismos de ação da metformina ainda não foram totalmente elucidados, porém, acreditava-se que o principal local de ação da droga fosse o fígado, aumentando sua sensibilidade levando a um efeito supressor da insulina na gliconeogênese (GRAY et al., 2017). Entretanto, estudos recentes mostraram que a maioria, se não todos os efeitos hipoglicêmicos da metformina podem residir no intestino (DEFRONZO et al., 2016). Esses novos dados clínicos são respaldados pela observação de que o efeito de diminuição da glicose decorrente da utilização da metformina em ratos é maior quando administrada por via oral do que por via intravenosa (STEPENKY et al, 2001, 2002).

Parte da eficácia da metformina na SOP pode estar relacionada as 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 ação 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, 2001). Nestler e Jakubowicz (1996) demonstraram que a administração da metformina em pacientes obesas com SOP reduz concomitantemente a glicemia de jejum e a atividade da CYP 17

ovariana, induzindo a redução da concentração da testosterona sérica livre (ATTIA; RAINEY; CARR, 2001).

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 isso, muitas pacientes recebem o tratamento com Metformina durante o período gestacional.

Dados de animais e humanos sugerem que a metformina é segura na gravidez, sem associação com malformações congênitas no primeiro trimestre e sem complicações perinatais elevadas (FENG; YANG, 2017) sendo classificada como medicamento de categoria C, ou seja, não apresenta efeitos teratogênicos durante a organogênese fetal (LAUTATZIS; GOULIS; VRONTAKIS, 2013).

Entretanto, diversos estudos vem observando características contrárias. A metformina 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 hepática 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 esse medicamento a outras substâncias, 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).

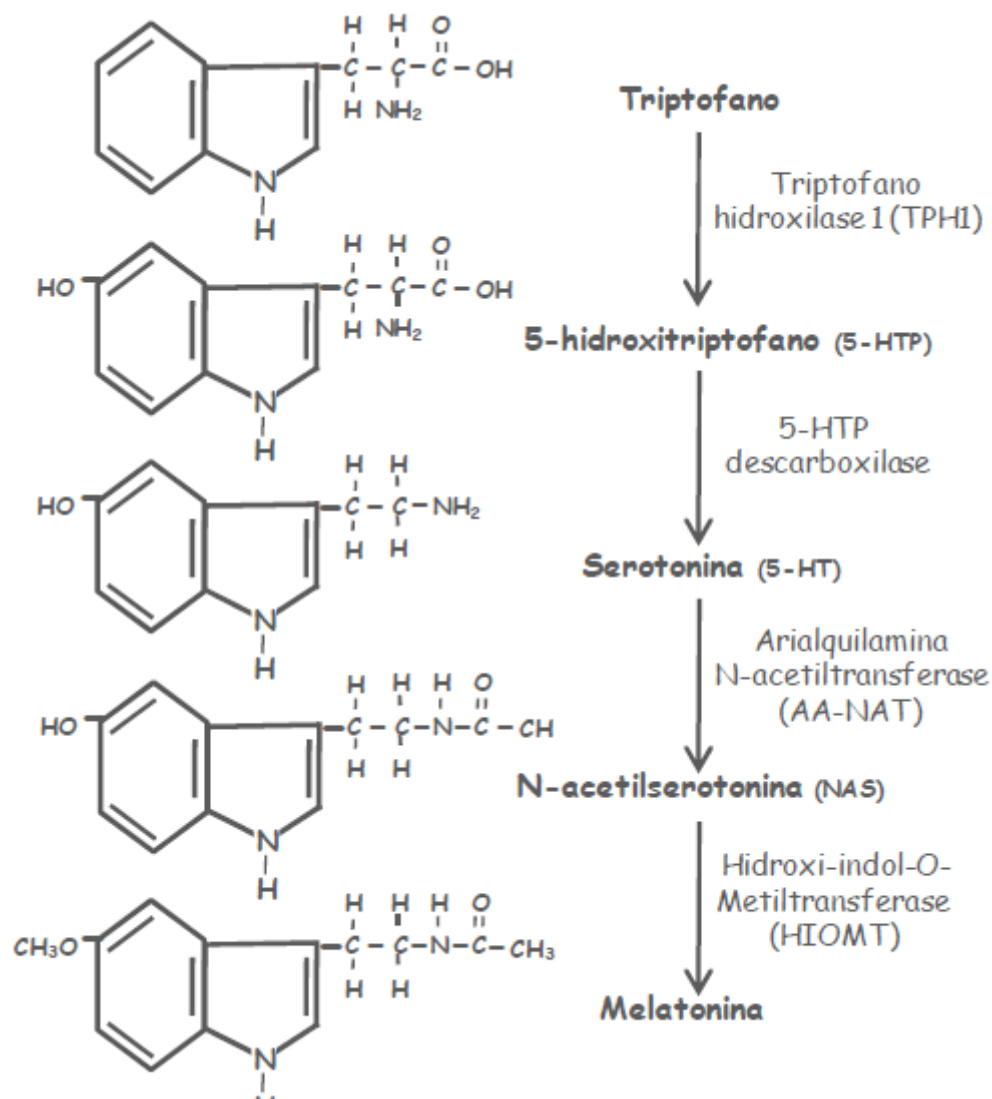


Figura 2. Via Biosintética da melatonina (REITER et al., 2000)

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). As mitocôndrias, por exemplo, podem ser o local de produção de melatonina no interior das células para sua própria proteção (TAN et al., 2012).

O pico de secreção da melatonina 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 consequentemente, 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, podendo atuar a nível mitocondrial evitando danos ao seu DNA e melhorando a atividade da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, esse hormônio e seus metabólitos também são capazes de modular a transcrição de genes de enzimas antioxidantes (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005), e se ligar a calmodulina para interferir na produção de óxido nítrico (ON), reduzindo os radicais livres e consequentemente os danos oxidativos (BOUTIN, 2016).

Além disso, essa indolamina apresenta efeitos no sistema imunológico, uma vez que todos os tipos celulares desse sistema possuem receptores específicos para melatonina. Em estudos realizando-se pinealectomia ou qualquer outra forma de diminuição da síntese hormonal são observadas diminuição da resposta imune humoral e celular (CARRILO-VICO et al., 2005; YANG et al., 2018). A atividade imunoestimulatória e antiapoptótica da melatonina são exercidas principalmente através da sua ação nos linfócitos T help (LTh), pois em concentrações suprafisiológicas induzem a proliferação de células T e citocinas próinflamatórias. Entretanto, outros estudos já demonstram a função imunossupressora da melatonina, tornando-a assim uma molécula reguladora (CARRILO-VICO et al., 2005; PARK et al., 2005).

Influencia diretamente a resposta imune celular, atuando na proliferação de monócitos (induzindo a produção de citocinas como IL-6, IL-12, e inibindo a produção de IL-10, TNF α), eosinófilos, basófilos, neutrófilos e células NK (CALVO; GONZALES-YANES; MALDONADO, 2013).

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).

A melatonina pode agir de diferentes formas, em diversos tecidos, pode atuar se ligando a proteínas intracelulares (como a calmodulina), a receptores nucleares, a receptores localizados na membrana plasmática, e ainda desempenhando efeitos antioxidantes (MACCHI; BRUCE, 2004).

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., 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 presentes na enzima quinona redutase 2, e há controvérsias se realmente se trata de um receptor ou uma quinona redutase 2 sensível a melatonina (DUBOCOVICH, 1988; MAILLIET et al., 2005; MOLINARI; NORTH; DUBOCOVICH 1996).

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).

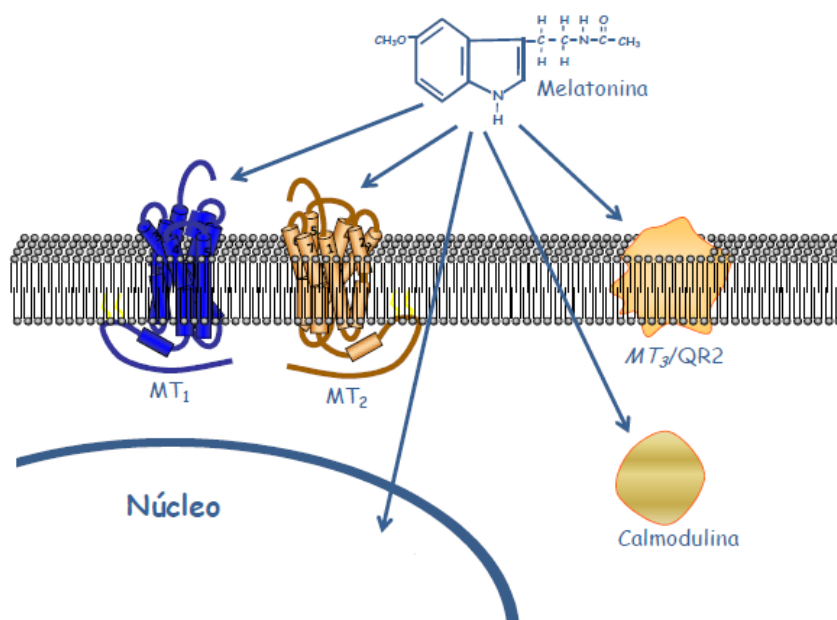


Figura 3. Melatonina e alguns de seus mecanismos de ação. MT- receptores de melatonina, MT1 e MT2, receptores acoplados a proteína G. QR2 (quinona redutase 2). Adaptada de TAMURA, (2009).

Ambos MT1 e MT2 são distribuídos em tecidos neuronais e periféricos (EKMEKCIOGLU, 2006; PANDI-PERUMAL et al., 2008), sendo encontrados nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (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). Essas EROS são produzidas durante a ovulação por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais vasculares presentes nos folículos (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). Embora 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 uma molécula moduladora, podendo apresentar atividade antiestrogênica, por sua interferência nos receptores de estrógeno, e na síntese desse hormônio pela inibição da enzima aromatase, podendo também modular a síntese e produção hormonal regulando todo o processo de desenvolvimento folicular (OKATANI; SAGARA, 1995).

Em estudos realizados com ratas prenhes, onde ocorreu a 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 pinealectomizadas apresentaram queda na quantidade da melatonina produzida, levando a alterações no ciclo estral e prolongamento 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).

2.4.2 Melatonina e SOP

Altos níveis de estresse oxidativo (EO) foram encontrados em pacientes com SOP, indicando uma associação entre esses fatores (MURRI et al., 2013). Em estudo com ratos submetidos à iluminação constante, que causa danos à glândula pineal e diminui a produção de melatonina, foi observado danos no sistema reprodutor e estresse oxidativo (ZUVARRA et al., 2009).

Na síndrome dos ovários policísticos a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação crônica, 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 e no fluído folicular das mesmas (GONZALEZ et al., 2006). A taxa de apoptose das células da granulosa é maior nas mulheres com SOP, e o estresse oxidativo pode causar também apoptose dos oócitos.

Os níveis de 6-sulfatoximelatonina, metabólito enzimático da melatonina, na urina são significativamente maiores em mulheres com SOP (LUBOSHITZKY et al., 2001). Esse metabólito é correlacionado com a testosterona, demonstrando que mulheres com SOP têm um aumento na secreção de melatonina e isso está associado com seus níveis de testosterona (LUBOSHITZKY et al., 2001).

Concentrações baixas desse 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 de 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 fluído folicular é necessário para o crescimento do folículo, ovulação e qualidade oocitária (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 a., 2009). Além disso, seus efeitos na esteroidogênese, regulando a produção de progesterona, de hormônios sexuais e regulando a atividade de enzimas esteroidogênicas, bem como a expressão do gene do receptor de LH, FSH e andrógenos, demonstram a influencia dessa indolamina no sistema endócrino e ovariano.

Assim, a utilização da melatonina, que apresenta diversos efeitos reprodutivos, associada a tratamentos pré-estabelecidos para a SOP, como a metformina, poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz, fornecendo uma série de efeitos benéficos e protetores quando utilizadas durante o período gestacional.

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.
- 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.
- AZZIZ, R. et al. Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v.2, p.16057, 2016.
- 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.

BARRY, J.A.; AZIZIA, M. M.; HARDIMAN, P.J. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**. v.20, n.5, p.748-758, 2014.

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.

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.

BOUTIN, J.A. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. v.20, n.3, p.303-317, 2016.

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.

CALVO, J.R.; GONZÁLEZ-YANES, C.; MALDONADO, M.D. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. **Journal of Pineal Research**. v.55, n.2, p.103-120, 2013.

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.

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 Experimental Biology**. v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.

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.

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

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.; JARZYNSKA, 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.

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.

DARGHAM S.R. et al. Prediabetes and diabetes in a cohort of Qatari women screened for polycystic ovary syndrome. **Science Reproduction**. v. 8, p. 3619, 2018.

- DEFRONZO, R. et al. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. **Metabolism**. v.65, n.2, p.20-29, 2016.
- DEPLEWSKI, D.; ROSENFELD, R. L. Role of hormones in pilosebaceous unit development. **EndocrineReviews**, 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.
- 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.

FENG, Y.; YANG, H. Metformin - a potentially effective drug for gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Maternal- Fetal Neonatal Medicine**.v.30, n.15, p.1874-1881, 2017.

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.

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.

GRAHAM, G.G. et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clinical Pharmacokinetics**. v.50, n.2, p.81-98, 2011.

GRAY, S. G. et al. The emerging role of metformin in gestational diabetes mellitus. **Diabetes Obesity and Metabolism**. v.19, n.6, p.765-772, 2017.

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

GURO, L. et al. Metformin Use in PCOS Pregnancies Increases the Risk of Offspring Overweight at 4 Years of Age: Follow-Up of Two RCTs **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.103, n.4, p.1612–1621, 2018.

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.

HIRIART, B. M. et al. Hormona de la oscuridad. **Revista latinoamericana de patología clínica**. 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.

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.

JOHAM, A. E. et al. Gestational diabetes and type 2 diabetes in reproductive-aged women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.99, n.3, p.447-452, 2014.

JOHNSON, N. Metformin is a reasonable first-line treatment option for non-obese women with infertility related to anovulatory polycystic ovary syndrome--a meta-analysis of randomised trials. **The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v.51, n.2, p.125-129, 2011.

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.

KUMARENDRAN, B. et al. Polycystic ovary syndrome, androgen excess, and the risk of nonalcoholic fatty liver disease in women: A longitudinal study based on a United Kingdom primary care database. **PLoS Medicine**.v.15, n.3, 2018.

KUYUCU, Y. et al. Investigation of the uterine structural changes in the experimental model with polycystic ovarysyndrome and effects of vitamin D treatment: An ultrastructural and immunohistochemical study. **Reproductive Biology**. v.18, n.1, p.53-59, 2018.

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.

LEGRO, R. S. et al. Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.98, n.12, p.4565–4592, 2013.

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

LI, M.; SCHATTEN, 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.

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

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: quinine 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 colegio del médicos veterinários del estado Lara**, v. 2, n. 1, 2012.

MCGRATH, R.T. et al. Outcomes for Women with Gestational Diabetes Treated with Metformin: A Retrospective, Case-Control Study. **Journal of Clinical Medicine**. v. 7, n.3, 2018.

MIKOLA, M. et al. Obstetric outcome in women with polycystic ovarian syndrome. **Human Reproduction**. v.16, n.2, p.226-229, 2001.

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

MOHAMMADI, S. et al. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin on Insulin Resistance Index, Levels of Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Liver Histology in Polycystic Ovary Syndrome-Induced Rats. **Cell Journal(Yakhteh)**. v. 19, n.3, 2017.

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.

MORIN-PAPUNEN, L. et al. Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**.v.97, n.5, p.1492-1500, 2012.

MURRI, M. et al. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**. v.19, n.3, p.268-288, 2013.

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.

NEMAT, N. et al. Comparison of metformin and N-acetyl cysteine, as an adjuvant to clomiphene citrate, in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**.v.46, n.7,p. 579-585, 2017.

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.

NOVI , D.R.B.S. et al. Metformin Exposure During Pregnancy and Lactation Did Not Cause Vascular Reactivity Alteration in Adult Male Offsprings. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.70, n.5, p.300-304, 2017.

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.

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.

PANCHAUD, A. et al. Pregnancy outcomes in women on metformin for diabetes or other indications among those seeking teratology information services. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v.84, n.3, p.568-578, 2018.

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.

PATIL, N.C. et al. Consequences of advanced aging on renal function in chronic hyperandrogenemic female rat model: implications for aging women with polycystic ovary syndrome. **Physiology of Reproduction**.v.5, n.20, p. e13461, 2017.

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

POLAK, K. et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**. v.40, n.1, p. 1–8, 2017.

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.

REPPERT, 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.

REPPERT, 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.

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.

ROONBERG, 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.

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.

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

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

SIVALINGAM, V.N. et al. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. **Human Reproduction Update**. v.20, n.6, p.853-868, 2014.

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.

STEPTO, N.K. et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. **Human Reproduction**. v.28, n.3, p.777-784, 2013.

STEPENSKY, D. et al. Preclinical evaluation of pharmacokinetic-pharmacodynamic rationale for oral CR metformin formulation. **Journal of Controlled Release**. v.71, n.1, p.107-115, 2001.

STEPENSKY, D. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. **Drug Metabolism and Disposition**.v.30, n.8, p.861-868, 2002.

STERNE, J. **Pharmacology and Mode of Action of the Hypoglycemic Guanidine Derivatives**. In: G. D. Campbell, Ed., Oral Hypoglycemic Agents, New York Academic Press, 1969, pp. 193-245.

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

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.

TAN, D.X. et al. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **Journal of Experimental Botanic**. v.63, n.2, p.577-597, 2012.

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.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**. v.39, n.2, p.99-104, 2005.

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.

VANKY, E. et al. Placental passage of metiformin 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.

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

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.

YANG, P.K. et al. The Efficacy of 24-Month Metformin for Improving Menses, Hormones, and Metabolic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.103, n.3, p.890-899, 2018.

YAO, K.; BIAN, C.; ZHAO, X. Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and gestational diabetes: Aggravated complication of pregnancy. **Experimental and Therapeutic Medicine**.v. 14, n.2, p. 1271–1276, 2017.

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

YU, H.F. et al. Association between polycystic ovary syndrome and the risk of pregnancy complications: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**. v.95, n.51, p.e4863, 2016.

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.

ZURVARRA, F.M. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole induced polycystic ovaries in rat. **Reproduction Fertility and Development**. v.21, n.7, p.827-839, 2009.

Capítulo II

Efeitos da administração da metformina e melatonina durante o período gestacional para o tratamento da síndrome dos ovários policísticos em ratas albinas.

Carolline Guimarães D'assunção¹, Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Aline Ferreira da Silva Mariano¹, Welma Emído da Silva¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹, Valéria Wanderley-Teixeira^{1*}

*E-mail autor de correspondência:valeria.wanderley@ufrpe.br

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) pode levar a infertilidade além de várias doenças metabólicas durante a gestação. Assim, a utilização da metformina durante esse período vem aumentando consideravelmente apesar dos seus efeitos não serem totalmente elucidados. Além disso, sabe-se que o hormônio melatonina desempenha várias funções reprodutivas podendo ser uma alternativa para o tratamento dessa patologia associada ou não a metformina. Assim, foram utilizadas 40 ratas albinas divididas em cinco grupos; I- Sem indução da SOP; II- Induzidos à SOP; III- Induzidos à SOP tratados com Metformina; IV- Induzidos à SOP tratados com Melatonina e V- Induzidos a SOP tratados com Metformina e Melatonina. A indução foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos. A metformina foi administrado 10 dias antes e durante o período gestacional na

dosagem de 50 mg/100g, assim como a melatonina, na dose de 0,5mg/kg. Foi possível observar que a administração da melatonina administrada isolada foi mais eficiente em reverter os parâmetros decorrentes da indução da SOP (aciclicidade estral, aumento do peso corporal, do colesterol total, triglicerídeos, LDL, VLDL e glicose, diminuição na quantidade de neonatos, alterações ovarianas com elevação dos seus receptores androgênicos além de diminuição nos níveis de progesterona) do que sua associação com a metformina. O tratamento com metformina também apresentou efeitos benéficos em relação a alguns parâmetros decorrentes da policistose. Dessa forma, podemos concluir que as monoterapias, destacando-se a utilização da melatonina, apresentaram-se mais eficaz do que a associação dos fármacos.

Palavras – Chave: Melatonina, reprodução, metformina, metabolismo, SOP, ratas

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) can lead to infertility in addition to several metabolic diseases during pregnancy. Thus, the use of metformin during this period has increased considerably although its effects are not fully elucidated. In addition, it is known that the hormone melatonin performs several reproductive functions and may be an alternative for the treatment of this pathology associated or not to metformin. Thus, 40 albino rats were divided into five groups; I- No induction of PCOS; II- Induced to SOP; III- induced to SOP treated with Metformin; IV- Induced to SOP treated with Melatonin and V- induced to SOP treated with Metformin and Melatonin. Induction was performed by gavage of Letrozole at the dosage of 1mg / kg / day for 21 consecutive days. Metformin was administered 10 days before and during the gestational period at the dose of 50 mg / 100g, as well as melatonin at the dose of 0.5mg / kg. It was possible to observe that the administration of melatonin alone was more efficient in reversing the

parameters due to induction of PCOS (estrous acyclicity, increase in body weight, total cholesterol, triglycerides, LDL, VLDL and glucose, decrease in the number of neonates, ovarian changes with elevation of its androgenic receptors, and a decrease in progesterone levels) than its association with metformin. Treatment with metformin also had beneficial effects in relation to some parameters resulting from polycystic disease. Thus, we can conclude that the monotherapies, highlighting the use of melatonin, were more effective than the association of the drugs.

Key Words: Melatonin, reproduction, metformin, metabolism, PCOS, rats

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a síndrome dos ovários policísticos (SOP) é considerada uma das desordens endocrinológicas mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva, de causa multifatorial e com susceptibilidade associada a fatores de riscos genéticos e ambientais [1].

Nessa síndrome, a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação crônica, mas também a diminuição dos oócitos e a qualidade do embrião[2] uma vez que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) a partir das células mononucleares é elevada em portadoras da SOP e o produto da peroxidação lipídica, decorrente do estresse oxidativo, aumenta consideravelmente no soro e no fluído folicular das mesmas[3].

Devido a tais características, tem-se buscado alternativas terapêuticas para o tratamento da SOP, como a utilização de agentes antioxidantes associados a tratamentos pré-estabelecidos. Dentre eles, destaca-se a melatonina, um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal que atua na regulação do estrógeno e progesterona, na atividade funcional e crescimento ovariano, reduzindo o estresse oxidativo nos folículos,

e protegendo os oócitos contra os radicais livres, além de modular as gonadotrofinas (GnRH) que regulam as concentrações de LH e FSH no organismo [4,5]. Também foi observado que essa 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 uma gama interações fisiológicas fetais [6].

Dentre os tratamentos disponíveis, a metformina, uma biguanida utilizada para tratar pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se o agente mais utilizado devido a seus efeitos diretos sobre a esteroidogênese [7]. Vários estudos têm indicado que a manutenção do tratamento com metformina durante a gravidez reduz o risco de abortos no primeiro trimestre [8], e nascimentos prematuros [9] fazendo com que muitas pacientes com ovários policísticos continuem o tratamento com a metformina durante a gestação [10,11]. Entretanto, seus mecanismos de ação e todos os seus possíveis efeitos quando administrada durante o período gestacional ainda não foram totalmente elucidados. Assim, testamos a hipótese de que a utilização da melatonina associada ou não à metformina para o tratamento desta enfermidade durante a gestação poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais.

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente $200\text{g} \pm 20\text{g}$, procedentes do Biotério do mesmo Departamento. Este experimento foi aprovado pelo CEUA, com a licença 19/2017.

As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial que estabelecem o 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, cada um, constituído por 8 animais;

Grupo I- Animais sem indução da SOP (Controle); Grupo II- Animais induzidos à SOP (SOP); Grupo III- Animais induzidos a SOP e tratados com Metformina (SOP + Met); Grupo IV- Animais induzidos a SOP e tratados com Melatonina (SOP+ Mel); Grupo V- Animais induzidos a SOP tratados com Metformina e Melatonina (SOP+Mel+Met).

2.2.Indução da SOP.

A indução da Síndrome dos ovários Policísticos foi realizada em todos os animais dos grupos II, III, IV e V, mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos [12]. Para confirmação da indução, esfregaços vaginais foram realizados para identificação da aciclicidade estral das ratas, por volta de 18 dias, correspondendo a aproximadamente 3 ciclos estrais.

2.3.Tratamento com metformina.

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos III e V, na dosagem de 50 mg/100g diluído em 0,05 mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al. [13], dez dias antes e durante o período gestacional. O grupo II recebeu apenas água destilada.

2.4.Tratamento com melatonina.

O tratamento com melatonina foi realizado após aferição do peso das ratas, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima [14], nas ratas do grupo IV e do

grupo V. A melatonina (Sigma, *St. Louis, MO, USA*) foi administrada na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal do animal, dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída na água de beber, durante a noite (18:00). Para garantir a ingestão, os animais passaram diariamente por um período de restrição hídrica de cerca de 4h. A melatonina foi administrada dez dias antes e durante o período gestacional.

2.5.Acasalamento.

Após o diagnóstico da SOP, e 10 dias de tratamento, as fêmeas foram pesadas e permitidas 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 à presença de espermatozóides nos esfregaços vaginais, corados pelo método de Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

2.6.Dosagens bioquímicas e hormonais.

As ratas de todos os grupos experimentais foram imobilizadas utilizando-se um contensor para a coleta do sangue por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G), o sangue foi coletado antes da indução da SOP, após a indução, após 10 dias dos respectivos tratamentos e durante a gestação, nos tempos de 7, 14 e 21 dias de prenhez. Após centrifugação refrigerada, o soro foi acondicionado em microtubos (eppendorfs) e congelados a -20°C até o momento das dosagens [15]. Os níveis séricos de estrógeno e progesterona foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. As dosagens de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), HDL, LDL, VLDL e glicose dos animais foram realizadas utilizando kits reagentes da Doles, conforme especificações do fabricante.

2.7. Análise histopatológica e morfométrica.

Ao final do experimento as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular para remoção dos ovários. Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. Os ovários foram pesados e em seguida fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.) para análise de rotina histopatológica, além de coloração por PAS e Picrosirius. A quantificação em pixels dos grânulos de glicogênio e das fibras colágenas foi realizada utilizando o programa GIMP.2.8.

Os ovários foram pesados com auxílio de balança analítica e o índice organossomático foi calculado pela razão entre o peso de cada órgão e o peso corpóreo de cada animal [16], como representado na figura abaixo:

Onde:

IO: Índice organossomático;

PO: Peso do órgão;

PC: peso corporal.

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

Para análise morfométrica com a determinação da percentagem da área ovariana ocupada pelos folículos, as lâminas foram observadas em uma objetiva de 10x, contendo no interior um retículo de WEIBEL com 100 pontos. Foram utilizadas cinco lâminas nas quais foram contados os pontos que incidiram sobre os folículos, corpos lúteos e estroma ovariano. Foram determinados cinco campos no ovário, totalizando 500 pontos por grupo [17]. Para medição das camadas da teca e da granulosa,

fotomicrografias na objetiva de 40x foram realizadas para análises utilizando o programa Image J.

2.8. Análise imunohistoquímica.

Secções dos ovários obtidas de material parafinado (5 µm) de todos os grupos foram usadas para detecção por imunohistoquímica para receptor de andrógeno (AR-rabbit polyclonal IgG, sc- 816, Santa Cruz Biotechnology, 1:100). Inicialmente, as secções do órgão foram desparafinadas com xilol e hidratadas com etanol. Os cortes foram incubados com os respectivos anticorpos overnight, e posteriormente foram incubados com streptavidina-peroxidase, sendo então revelados com substrato cromógeno 3, 3'diaminobenzidina (DAB) em marrom e contra-coradas com Hematoxilina de Harris. A quantificação em pixels da marcação foi realizada utilizando o programa GIMP2.8

2.9. Análise estatística.

A análise estatística foi realizada em um programa computacional GraphPad Prism 5, onde dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-way com post-hoc de Tukey ($P < 0,05$), e Anova Two-way, para análise da ciclicidade.

3. RESULTADOS

3.1 Ciclicidade estral.

Foi possível observar que a administração de letrozol levou a uma alteração no ciclo estral dos animais, com uma elevação na fase de diestro e diferentes tempos nas demais fases do ciclo, comprovando a aciclicidade característica de sua administração, como pode ser observado nos animais do grupo II. Com os respectivos tratamentos, durante 10 dias, observou-se uma normalização dessa ciclicidade, não apresentando diferenças significativas entre os animais dos grupos I, III, IV e V. Os grupos III, IV e

V apresentaram maiores percentuais da fase de estro, diferindo significativamente apenas do grupo controle, e do grupo induzido à policistose (Figura 1).

3.2. Peso, IO e número de neonatos.

Os animais induzidos à SOP também apresentaram aumento de peso corporal acentuado, diferindo significativamente do grupo controle. Após os 10 dias dos respectivos tratamentos, apenas os animais do grupo II, que receberam solução placebo, permaneceram com o peso elevado. No período gestacional, aos 7 e 14 dias, ou seja, terço inicial e médio da gestação, os animais de todos os grupos apresentaram aumento de peso corporal, exceto os animais do grupo V, parâmetro este que foi normalizado na fase final da gestação, ou seja, com 21 dias (Tabela 1).

Também foi possível observar que os animais do grupo II e V foram os que levaram mais tempo para a cópula em comparação com os demais grupos (Figura 2A). Já quanto ao número de neonatos, os animais que receberam apenas a melatonina (GIV) foram os únicos que tiveram a quantidade de prole semelhante ao controle, enquanto que os animais do grupo II, III e V apresentaram uma quantidade reduzida, sendo mais expressiva nesse último grupo (Figura 2B).

O índice organossomático foi menor nos animais do grupo V, uma vez que os ovários apresentaram menor tamanho e peso quando comparados ao controle, entretanto, não houve diferença significativa entre os animais desse grupo e os animais dos grupos III e IV. Os animais do grupo II apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo I, III e IV os quais não diferiram entre si (Figura 2C).

3.3. Perfil lipídico e níveis de glicose.

O perfil lipídico observado nos diferentes grupos experimentais demonstrou um aumento nos níveis de colesterol total naqueles animais que foram induzidos à SOP, diferindo significativamente do grupo controle, o colesterol total foi normalizado após

os respectivos tratamentos, tanto com metformina, melatonina e sua associação. No terço inicial da gestação foi observado diminuição característica do colesterol total nos animais dos grupos que receberam as monoterapias ou sua associação. No terço médio da gestação verificou-se um aumento expressivo nos animais tratados com a associação. Já no terço final da gestação verificou-se uma redução significativa nos animais dos grupos que receberam as monoterapias ou sua associação. Os triglicerídeos também apresentaram-se elevados após a indução da policistose, tendo seus níveis reduzidos apenas nos animais tratados com melatonina e a associação dos fármacos. Não foram observadas diferenças entre os grupos na fase inicial e média da gestação, entretanto com 21 dias, apenas os animais que receberam melatonina e a sua associação com a metformina apresentaram níveis semelhantes àqueles observados no grupo controle (Tabela 2 e 3).

Os níveis de HDL apresentaram-se reduzidos após a indução da SOP, e tiveram seus níveis normalizados após os respectivos tratamentos, entretanto, no terço inicial da gestação verificou-se uma redução nos animais tratados com melatonina e a associação. No terço médio apenas a associação reduziu sendo semelhante aos animais do grupo II. E no terço final do período gestacional, os animais que receberam os diferentes tipos de tratamento apresentaram uma redução do HDL, diferindo dos animais do grupo controle e do GII, mas sem diferir significativamente entre si (Tabela 4). O LDL apresentou-se elevado nos animais que foram induzidos à SOP, diferindo significativamente dos animais do grupo I. Com 10 dias de tratamento, tanto com metformina, melatonina e a associação dos fármacos, seus níveis se regularizaram assemelhando-se aos animais do grupo controle. Esse mesmo resultado foi observado no terço inicial da prenhez. Com 14 dias apenas as monoterapias promoveram normalização dos níveis dessa fração do colesterol e com 21 dias de prenhez ocorreu uma redução acentuada nos animais que

receberam os diferentes tratamentos, diferindo significativamente dos animais do grupo I (Tabela 5).

Os níveis de VLDL foram aumentados após a indução da SOP. Após 10 dias de tratamento todos os animais dos grupos induzidos a SOP independente ou não do tratamento apresentaram níveis semelhante aos animais do grupo controle. Esse mesmo efeito foi observado nos terço inicial e médio da gestação. Entretanto, no terço final da gestação apenas os animais dos grupos tratados com melatonina e associação apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo controle (Tabela 6).

Os níveis de glicose foram aumentados após a indução da SOP. Após 10 dias de tratamento todos os animais dos grupos induzidos a SOP independente ou não do tratamento apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo controle, permanecendo assim no terço inicial e médio da gestação. No terço final da gestação evidenciou-se redução apenas nos animais tratados com a associação (Tabela 7).

3.4. Dosagem de progesterona e estradiol

Os níveis séricos de progesterona apresentaram-se elevados apenas no terço médio da prenhez nos animais dos grupos I, III e IV, e reduzidos nos animais dos grupos II e V. No terço final da gestação apenas os animais do grupo V apresentaram redução expressiva desse hormônio (Figura 3).

Os níveis séricos de estradiol não apresentaram diferenças entre os grupos após a indução da SOP, entretanto, uma diminuição significativa foi observada após os 10 dias de tratamento nos animais induzidos que receberam apenas solução placebo. Apenas no terço médio e final da gestação verificou-se redução nos níveis de estradiol nos animais dos grupos II, III, IV e V (Figura 4).

3.5. Análise histopatológica.

A análise dos ovários dos animais do grupo I (controle) demonstrou que estes apresentaram-se revestidos por um epitélio germinativo bem desenvolvido, formado por células cúbicas, que se apóiam numa fina camada de tecido conjuntivo denso, formando a túnica albugínea. Abaixo da túnica albugínea está a região cortical onde encontram-se vários folículos ovarianos, em diferentes estágios de desenvolvimento, além de vários corpos lúteos. A região medular mostrou-se constituída por tecido conjuntivo frouxo, apresentando-se vascularizada (Figura 5A). Também foi possível observar que a indução à SOP utilizando letrozol, observada nos animais do grupo II promoveu um aumento de folículos secundários e terciários, formando cistos ovarianos, com diminuição de corpos lúteos e elevação de folículos atresícos, característicos da síndrome (Figura 5B). Já os demais grupos, após os respectivos tratamentos apresentaram estrutura ovariana com diminuição no número de cistos e folículos atresícos e aumento do número de corpos lúteos (Figura 5 C-E).

3.6. Análise morfométrica.

A análise morfométrica demonstrou que os ovários dos animais induzidos a SOP e sem tratamento apresentaram maior quantidade de cistos foliculares e folículos atresícos, além de uma diminuição acentuada no número de corpos lúteos, diferindo significativamente dos demais grupos. Os animais que receberam os diferentes tratamentos apresentaram ovários com características morfométricas semelhantes àquelas observadas no grupo controle, exceto os animais do grupo V, que apresentaram uma quantidade de folículos terciários menor do que a observada nos animais do grupo I, além de uma maior quantidade de estroma ovariano (Tabela 8). A camada da teca dos folículos dos animais do grupo II e V apresentou um espessamento acentuado diferindo dos demais grupos, já a camada da granulosa apresentou-se mais delgada nesses animais

induzidos a policistose sem tratamento, alterações essas características de cistos ovarianos (Tabela 8).

3.7. Análise histoquímica.

A avaliação histoquímica para o PAS (Ácido Periodico de Schiff) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 6A). Já na análise para as fibras colágenas, utilizando-se o corante Picrosirius, os animais do grupo II apresentaram uma menor marcação para essas fibras quando comparado com os demais grupos, exceto para os animais do grupo V. Os respectivos tratamentos promoveram um padrão de quantificação dessas fibras semelhante àquele observado nos animais do grupo I sem diferenças significativas entre si. (Figura 6B).

3.8. Análise imunohistoquímica.

A análise imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (RA) demonstrou uma maior intensidade de marcação nos animais do grupo II, ou seja, animais induzidos a policistose sem tratamento, diferindo significativamente do grupo controle, não diferindo dos demais grupos experimentais. Pode-se observar a presença de marcação, representada pela coloração acastanhada, nos diferentes tipos celulares, sendo encontrada tanto na região citoplasmática, quanto no núcleo das células da teca, granulosa e intersticiais (Figura 7).

4. DISCUSSÃO

A síndrome dos ovários policísticos pode apresentar diferentes protocolos de indução para modelos em roedores [18]. O letrozol, um dos protocolos mais utilizados e o de escolha do presente estudo, é caracterizado como inibidor de aromatase, sendo responsável por bloquear a conversão de andrógenos em estrógenos [12]. O tratamento com letrozol em ratos adultos durante pelo menos 21 dias consecutivos induz

aciclicidade ou ciclos estrais irregulares [19]. Em trabalhos realizados por FU et al. [20] e por Manneras et al. [19], utilizando letrozol, observou-se a aciclicidade estral dos animais com predomínio da fase de diestro caracterizando um “pseudo-diestro”, como observado no presente estudo, onde os animais do grupo II apresentaram um maior tempo nessa fase do ciclo estral que conseqüentemente acarretou em elevação no tempo para que ocorresse a cópula.

Entretanto essa ciclicidade foi reestabelecida após os respectivos tratamentos. A metformina possui efeitos diretos na esteroidogênese ovariana através da inibição da *CYP 17* com redução da expressão do seu RNA mensageiro, e também diminui a insulina, atenuando a produção androgênica pelas células da teca, restaurando a ciclicidade dos animais [21, 22]. A melatonina, por sua vez, é capaz de regular a produção dos hormônios sexuais, a foliculogênese e a maturação oocitária, [23]. Além disso, mulheres portadoras da SOP apresentam diminuição ovariana desse hormônio que pode estar relacionada com a anovulação e perda da qualidade do oócito presentes nessa síndrome [24], então, a utilização de melatonina exógena regularia a ciclicidade estral dos animais como na presente pesquisa, promovendo um maior tempo na fase de estro, estando a fêmea receptiva para cópula. Também foi observado que os animais do grupo V levaram mais tempo para o acasalamento, tal característica pode ser decorrente dos efeitos sinérgicos dos dois fármacos, levando a alterações hormonais significativas que acarretaram em uma maior dificuldade para o acasalamento.

Outra característica resultante da indução da SOP pelo letrozol é que os animais exibem alguns distúrbios metabólicos da SOP humana como o aumento do peso e da gordura corporal, colesterol total e triglicerídeos [25]. Tais características também foram observadas na presente pesquisa, onde os animais do grupo II apresentaram peso, CT, TG, LDL e VLDL elevados em comparação com os demais grupos, sendo esse

efeito atenuado após a utilização da metformina, melatonina ou a associação dos fármacos. Essa diminuição lipídica no tratamento com melatonina pode ser decorrente dos seus efeitos no tecido adiposo marrom, via desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria [26]. Além disso, estudos demonstraram que a suplementação com melatonina é capaz de reduzir tanto o ganho de peso corporal quanto a quantidade de gordura visceral depositada, independente da ingestão de alimentos [27]. A pinealectomia, ou seja, a retirada da glândula pineal, leva ao sobrepeso em ratas, como demonstrado por Tagliaferri et al. [28], enquanto que o ritmo diário de liberação de melatonina é capaz de reverter esses efeitos. Outro estudo realizado por Mohammadi-Sartang et al., [29] demonstrou que a melatonina pode exercer efeitos diretos nos níveis de colesterol e triglicerídeos dependendo da dose utilizada e do seu tempo de administração.

A metformina por sua vez, também pode atuar na diminuição de peso corporal, sendo predominantemente indicada para tratar pacientes com resistência à insulina e obesidade relacionadas à SOP [30]. Sua utilização pode controlar o metabolismo dos lipídios e a ingesta de alimentos, como demonstrado no estudo de Araújo et al., [31]. Além disso, a metformina regula de forma direta os níveis de CT, LDL e peso corporal como demonstrado por Solymar et al., [32].

No que se refere ao número de neonatos, os animais do grupo II, induzidos à SOP, apresentaram uma redução nesse parâmetro, como observado em diversos estudos relacionados à essa patologia, uma vez que nas portadoras da síndrome a implantação embrionária é alterada, levando a quadros de abortos e nascimentos prematuros[33,34]. Apenas o tratamento com melatonina foi capaz de regularizar o número de neonatos assemelhando-se aquele observado no grupo controle, provavelmente devido a sua ação direta nas células ovarianas através de receptores específicos (Mel 1a), por seus efeitos

antioxidantes, protegendo os oócitos e o embrião contra radicais livres, além de promover a manutenção e desenvolvimento do corpo lúteo através da sua influência na produção de progesterona [35]. A melatonina também atravessa a barreira materno-fetal, protegendo e fornecendo uma série de informações fotoperiódicas para o feto, não apresentando efeitos deletérios quando administrada durante o período gestacional [6]. A metformina por sua vez, apresenta efeitos ovarianos através da sua ação insulinosensibilizante, reduzindo a síntese de andrógenos, entretanto, seus efeitos quando administrada durante o período gestacional ainda não são totalmente elucidados. Estudos demonstraram sua segurança quando utilizada até o primeiro trimestre da gestação [36], por outro lado, pesquisas recentes demonstram que a administração da metformina não apresenta benefícios clínicos na melhora da ovulação e taxa de gravidez [37], além de trazer algumas alterações fisiológicas fetais, como diminuição de peso, número da prole e danos testiculares [38, 39].

Os animais do grupo V, que receberam a associação dos fármacos apresentaram o menor número de neonatos quando comparado aos demais grupos experimentais, esse efeito pode ser decorrente de uma hipoglicemia causada pela combinação dos medicamentos, uma vez que a metformina é uma droga insulinosensibilizante e a melatonina também apresenta propriedades em reduzir a resistência à insulina e atuar no metabolismo da glicose [22], essas características possivelmente levaram a uma diminuição no ganho de peso corporal durante a gestação e consequentemente a uma redução no número de neonatos, com quadros de abortos.

Os níveis hormonais de progesterona dos animais do grupo I demonstraram um padrão semelhante ao observado na literatura, com aumento no terço médio da gestação, decaindo na fase final do período, próximo ao parto, como demonstrado por Finley, Chunfen e Fewell [40]. Os animais que foram induzidos a policistose apresentaram os

níveis desse hormônio reduzidos, característica decorrente do processo de indução utilizando letrozol [41]. O tratamento com metformina e melatonina isoladamente foi capaz de restabelecer os níveis de progesterona. Já o estradiol, apresenta aumento durante o período gestacional, atingindo valores elevados no final desse período [40], como observado nos animais do grupo I, entretanto, a indução da polícistose diminuiu os níveis desse hormônio durante o período gestacional, essa característica decorrente da utilização do letrozol [42] não foi totalmente revertida com a utilização dos diferentes tratamentos, uma vez que a metformina inibe/diminui a produção de andrógenos, precursores essenciais para síntese de estrógenos [43] e a melatonina é considerada um molécula moduladora, podendo atuar na inibição da aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos [44]. Sua administração associada á metformina, pode ter atuado de forma sinérgica, diminuindo ainda mais os níveis séricos desse hormônio, como observado na presente pesquisa.

Em relação à morfologia ovariana, os animais induzidos a SOP pelo letrozol apresentam ovários exibindo muitos folículos em desenvolvimento, ou seja, um pool de folículos predominantemente secundários e terciários, que podem ser classificados como cistos foliculares, apresentando camada da granulosa atenuada, ou mais fina, e espessamento da camada tecal, além disso, observa-se redução no número ou ausência de corpos lúteos e aumento de folículos atresícos [42]. Elevação no peso e área dos ovários desses animais também pode ser observada, [19], corroborando nossos achados que apresentaram alterações histopatológicas, morfométricas e orgnossomáticas decorrentes da indução da SOP.

A metformina por diminuir o hiperandrogenismo, promove uma diminuição dos seus estímulos fazendo com que as alterações histopatológicas decorrentes da SOP sejam atenuadas, levando a um menor número de cistos ovarianos e estimulando a

seleção folicular para que ocorra o processo de ovulação, como demonstrado por Correia et al., [45]. Já a melatonina, que atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, regula a síntese e liberação de LH, ou seja, diminuindo seus níveis que se encontram elevados na SOP e aumentando os níveis de FSH, estimulando uma maturação folicular normal, resultando em um aumento na porcentagem de folículos ovulados, além disso, a melatonina também reduz a biossíntese de andrógenos pelas células da teca [46,28]. Os animais do grupo V apresentaram um índice organossomático reduzido quando comparado ao grupo controle, e menor quantidade de folículos terciários analisados na morfometria ovariana, tais achados podem ser decorrentes dos efeitos dos fármacos administrados durante todo o período gestacional, levando a uma diminuição significativa na razão LH/FSH, impedindo o desenvolvimento adequado dos folículos, bem como reduzindo os níveis de andrógeno que também é um hormônio precursor necessário para a maturação folicular.

Além das diversas alterações histopatológicas também é observado nos ovários os animais induzidos a SOP uma hiperplasia [47,28], como observado no presente estudo, onde o volume ovariano era ocupado principalmente pelos cistos, com poucos corpos lúteos, levando a uma menor marcação para as fibras colágenas. Após os respectivos tratamentos, o número de cistos diminuiu e conseqüentemente houve um aumento das fibras colágenas ovarianas.

Os receptores androgênicos (RA) caracteristicamente podem ser encontrados no núcleo de diversos tipos celulares ovarianos, entretanto, sua localização citoplasmática também pode ser observada quando estes se encontram de forma estabilizada, acoplados a proteínas de choque térmico (HSP 90, HSP 70), apenas migram para o núcleo celular quando se ligam à moléculas específicas (ligantes) que modificam sua estrutura, permitindo que ações genômicas ocorram [48]. Pesquisa já demonstrou marcação para

receptor de andrógenos no citoplasma de células ovarianas [49], como observado no presente estudo.

Os RAs podem ser encontrados em todos os tipos de células ovarianas, estando sua intensidade relacionada com a espécie estudada e nível de maturação folicular. Em ratos, por exemplo, sua expressão diminui à medida que o folículo vai amadurecendo e se tornando pré-ovulatório, enquanto que o estroma próximo a tais folículos apresenta maior expressão desse receptor, contrariamente ao que é observado no ovário de mulheres [50]. Tais características também foram observadas no presente estudo, onde as células da granulosa dos folículos antrais e pré-ovulatórios apresentaram uma menor marcação em comparação ao estroma que circundava tais folículos.

Na SOP estudos demonstram diferentes polimorfismos desse receptor que podem estar diretamente relacionados à fisiopatologia da doença [51]. Em trabalho realizado por Chadha et al., [52] foi observado uma super-regulação, ou um aumento na expressão de receptor androgênico no estroma ovariano de animais com SOP, entretanto sua correlação com a síndrome não foi totalmente esclarecida. Tal característica também foi observada no presente estudo, onde os animais do grupo II apresentaram uma maior quantificação para marcação do RA.

Além disso, sabe-se que a expressão desse receptor é controlada pelos níveis das gonadotrofinas, como o FSH, e hormônios esteróides, como a testosterona. Trabalho realizado por Tetsuka et al., [50] demonstrou que a administração de gonadotrofinas leva a uma diminuição na expressão desse receptor em ovário de ratas *in vitro*. Assim a utilização da melatonina e da metformina, que atuam diretamente no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, regulando os níveis de liberação/produção de gonadotrofinas e hormônios esteróides pode regular ou normalizar a expressão desse receptor ovariano.

Diante de todos esses achados, pode-se concluir que as monoterapias apresentaram maior eficácia em normalizar os parâmetros decorrentes da indução da SOP durante o período gestacional quando comparadas com a associação dos fármacos, destacando-se a utilização da melatonina exógena, podendo esta, diante de todos os seus efeitos benéficos, ser considerada uma alternativa para posteriores pesquisas relacionadas à terapêutica da SOP.

5.REFERÊNCIAS

- [1] Yao K, Bian C, Zhao X. Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and gestational diabetes: Aggravated complication of pregnancy. *Exp Ther Med* 2017; 14 (2): 1271–1276.
- [2] 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(4):350–354.
- [3] González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 (1):336–340.
- [4] Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186 (2): 137-141.
- [5] Fujimoto A, Osuga Y, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Momoeda M, Kugu K, Koga K, Morita Y, Wada O, Taketani Y. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low- late midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Gen* 2002; 19 (12): 550-554.

- [6] Goldman BD. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. *Sci STKE* 2003; 192: 29-31.
- [7] Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril* 2003;79 (4):956–962.
- [8] Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA Nestler JE. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin End Met* 2002; 87(2): 524-529.
- [9] Glueck CJ, Goldenberg N, Pranikoff J, Khan Z, Padda J, Wang P. Effects of metformin-diet intervention before and throughout pregnancy on obstetric and neonatal outcomes in patients with polycystic ovary syndrome. *Curr. Med Res Opin* 2013; 29 (1): 55-62.
- [10] Johnson N. Metformin is a reasonable first-line treatment option for non-obese women with infertility related to anovulatory polycystic ovary syndrome--a meta-analysis of randomised trials. *Aust N Z J. Obstet Gynaecol* 2011;51 (2):125-129.
- [11] Morin-Papunen L, Rantala AS, Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Hippeläinen M, Perheentupa A, Tinkanen H, Bloigu R, Puukka K, Ruukonen A, Tapanainen JS. Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Clin End Met* 2012; 97 (5):1492-1500.
- [12] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 2004; 35 (2):103-108.
- [13] Elia E, Sander V, Luchetti CG. The mechanism involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Human Rep* 2006; 12 (1):475-481.

- [14] 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 (7):987-995.
- [15] Teixeira AAC, Simoes MJ, Wanderley Teixeira V, Soares Junior JM. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J morph* 2004; 22(3):189-194.
- [16] Zhang Z, Zhou B, Wang H, Wang F, Song Y, Liu S, Xi S. Maize Purple Plant Pigment Protects Against Fluoride-Induced Oxidative Damage of Liver and Kidney in Rats. *Inter J Environ Res Public Health* 2014;11(1): 1020-1033.
- [17] Santos KRP, Teixeira AAC, Silva Neto EJ, Teixeira VW, Cunha, FM. Morphometric analysis of the development of the ovarian follicles in pinealectomized rats. *Inter J Morphol* 2004; 22(2):109-112.
- [18] Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* 2012;86 (5):1-12.
- [19] Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2007;148(8):3781-3791.
- [20] Fu LL, Xu Y, Li DD, Dai XW, Xu X, Zhang JS, Ming H, Zhang XY, Zhang GQ, Ma YL, Zheng LW. Expression profiles of mRNA and long noncoding RNA in the ovaries of letrozole-induced polycystic ovary syndrome rat model through deep sequencing. *Gene* 2018; 657:19-29.
- [21] Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 2001;76(3):517-524.

- [22] Pai SA, Majumdar AS. Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *J Pharm Pharmacol* 2014;66 (12): 1710-1721.
- [23] Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003;80(4):1012-6.
- [24] Terzieva DD, Orbetzova MM, Mitkov MD, Mateva NG. Serum melatonin in women with polycystic ovary syndrome. *Folia Med* 2013; 55(2):10-15.
- [25] Sasikala SL, Shamila S. Unique rat model exhibiting biochemical fluctuations of letrozole induced polycystic ovary syndrome and subsequent treatment with allopathic and ayurvedic medicines. *J Cell Tis Res* 2009; 9: 2013–2017.
- [26] Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res* 2014;56(4):371-381.
- [27] Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot* 2012;63(2):577-597.
- [28] Tagliaferri V, Romualdi D, Scarinci E, Cicco S, Florio CD, Immediata V, Tropea A, Santarsiero CM, Lanzone A, Apa R. Melatonin Treatment May Be Able to Restore Menstrual Cyclicity in Women With PCOS: A Pilot Study. *Reprod Sci* 2018;25(2):269-275.
- [29] Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 2018;37(6):1943–1954.
- [30] Haas J, Bentov Y. Should metformin be included in fertility treatment of PCOS patients? *Med. Hyp* 2017; 100:54-58.

- [31] Araujo G G, Araújo M B, Mota, CSA, Ribeiro C, D'Angelo R A, Manchado FB, Luciano E. .Respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos obesos tratados com metformina. Rev Bras Med Esp 2007;13(6).
- [32] Solymár M, Ivic I, Pótó L, Hegyi P, Garami A, Hartmann P, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Gyöngyi Z, Sarlós P, Simon M, Mátrai P, Bérczi B, Balaskó M. Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly - A meta-analysis. PLoS One 2018;13(11):e0207947.
- [33] Lemos AJ, Peixoto CA, Teixeira AA, Luna RL, Rocha SW, Santos HM, Silva AK, Nunes AK, Wanderley-Teixeira V..Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. Toxicol Appl Pharmacol 2014;280(1):159-168.
- [34] Yang PK, Hsu CY, Chen MJ, Lai MY, Li ZR, Chen CH, Chen SU, Ho HN. The Efficacy of 24-Month Metformin for Improving Menses, Hormones, and Metabolic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2018;103(3):890-899.
- [35]Gibori G. The corpus luteum of pregnancy. The Ovary 1992; 261-317.
- [36] Vanlalhruii, Dasgupta R, Ramachandran R, Mathews JE, Regi A, Thomas N, Gupta V, Visalakshi P, Asha HS, Paul T, Thomas N. .How safe is metformin when initiated in early pregnancy? A retrospective 5-year study of pregnant women with gestational diabetes mellitus from India. Diabetes Res Clin Pract 2018;137:47-55.
- [37] Al-Ruthia YS, Al-Mandeel H, AlSanawi H, Balkhi B, Mansy W, AlGasem R, AlMutairi L. The effect of metformin use on pregnancy rates among polycystic ovary syndrome patients undergoing *in vitro* fertilization : a retrospective cohort study. Saudi Pharm J 2017;25 (6):906-910.

- [38] Hanem LGE, Stridsklev S, Júlíusson PB, Salvesen Ø, Roelants M, Carlsen SM, Ødegård R, Vanky E. Metformin Use in PCOS Pregnancies Increases the Risk of Offspring Overweight at 4 Years of Age: Follow-Up of Two RCTs. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103(4):1612-1621.
- [39] Panchaud A, Rousson V, Vial T, Bernard N, Baud D, Amar E, De Santis M, Pistelli A, Dautriche A, Beau-Salinas F, Cassina M, Dunstan H, Passier A, Kaplan YC, Duman MK, Maňáková E, Eleftheriou G, Klinger G, Winterfeld U, Rothuizen LE, Buclin T, Csajka C, Hernandez-Diaz S. Pregnancy outcomes in women on metformin for diabetes or other indications among those seeking teratology information services. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84(3):568-578.
- [40] Finley C, Zhang C, Fewell JE. Sex steroid levels near the term of pregnancy do not alter lipopolysaccharide-induced fever in oophorectomized rats. *Exp. Physiology* 2015; 100(3): 323–330 323.
- [41] Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Pezzone N, Ortega HH. Microscopic characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat. *Arch Med Res* 2006; 37(7):830–839.
- [42] Zurvarra FM, Salvetti NR, Mason JI, Velazquez MM, Alfaro NS, Ortega HH. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev* 2009;21(7):827-839
- [43] Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F Jr. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev* 2009; 30(1):1–50.

- [44] Okatani Y, Sagara Y. Enhanced nocturnal melatonin secretion in women with functional secondary amenorrhea: relationship to opioid system and endogenous estrogen levels. *Horm. Res* 1995; 43(5):194-199.
- [45] Correia S, Carvalho C, Santos MS, Seica R, Oliveira CR, Moreira PI. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes and associated complications: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2008;8(13):1343-1354.
- [46] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51(1):1-16.
- [47] Speca S, Napolitano C, Tagliaferri C. The pathogenetic enigma of polycystic ovary syndrome. *J Ultrasound* 2007;10(4):153–160.
- [48] Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991;5(10):1396-1404.
- [49] Szoltys M, Słomczyńska M, Tabarowski Z. Immunohistochemical localization of androgen receptor in rat oocytes. *Folia Histochem Cytobiol* 2003;41(2):59-64.
- [50] Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG.. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol* 1995;145(3):535-543.
- [51] Jakubiczka S, Quaiser A, Nickel I, Kleinstein J, Wieacker P. Molecular genetic studies at the androgen receptor gene in female patients with PCO syndrome. *Geburtshilfe Frauenheilkunde* 1997;57: 545-548.
- [52] Chadha S, Pache TD, Huikeshoven JM, Brinkmann AO, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long-term androgen treated transsexual woman. *Hum Patol* 1994;25(11):1198-1204.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Gráfico da ciclicidade estral dos grupos experimentais. Comparação entre o grupo controle (GI), grupo induzido á SOP tratado com solução placebo (GII), e grupos que foram induzidos à SOP, após 10 dias dos respectivos tratamentos (GIII, GIV e GV).

Figura 2. A- Gráfico representando o tempo de acasalamento dos animais, ou seja, quantidade de dias necessários para que houvesse a cópula. B- Gráfico do número de neonatos de cada grupo experimental. C- Índice organossomático dos ovários dos diferentes grupos experimentais.

Figura 3. Gráfico dos níveis séricos de progesterona dos diferentes grupos experimentais durante o período gestacional.

Figura 4. Gráfico dos níveis séricos de estradiol dos diferentes grupos experimentais durante o período gestacional.

Figura 5. Fotomicrografia dos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais. A- ovário dos animais do grupo I, observar presença de folículos (F) em diferentes estágios de desenvolvimento e presença de corpos lúteos (CL). B- ovário dos animais do grupo II, observar a presença de diversos cistos (C), com diminuição na quantidade de corpos lúteos e presença de folículos atresícos (FA). C –D – E- Ovário dos demais grupos experimentais (GIII, IV e V respectivamente) com características semelhantes ao grupo I.

Figura 6. A- Gráfico das medidas em pixels dos grânulos de glicogênio dos diferentes grupos experimentais. B- Gráfico das medidas em pixels das fibras colágenas dos diferentes grupos experimentais.

Figura 7. Análise Imunohistoquímica para o receptor de andrógenos (RA) nos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais. A- ovário dos animais do grupo I, B- ovário dos animais do grupo II, apresentando maior intensidade de marcação, C –D – E- ovário dos demais grupos experimentais (GIII, IV e V respectivamente). Observar marcação na coloração castanha.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão do peso dos animais (g) nos diferentes tempos de tratamento.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	203,6 $\pm$ 14,18b	225,6 $\pm$ 10,91a	232,1 $\pm$ 14,14a	227,5 $\pm$ 16,96a	223,3 $\pm$ 18,68ab	0,007
10 dias Tratamento	205,6 $\pm$ 12,28b	231,6 $\pm$ 9,36a	215,5 $\pm$ 12,04b	224,6 $\pm$ 15,57b	215,4 $\pm$ 20,31b	0,039
7 dias de prenhez	218,4 $\pm$ 21,39a	229,4 $\pm$ 15,30a	225,0 $\pm$ 15,61a	239,9 $\pm$ 15,04a	209,4 $\pm$ 13,20b	0,012
14 dias de prenhez	231,3 $\pm$ 16,68a	237,1 $\pm$ 21,95a	236,9 $\pm$ 15,42a	253,4 $\pm$ 12,53a	223,1 $\pm$ 7,12b	0,008
21 dias de prenhez	267,3 $\pm$ 19,76a	274,1 $\pm$ 20,87a	274,6 $\pm$ 17,25a	261,6 $\pm$ 14,71a	258,9 $\pm$ 13,89a	0,053

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Níveis séricos de colesterol total (CT) dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	57,03 $\pm$ 3,91b	102,77 $\pm$ 1,20a	107,71 $\pm$ 3,31a	104,73 $\pm$ 5,93a	118,56 $\pm$ 2,12a	0,034
10 dias Tratamento	53,26 $\pm$ 2,23b	98,84 $\pm$ 1,33a	58,27 $\pm$ 3,47b	59,88 $\pm$ 4,44b	52,21 $\pm$ 3,95b	0,041
7 dias de prenhez	59,01 $\pm$ 3,45b	73,52 $\pm$ 1,07a	55,32 $\pm$ 3,32b	51,21 $\pm$ 2,11b	56,37 $\pm$ 3,54b	0,022
14 dias de prenhez	56,34 $\pm$ 1,83b	75,33 $\pm$ 4,97a	57,06 $\pm$ 0,79b	56,68 $\pm$ 1,86b	83,29 $\pm$ 5,14a	0,038
21 dias de prenhez	185,21 $\pm$ 13,77b	229,07 $\pm$ 3,45a	121,01 $\pm$ 1,25c	126,92 $\pm$ 3,16c	129,47 $\pm$ 1,56c	0,011

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de triglicerídeos (TG) dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	62,04 $\pm$ 1,48b	98,31 $\pm$ 7,32a	82,27 $\pm$ 11,02a	96,48 $\pm$ 9,23a	81,59 $\pm$ 10,44a	0,021
10 dias Tratamento	68,07 $\pm$ 1,97b	79,54 $\pm$ 1,47a	80,34 $\pm$ 2,33a	72,63 $\pm$ 4,27b	54,75 $\pm$ 3,77c	0,037
7 dias de prenhez	71,36 $\pm$ 2,37a	75,21 $\pm$ 4,56a	75,73 $\pm$ 3,79a	72,33 $\pm$ 2,23a	73,24 $\pm$ 3,41a	0,19
14 dias de prenhez	68,49 $\pm$ 9,21a	65,04 $\pm$ 5,67a	63,09 $\pm$ 8,36a	60,41 $\pm$ 4,57a	60,05 $\pm$ 3,19a	0,049
21 dias de prenhez	203,07 $\pm$ 13,50c	396,12 $\pm$ 12,45a	270,21 $\pm$ 4,67b	231,24 $\pm$ 14,56c	213,28 $\pm$ 9,24c	0,033

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de HDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	22,79 $\pm$ 1,32a	16,51 $\pm$ 2,41b	17,78 $\pm$ 1,33b	19,92 $\pm$ 1,48b	18,31 $\pm$ 2,3b	0,001
10 dias Tratamento	23,97 $\pm$ 2,14 a	19,43 $\pm$ 1,26b	25,3 $\pm$ 2,19a	24,69 $\pm$ 2,68a	24,15 $\pm$ 2,31a	0,01
7 dias de prenhez	27,45 $\pm$ 1,74a	18,33 $\pm$ 1,52c	25,48 $\pm$ 1,3a	21,41 $\pm$ 2,46b	21,48 $\pm$ 1,9b	0,027
14 dias de prenhez	31,24 $\pm$ 3,59a	25,02 $\pm$ 4,21b	32,45 $\pm$ 3,87a	32,33 $\pm$ 2,93a	25,22 $\pm$ 2,48b	0,045
21 dias de prenhez	52,51 $\pm$ 2,27a	27,57 $\pm$ 1,53c	39,69 $\pm$ 2,19b	37,74 $\pm$ 2,73b	38,34 $\pm$ 1,86b	0,02

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de LDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	11,54 $\pm$ 2,31b	66,6 $\pm$ 2,41a	68,48 $\pm$ 2,27a	60,52 $\pm$ 7,21a	73,94 $\pm$ 6,25a	0,001
10 dias Tratamento	10,57 $\pm$ 4,26b	63,51 $\pm$ 3,25a	16,91 $\pm$ 3,48b	20,67 $\pm$ 4,94b	17,11 $\pm$ 4,32b	0,022
7 dias de prenhez	17,29 $\pm$ 3,64b	39,15 $\pm$ 1,39a	14,7 $\pm$ 3,14b	15,34 $\pm$ 3,12b	21,25 $\pm$ 2,44b	0,01
14 dias de prenhez	14,08 $\pm$ 2,17b	37,3 $\pm$ 3,15a	12,01 $\pm$ 2,68b	12,29 $\pm$ 2,01b	43,26 $\pm$ 4,78a	0,044
21 dias de prenhez	92,1 $\pm$ 9,82b	122,3 $\pm$ 5,73a	27,28 $\pm$ 5,69d	46,94 $\pm$ 8,31c	48,48 $\pm$ 7,21c	0,001

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de VLDL dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	12,9 $\pm$ 1,79b	19,66 $\pm$ 1,43a	16,45 $\pm$ 1,26a	19,29 $\pm$ 1,37a	16,31 $\pm$ 2,1a	0,01
10 dias Tratamento	13,72 $\pm$ 2,54a	15,9 $\pm$ 2,95a	16,06 $\pm$ 3,15a	14,52 $\pm$ 1,38a	10,95 $\pm$ 2,6a	0,64
7 dias de prenhez	14,27 $\pm$ 1,14a	15,04 $\pm$ 1,73a	15,14 $\pm$ 1,88a	14,46 $\pm$ 1,97a	14,64 $\pm$ 1,43a	0,73
14 dias de prenhez	13,69 $\pm$ 1,76a	13,01 $\pm$ 2,35a	12,61 $\pm$ 1,67a	12,06 $\pm$ 2,17a	12,01 $\pm$ 2,8a	0,52
21 dias de prenhez	40,6 $\pm$ 2,65c	79,2 $\pm$ 2,44a	54,04 $\pm$ 3,19b	46,24 $\pm$ 2,78c	42,65 $\pm$ 3,67c	0,0027

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 7. Média $\pm$ desvio padrão dos níveis séricos de glicose dos diferentes grupos experimentais (mg/dL)

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Após Indução	89,21 $\pm$ 7,9b	110,14 $\pm$ 4,83a	112,34 $\pm$ 5,31a	109,98 $\pm$ 3,56a	102,25 $\pm$ 4,87a	0,002
10 dias Tratamento	92,34 $\pm$ 12,67a	112,76 $\pm$ 3,59a	105,04 $\pm$ 9,24a	107,83 $\pm$ 8,56a	97,02 $\pm$ 10,20a	0,43
7 dias de prenhez	113,65 $\pm$ 4,89a	121,16 $\pm$ 5,67a	111,45 $\pm$ 6,73a	110,32 $\pm$ 7,48a	108,45 $\pm$ 5,21a	0,061
14 dias de prenhez	121,32 $\pm$ 3,28a	129,46 $\pm$ 5,19a	119,45 $\pm$ 6,7a	123,35 $\pm$ 5,38a	116,14 $\pm$ 9,03a	0,21
21 dias de prenhez	138,78 $\pm$ 4,31a	135,25 $\pm$ 3,25a	123,12 $\pm$ 7,32a	132,63 $\pm$ 6,41a	101,71 $\pm$ 5,67b	0,034

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 8. Análise morfométrica (percentual) dos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais

	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
F. Primário	1,16 $\pm$ 0,98 a	3,61 $\pm$ 1,85a	2,64 $\pm$ 1,23a	4,31 $\pm$ 1,12a	2,56 $\pm$ 0,97a	0,053
F. Secundário	7,24 $\pm$ 1,45b	14,33 $\pm$ 3,72a	5,15 $\pm$ 1,37b	8,38 $\pm$ 1,54b	6,86 $\pm$ 1,87b	0,011
F. Terciário	16,88 $\pm$ 3,32b	32,88 $\pm$ 5,54a	18,33 $\pm$ 9,31b	19,25 $\pm$ 4,57b	10,63 $\pm$ 3,83c	0,037
Corpo Lúteo	37,06 $\pm$ 13,6a	21,69 $\pm$ 6,21b	40,38 $\pm$ 11,93a	40,31 $\pm$ 12,84a	31,81 $\pm$ 11,06a	0,044
F. Atrésico	8,97 $\pm$ 1,63b	14,86 $\pm$ 2,31a	10,25 $\pm$ 1,76b	9,81 $\pm$ 3,49b	11,65 $\pm$ 1,47b	0,039
Estroma	21,69 $\pm$ 1,54 b	17,63 $\pm$ 5,41 b	23,25 $\pm$ 6,84 b	20,94 $\pm$ 3, 88 b	31,06 $\pm$ 6,47a	0,032
Teca (μm)	25,17 $\pm$ 6,31b	35,14 $\pm$ 4,85a	29,49 $\pm$ 5,10b	28,89 $\pm$ 11,99b	41,65 $\pm$ 10,07a	0,012
Granulosa (μm)	59,85 $\pm$ 18,31a	19,66 $\pm$ 4,51b	51,86 $\pm$ 15,44a	46,44 $\pm$ 18,48a	41,56 $\pm$ 15,36a	0,0058

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 1.

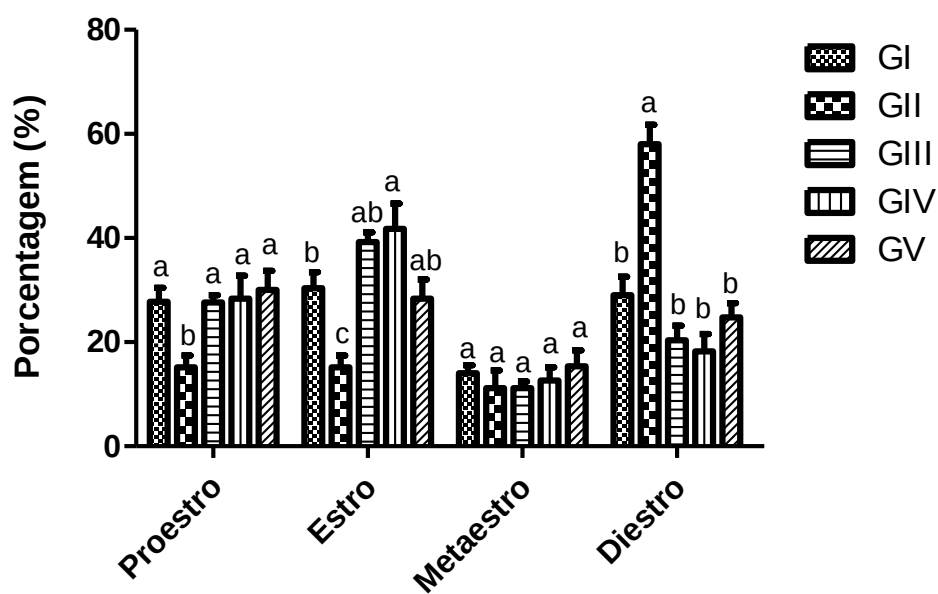


Figura 2.

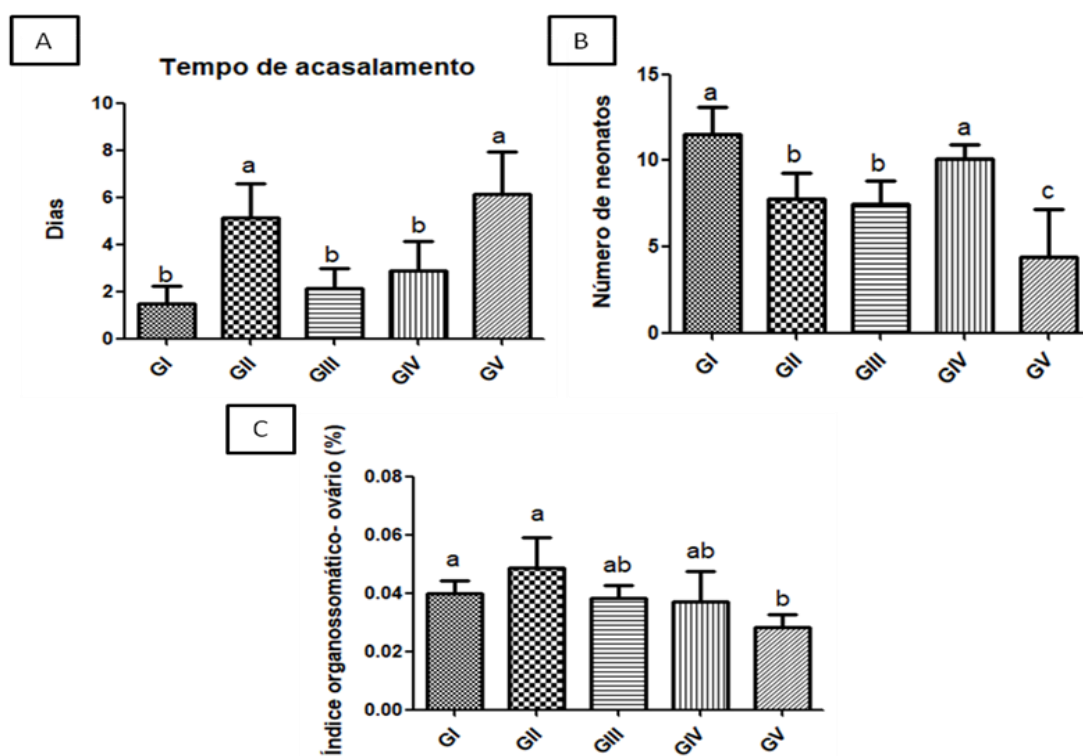


Figura 3.

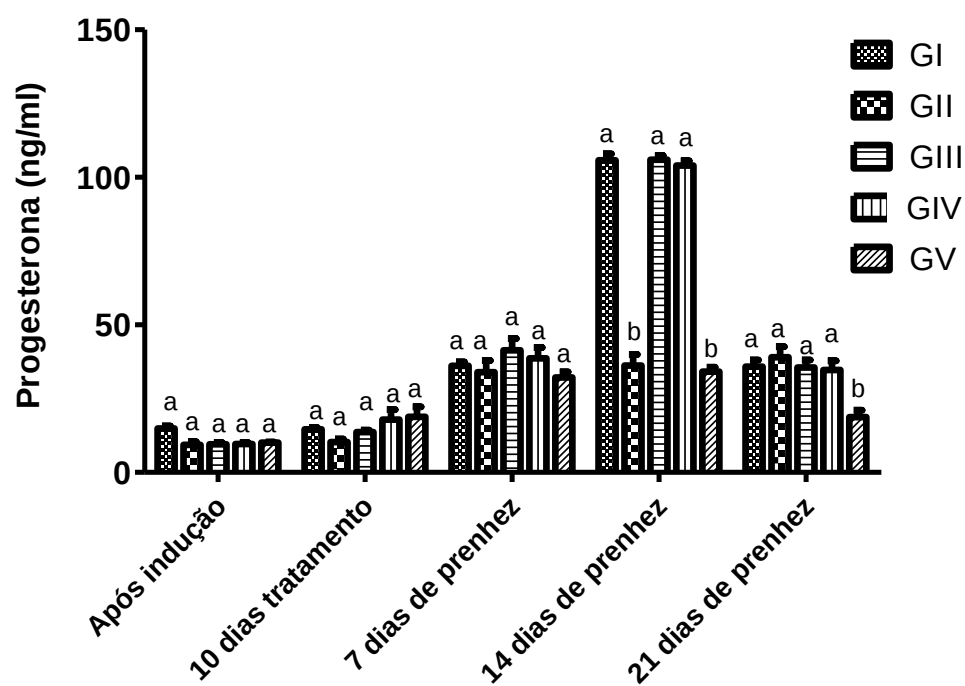


Figura 4.

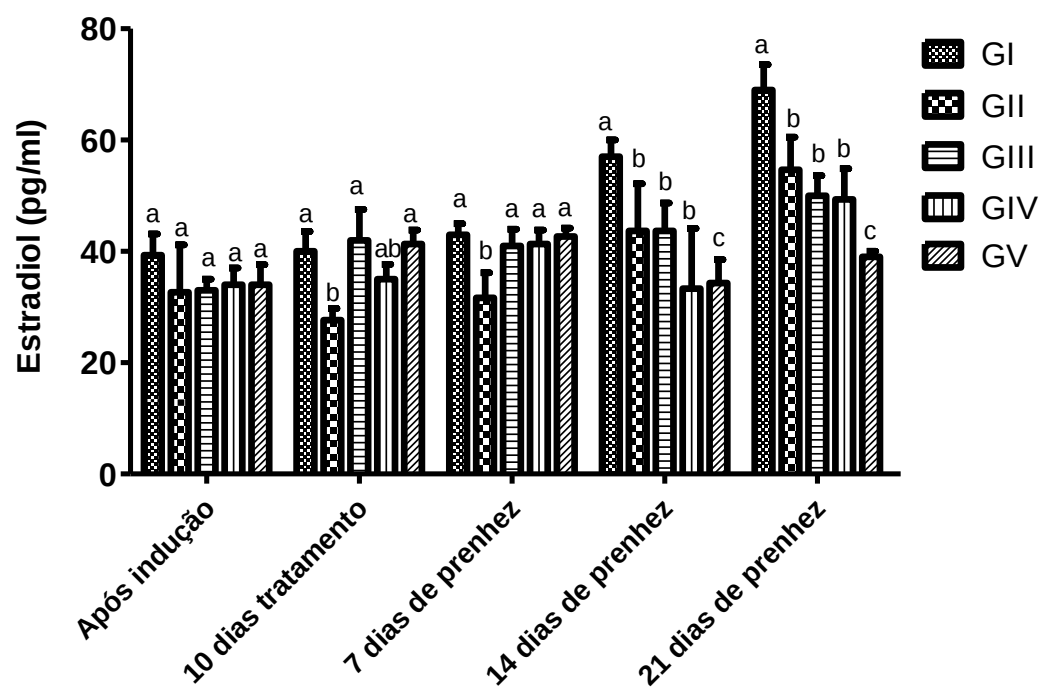


Figura 5.

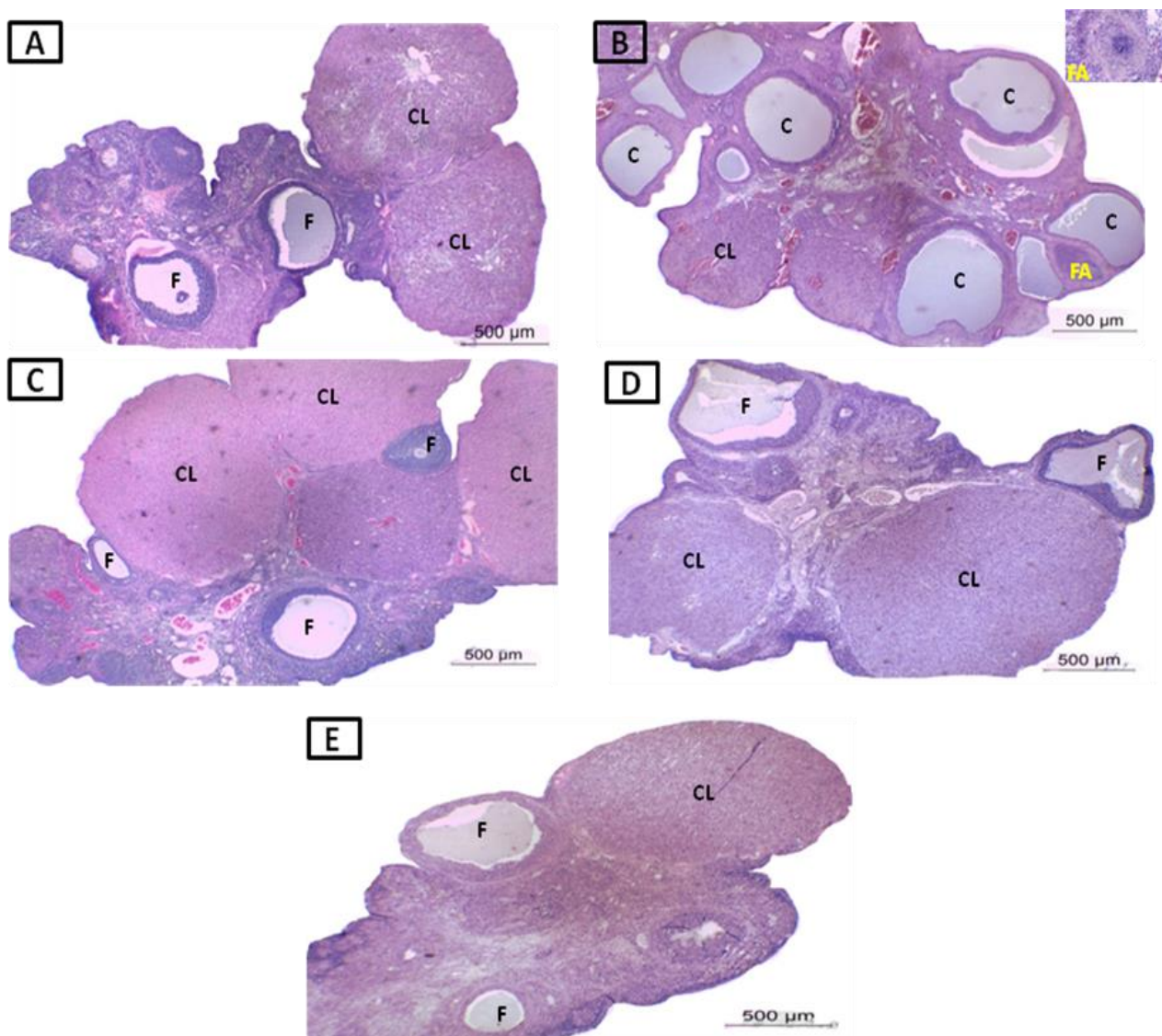


Figura 6.

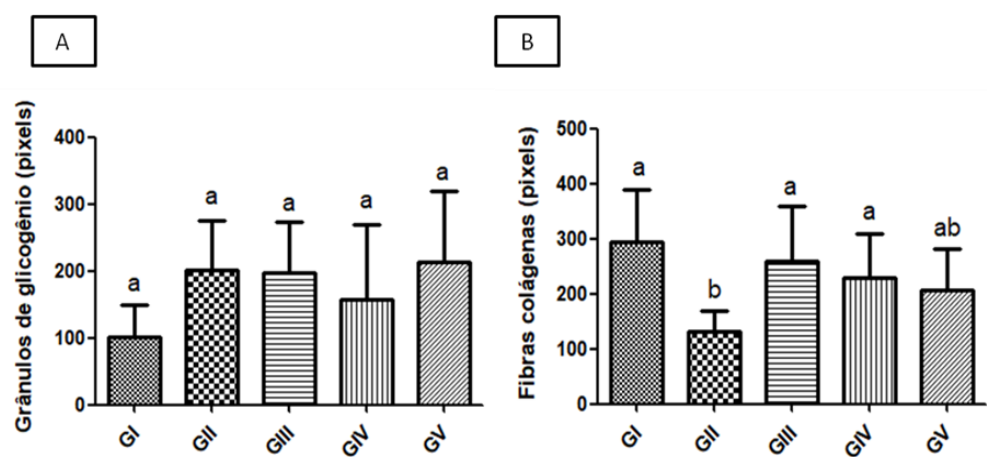
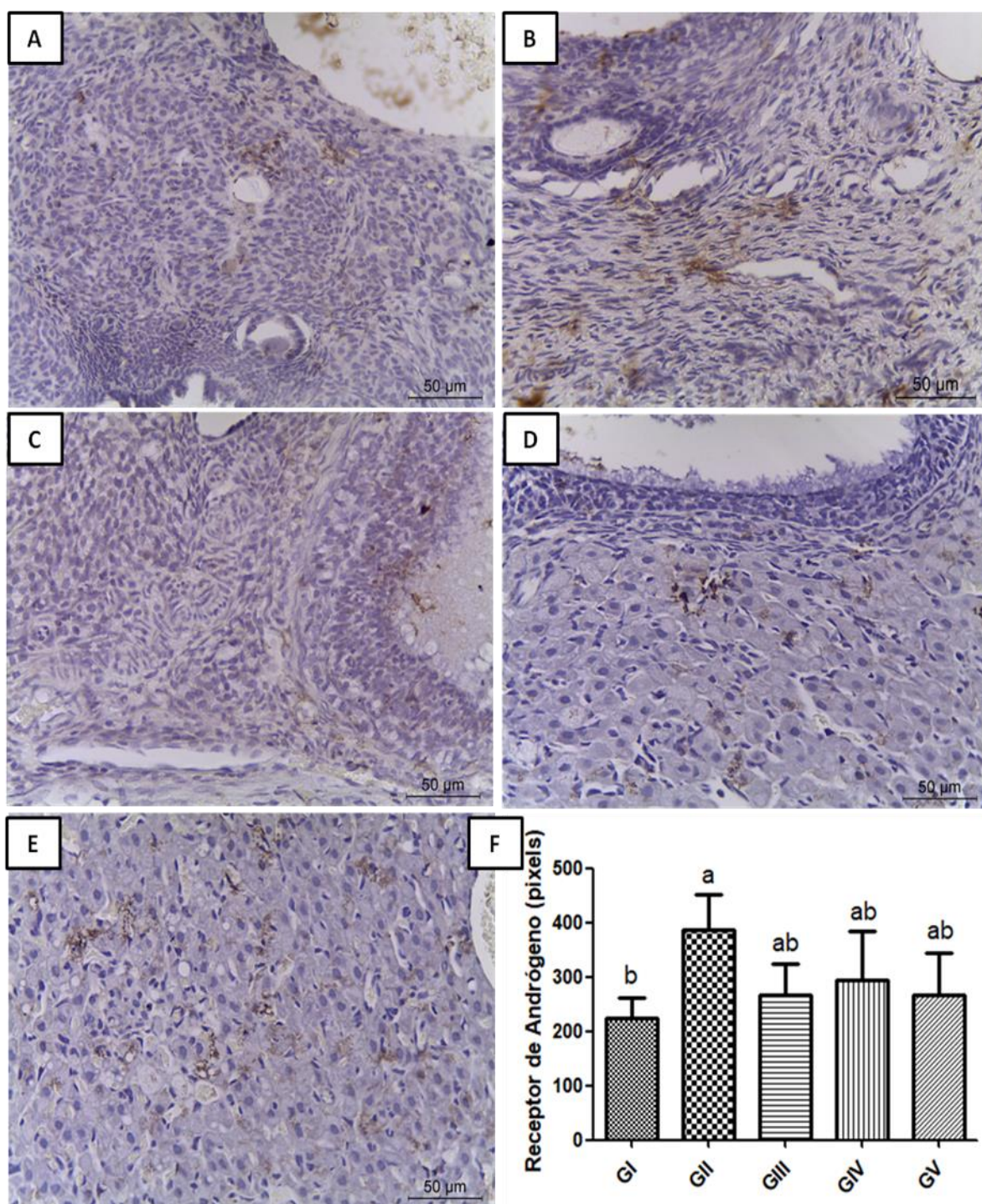


Figura 7.



Capítulo III

Melatonina previne os efeitos da metformina nas gônadas da prole de ratas tratadas para a síndrome dos ovários policísticos antes e durante a gestação¹

Carolline G. D'assunção², Cintia G. M. Ferreira², Érique R. Alves², Álvaro A. C. Teixeira², Valéria Wanderley-Teixeira^{2*}

ABSTRACT.- D'assunção C.G., Ferreira C.G., Alves E.R., Teixeira A.A., Wanderley-Teixeira V. 2019.[**Melatonin prevents the effects of metformin on the progenitor gonads of rats treated for polycystic ovarian syndrome before and during pregnancy**] Melatonina previne os efeitos da metformina, utilizada durante a gestação em ratas, para tratamento da síndrome dos ovários policísticos nas gônadas da prole. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0): 00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, Pernambuco, 52171-900 Brasil. E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br

PCOS can lead to various gestational complications, and it is therefore recommended to continue previous treatments during this period, such as the use of metformin. However metformin can affect the embryological development promoting malformations in neonates, besides renal, hepatic and testicular changes. Thus its association with melatonin, which plays several protective roles in reproduction, could be an effective alternative to prevent gonadal alterations. For this, 40 albino rats were divided into five groups; I- Animals without induction of PCOS; II- Animals induced by PCOS; III- Animals induced to PCOS and treated with Metformin; IV- Animals induced to SOP and treated with Melatonin and V- Animals induced to SOP treated with Metformin and Melatonin. The induction of PCOS was performed by gavage of Letrozole at the dosage of 1mg / kg / day for 21 consecutive days. Metformin hydrochloride was administered 10 days before and during the gestational period at the dosage of 50 mg / 100 g, as well as melatonin at the dose of 0.5 mg / kg body weight of the animal. Pups with 20 days postnatal life (weaning) were submitted to euthanasia procedures for further evaluation. It was possible to observe that the pups of group IV, whose matrices received melatonin during gestation maintained the analyzed parameters similar to the pups of the control group. The pups of group II presented some characteristics similar to those observed in PCOS, such as increase in body weight, weight of gonads, ovaries with large numbers of developing follicles, increase in testicular weight, and elevation in androgen receptor expression. Treatment with metformin also promoted some changes, such as decreased pupillary ovarian weight, vacuolization and seminiferous tubule degeneration, changes in estrogen and testosterone levels, and expression of testicular androgen receptors. Therefore, the use of melatonin was more effective, since the alterations due to maternal PCOS and the use of metformin could be normalized with its use in the gestational period, with no adverse effects on the progeny.

INDEX TERMS: PCOS, melatonin, metformin, gestation, puppies, rats

1 Recebido em

Aceito para publicação em

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, Pernambuco, 52171-900 Brasil. * Autor para correspondência: valeria.wanderley@ufrpe.br

RESUMO.- A SOP pode levar a diversas complicações gestacionais, sendo recomendado, portanto, a continuação dos tratamentos prévios durante esse período, como a utilização da metformina. Entretanto a metformina pode afetar o desenvolvimento embriológico promovendo malformações nos neonatos, além de alterações renais, hepáticas e nas células testiculares. Assim sua associação com a melatonina, que desempenha diversas funções protetoras na reprodução poderia ser uma alternativa eficaz para prevenir alterações gonadais. Para isso foram utilizadas 40 ratas albinas divididas em cinco grupos; I- Animais sem indução da SOP; II- Animais induzidos à SOP; III- Animais induzidos a SOP e tratados com Metformina; IV- Animais induzidos a SOP e tratados com Melatonina e V- Animais induzidos a SOP tratados com Metformina e Melatonina. A indução da SOP foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos. O cloridrato de metformina foi administrado 10 dias antes e durante o período gestacional na dosagem de 50 mg/100g, assim como a melatonina, na dose de 0,5mg/kg de peso corporal do animal. Filhotes com 20 dias de vida pós-natal (desmame) foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para posterior avaliação. Foi possível observar

que os filhotes do grupo IV, cujas matrizes receberam melatonina durante a gestação mantiveram os parâmetros analisados semelhantes aos filhotes do grupo controle. Os filhotes do grupo II apresentaram algumas características semelhantes às observadas na SOP, como aumento do peso corporal, do peso das gônadas, ovários com grande quantidade de folículos em desenvolvimento, aumento do peso testicular, além de elevação na expressão dos receptores androgênicos. O tratamento com metformina também promoveu algumas alterações, como diminuição do peso dos ovários dos filhotes, vacuolização e degeneração dos túbulos seminíferos, alterações nos níveis de estrógeno e testosterona e na expressão dos receptores androgênicos testiculares. Assim, a utilização da melatonina mostrou-se mais eficaz, uma vez que as alterações decorrentes da SOP materna e da utilização da metformina puderam ser normalizadas com a sua utilização no período gestacional, não apresentando efeitos adversos sobre a progênie.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: SOP, melatonina, metformina, gestação, filhotes, ratas

INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos caracteriza-se como uma das desordens endocrinológica mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva que pode levar à infertilidade feminina (AZZIS et al. 2016). Entretanto, muitas pacientes conseguem engravidar e demonstram um aumento de 2-4 vezes no risco de aborto espontâneo ou parto prematuro, uma vez que apresentam mais chances de desenvolverem hiperplasia e câncer endometrial (BARRY et al. 2014, KUYUCU et al. 2018) além de interferências na implantação (YU et al. 2016). Também pode ser observado que as mulheres grávidas que são diagnosticadas com SOP apresentam um maior risco de desenvolver diabetes gestacional (DG), sendo DG e SOP fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 após a gestação (DARGHAM et al. 2018).

Dessa forma, a metformina, uma biguanida utilizada para pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se o agente mais utilizado para o tratamento da SOP em mulheres gestantes (SIVALINGAN et al. 2014, McGRATH et al. 2018). Vários estudos têm indicado que a manutenção do tratamento com metformina durante a gravidez, reduz o risco de abortos no primeiro trimestre (JAKUBOWICZ et al. 2002), e nascimentos prematuros (GLUECK et al. 2013). Assim, muitas pacientes com SOP continuam o tratamento com a metformina durante o período gestacional (JOHNSON 2011, MORIN-PAPUNEN et al. 2012).

Entretanto a metformina pode afetar o desenvolvimento embriológico, uma vez que tem a capacidade de atravessar a placenta livremente sem ser alterada (KOVO et al. 2008). Em estudo recente, observaram-se efeitos abortivos e malformações dos neonatos decorrentes da utilização da metformina (PANCHAUD et al. 2018), além de alterações renais, hepáticas (LAUTATZIS et al. 2013), nas células testiculares dos neonatos (TARTARIN et al. 2012) e diminuição da massa corporal desses (KOVO et al. 2008, HANEM et al. 2018).

A melatonina, um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, atua diretamente no ovário modulando diversas funções como os níveis de estrógeno e progesterona, a atividade funcional e o crescimento ovariano, além da modulação das gonadotrofinas (GnRH) que regulam a concentração de LH e FSH (DEVOTO et al. 2002, FUJIMOTO et al. 2002). Também foi observado que, durante o período gestacional, a produção e concentração da melatonina apresentam mudança gradual, sugerindo que esse hormônio desempenha um importante papel em sua manutenção (NAKAMURA et al. 2001). Esta indolamina lipofílica atravessa a placenta livremente, atingindo a circulação fetal com facilidade, fornecendo informações periódicas para o feto através de receptores específicos para este hormônio em diversos tecidos, mediando diferentes interações fisiológicas fetais, além de promover proteção a órgãos e tecidos devido a sua capacidade antioxidante e moduladora do sistema imunológico (GOLDMAN 2003).

Assim, a utilização da melatonina associada à metformina, para o tratamento da SOP, poderia ser uma alternativa terapêutica, uma vez que esta indolamina apresenta efeitos moduladores do sistema reprodutivo e efeitos antioxidantes protegendo os filhotes de possíveis danos gonadais decorrentes da utilização desse medicamento durante a gestação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 200g $\pm$ 20g, procedentes do Biotério do mesmo Departamento. Este experimento foi aprovado pelo CEUA, com a licença 19/2017.

As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabelecem o 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, cada um, constituído por 8 animais;

Grupo I- Animais sem indução da SOP (Controle); Grupo II- Animais induzidos à SOP (SOP); Grupo III- Animais induzidos a SOP e tratados com Metformina (SOP + Met); Grupo IV- Animais induzidos a SOP e tratados com Melatonina (SOP+ Mel); Grupo V- Animais induzidos a SOP tratados com Metformina e Melatonina (SOP+Mel+Met).

Indução da SOP. A indução da Síndrome dos ovários Policísticos foi realizada em todos os animais dos grupos II, III, IV e V. Foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos (KAFALI et al. 2004). Para confirmação da indução, esfregaços vaginais foram realizados para identificação da ciclicidade estral das ratas.

Tratamento com metformina. O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos III e V, na dosagem de 50mg/100g diluído em 0,05mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al. (2006), dez dias antes e durante o período gestacional. O grupo II recebeu apenas água destilada.

Tratamento com melatonina. O tratamento com melatonina foi realizado após aferição do peso das ratas, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima (2004), nas ratas do grupo IV e do grupo V. A melatonina (Sigma, *St. Louis, MO, USA*) foi administrada na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal do animal, dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída na água de beber, durante a noite (18:00). Para garantir a ingestão, os animais passaram diariamente por um período de restrição hídrica de cerca de 4h. A melatonina foi administrada dez dias antes e durante o período gestacional.

Acasalamento dos animais. Após o diagnóstico da SOP, e 10 dias de tratamento, as fêmeas foram pesadas e permitidas 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, corados pelo método de Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

Ao final do experimento, com 20 dias de vida pós-natal (correspondente ao período de desmame) os filhotes foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular para remoção das gônadas. Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia por meio do aprofundamento anestésico.

O peso corporal e o comprimento dos filhotes foram acompanhados durante o período experimental (ao nascer, 7, 14 e 20 dias). Os órgãos (ovários e testículos) foram pesados com auxílio de balança analítica e o índice organossomático foi calculado pela razão entre o peso de cada órgão e o peso corpóreo de cada animal (ZHANG et al., 2014), como representado na figura abaixo:

Onde:

IO: Índice organossomático;

PO: Peso do órgão;

PC: peso corporal.

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

Dosagem hormonal. Os filhotes tiveram o sangue coletado por punção cardíaca. Após centrifugação refrigerada, o soro foi acondicionado em microtubos (eppendorfs) e congelado a -20°C até o momento das dosagens (TEIXEIRA et al. 2004). Os níveis séricos de estrógeno dos filhotes fêmeas e testosterona dos filhotes machos foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

Análise histopatológica e morfométrica. Os órgãos coletados foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente os órgãos foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) para análise de rotina histopatológica.

Para determinar a percentagem da área ovariana ocupada pelos folículos, as lâminas foram observadas em uma objetiva de 10x, contendo no interior um retículo de WEIBEL com 100 pontos. Foram utilizadas cinco lâminas nas quais foram contados os pontos que incidiram sobre os folículos e estroma. Foram determinados quatro campos no ovário, sendo contados 400 pontos por lâmina (SANTOS et al. 2004).

Para morfometria testicular foram obtidas fotomicrografias das lâminas histológicas com auxílio de uma câmera de vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50 onde o diâmetro dos túbulos mais circulares foi medido utilizando o programa IMAGE J calibrado em micrometros. Foram utilizados cerca de 30 túbulos por grupo experimental.

Análise imunohistoquímica. Secções dos ovários e testículos obtidas de material parafinado (5 µm) de todos os grupos foram usadas para detecção por imunohistoquímica para receptor de andrógeno (AR- rabbit

polyclonal IgG, sc- 816, Santa Cruz Biotechnology, 1:100). Inicialmente, as secções do órgão foram desparafinadas com xilol e hidratadas com etanol. Os cortes foram incubados com o anticorpo overnight, e posteriormente foram incubados com histofine, streptavidina-peroxidase, sendo então revelados com substrato cromógeno 3, 3'diaminobenzidina (DAB) em marrom e contra-coradas com Hematoxilina de Harris. A quantificação em pixels da marcação foi realizada utilizando o programa GIMP2.8.

Análise estatística. A análise estatística foi realizada em um programa computacional GraphicPad Prism 5, onde dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-wy com post-hoc de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Peso e comprimento corporal. Foi possível observar que todos os filhotes submetidos aos tratamentos apresentaram pesos semelhantes aos filhotes do grupo controle. Com o decorrer do desenvolvimento dos filhotes, ou seja, a partir do 7º dia de vida pós-natal até o 20º, correspondente ao período do desmame, os filhotes do grupo II apresentaram um maior peso comparado com os demais grupos. Os respectivos tratamentos promoveram um padrão de peso corporal dos filhotes semelhantes aquele observado nos filhotes do grupo controle (GI), sem diferenças significativas entre si (Quadro 1). Já com relação ao comprimento dos filhotes após nascimento verificou-se que os animais do grupo induzidos a policistose sem tratamento apresentaram um crescimento acentuado, diferindo dos demais grupos experimentais, exceto dos filhotes do grupo GV. Esse mesmo comportamento foi observado aos 7 e 14 dias de nascimento. No 20º dia de nascimento houve aumento do comprimento nos filhotes dos grupos II, III e V. Os filhotes do grupo IV apresentaram-se semelhante aos filhotes do grupo controle. Entretanto as maiores médias foram observadas para os filhotes do grupo GII. (Quadro 2).

Peso dos órgãos e índice organossomático. O peso dos ovários dos filhotes demonstrou uma diminuição significativa nos animais do grupo III e V, entretanto, quando calculado o índice organossomático os filhotes do grupo II apresentaram uma diminuição assim como os do grupo V que manteve essa característica (Fig. 1A e C). Já o peso dos testículos aumentou significativamente nos filhotes do grupo II, diferindo dos filhotes dos grupos I II e V, entretanto, quando calculado o índice organossomático não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Fig. 1B e D).

Dosagem hormonal. A análise dos níveis de estradiol dos filhotes demonstrou um aumento significativo desse hormônio nas fêmeas oriundas das matrizes tratadas com metformina, diferindo dos demais grupos, já os filhotes das matrizes que receberam a associação dos fármacos, ou seja, metformina e melatonina foram os que apresentaram menor nível hormonal (Fig. 2A). Já com relação ao nível de Testosterona total dos filhotes machos, foi possível observar uma redução significativa nos filhotes oriundos de matrizes tratadas com metformina, característica essa que não foi observada nos demais grupos experimentais, que não apresentaram diferenças significativas entre si (Fig. 2B).

Análise histopatológica e morfométrica dos ovários. A análise histopatológica ovariana demonstrou que os ovários dos filhotes do grupo controle apresentaram-se revestidos por um epitélio germinativo bem desenvolvido, formado por células cúbicas, o qual se apóia numa fina camada de tecido conjuntivo denso, formando a túnica albugínea. Abaixo da túnica albugínea encontram-se vários folículos ovarianos, em diferentes estágios de desenvolvimento, contendo os ovócitos (Fig. 3A). A região medular constituída por tecido conjuntivo frouxo e altamente vascularizada encontra-se indefinida por tratar-se de um órgão ainda em processo de desenvolvimento, podendo ser encontrado folículos em toda área ovariana, não estando restritos a camada cortical. Os ovários dos filhotes do grupo II apresentaram-se mais desenvolvidos quando comparados aos ovários dos demais grupos com maior quantidade de folículos, principalmente secundários (Fig. 3B). Nos ovários de todos os animais dos diferentes grupos experimentais não foi observada a presença de corpos lúteos, por tratar-se de animais que não chegaram à puberdade, conseqüentemente não ocorrendo o processo ovulatório (Fig. 3-A-E).

A análise morfométrica dos ovários apenas apresentou diferenças significativas no percentual de folículos secundários e terciários, com aumento característico nos animais do grupo II para os folículos secundários e redução nos grupos III, IV e V. Com relação aos folículo terciários houve redução significativa nos filhotes dos grupos II, III e V, que não apresentaram diferenças entre si, mas diferiram significativamente do grupo controle e do grupo G IV (Fig. 3F).

Análise histopatológica e morfométrica dos testículos. Análise histopatológica demonstrou que o testículo dos filhotes do grupo I (controle), apresentou-se revestidos por um epitélio germinativo bem preservado, apoiado sobre uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. No interior dos testículos evidenciou-se a presença de numerosos túbulos seminíferos que se alojam como novelos dentro de um tecido conjuntivo frouxo. Nos túbulos observaram-se numerosas espermatogônias e espermatócitos, além da presença de células de Sertoli, que se encontram aderidas a lâmina basal dos túbulos com suas extremidades apicais voltadas para o lúmen. O 20º dia de vida pós natal corresponde a fase mais densa do desenvolvimento tubular, que corresponde ao período infantil tardio, onde as células de Sertoli deixam de dividir, e as espermatogônias

atingem a densidade máxima formando uma espessa camada pseudoestratificada com as células de Sertoli. Inicia-se a formação do lúmen tubular, evidenciado por um pequeno espaço central claro dentro dos túbulos. O interstício contém vasos e uma população menor de células imaturas de Leydig (Fig. 4A-E). A análise histopatológica apresentou poucas alterações testiculares nos filhotes do grupo III, como vacuolização e degeneração tubular discreta (Fig. 4C).

A análise morfométrica dos testículos demonstrou que os filhotes oriundos do grupo induzido à SOP sem tratamento apresentaram um maior diâmetro tubular, diferindo significativamente dos demais grupos, os tratamentos com metformina e melatonina apresentaram uma diminuição desse diâmetro, entretanto apenas os filhotes do grupo V foram os que apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle (Fig. 4F).

Análise imunohistoquímica dos ovários. A análise imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (RA) apresentou-se de forma moderada nos ovários dos filhotes dos diferentes grupos experimentais, entretanto os filhotes do grupo II e III foram os que apresentaram maior intensidade de marcação diferindo dos demais grupos experimentais (Fig. 5A-E). A marcação quantificada pode ser observada no graficamente (Fig. 5F).

Análise imunohistoquímica dos testículos. A análise imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (RA) apresentou-se de forma moderada nos testículos dos filhotes dos diferentes grupos experimentais, entretanto os filhotes do grupo III e V foram os que apresentaram maior intensidade de marcação diferindo dos demais grupos experimentais (Fig. 6A-E), tal marcação foi quantificada e pode ser observada (Fig. 6F).

DISCUSSÃO

Estudos vêm demonstrando que a presença da SOP durante o período gestacional promove uma programação neonatal, devido à exposição ao excesso de andrógenos, transferindo para o feto características semelhantes as da síndrome ainda na infância (ABBOTT & DUMESIC 2009, MARTINEZ-PINTO et al. 2018). Em estudos realizados com primatas, observou-se que a exposição pré-natal aos andrógenos contribuiu para 70% dos casos de ovários policísticos em idade reprodutiva, para o hiperandrogenismo, alterações na secreção de LH, e aumento do peso dos filhotes (ABBOTT et al. 2005, DUMESIC et al. 2007, ZHOU et al. 2007).

Além dessas características, a exposição fetal a esteróides como a testosterona ou a di-hidrotestosterona não-aromática (DHT) produz efeitos diferenciados sobre a função reprodutiva da progênie. Foram observados números aumentados de folículos em crescimento, sugerindo que o aumento do recrutamento folicular ovariano em animais tratados no período pré-natal com testosterona é mediado pela programação androgênica (MANIKKAM et al. 2008, VEIGA-LOPEZ et al. 2008). Em trabalhos realizados por Martinez-Pinto et al., (2018) e Sotomayor-Zarate et al. (2008) a exposição fetal ao Estradio-Valerate (EV), um dos modelos de indução da SOP, durante a gestação aumentou a expressão de receptor de andrógeno (RA) no ovário da progênie de acordo com os resultados imunohistoquímicos. Além disso, disfunções na produção dos hormônios esteróides pelas células testiculares também foram observadas. Essas características da programação neonatal puderam ser observadas na presente pesquisa, onde os filhotes oriundos de matrizes induzidas a policistose sem tratamento durante a gestação apresentaram um aumento de peso e comprimento corporal, além de alterações ovarianas, como aumento na porcentagem de folículos secundários e expressão do RA, e alterações testiculares, como aumento no peso do órgão e do diâmetro tubular.

A metformina, por ser uma molécula responsável pela ação sensibilizadora de insulina, reduz a ação sinérgica desta ao LH nos ovários, diminuindo a produção androgênica, revertendo alguns efeitos do hiperandrogenismo gestacional sobre os filhotes, sendo capaz de normalizar o ganho de peso corporal dos animais e atuar no metabolismo dos lipídios (SOLYMAR et al. 2018).

A melatonina, que participa de diversas interações fisiológicas fetais também regula os níveis de gordura corporal, estando esse efeito relacionado a dose utilizada e ao tempo de sua administração (MOHAMMADI-SARTANG et al. 2017), como demonstrado por Días-Lopes et al. (1995), onde matrizes pinealectomizadas tiveram filhotes com maior peso corporal, e a utilização da melatonina exógena durante o período gestacional regulou esse ganho de peso.

A melatonina também desempenha diversas funções ovarianas, atuando através de receptores específicos encontrados nos diferentes tipos celulares desse órgão. Sabe-se ainda que a concentração de melatonina plasmática aumenta com o decorrer da gestação (TAMURA et al. 2014), atravessando a barreira placentária livremente, sendo capaz de controlar diversos processos fisiológicos fetais, como a maturação sexual dos filhotes, os níveis das gonadotrofinas, como o LH, como também os níveis dos hormônios esteróides, desempenhando um papel importante no processo de desenvolvimento folicular (TAMURA et al. 2014).

Essa indolamina é capaz de diminuir os níveis de testosterona através de ação direta na aromatase, enzima responsável pela interconversão de andrógenos em estrógenos, podendo assim de forma indireta, por mecanismo de *feed back*, regular a expressão dos receptores androgênicos ovarianos (COS et al. 2004). Tais características foram observadas na presente pesquisa, onde a melatonina durante a gestação promoveu uma

diminuição na quantidade de folículos secundários dos ovários dos filhotes e normalizou a expressão do RA, que encontravam-se elevados devido a indução da SOP materna.

A metformina também atua diretamente no ovário revertendo às características da SOP, como observado no presente estudo, diminuindo a síntese androgênica ovariana e regularizando o processo ovulatório, essa diminuição dos andrógenos pode ser decorrente do aumento da atividade da aromatase, utilizando esses precursores para síntese de estrógeno, hormônio esse encontrado elevado nos animais do grupo III. Essa biguanida, utilizada no período gestacional pode atuar no desenvolvimento dos filhotes uma vez que atravessa a placenta sem ser alterada, atingindo a circulação fetal, podendo também ser encontrada no leite materno (GLUECK et al. 2013).

Apesar de sua utilização ser liberada durante a gestação, por não apresentar efeitos teratogênicos durante o desenvolvimento fetal, muitas controversas sobre seu uso durante esse período são observadas. Em pesquisa realizada por Tartarin et al., (2012) a exposição fetal à metformina, através de sua administração durante o período gestacional, resulta na diminuição do peso dos neonatos e das gônadas destes, redução do volume testicular e das células de Sertoli. Além disso, também pode ser observadas alterações histopatológicas e morfométricas, como vacuolização das células testiculares e redução na população de células de Leydig que, consequentemente diminuem a produção de testosterona durante as fases de formação e desenvolvimento do testículo. Essa redução nos níveis de testosterona, e alterações histopatológicas testiculares foram observadas nos animais do grupo III, ou seja, oriundos de matrizes que receberam metformina durante a gestação.

A redução no nível de testosterona nos testículos pode ser indicativa de alterações funcionais do órgão (RICCI et al. 2009), os níveis desse hormônio também controlam a atividade de seu receptor, onde por um mecanismo de feedback, podem elevar sua expressão em resposta a níveis insuficientes desse hormônio nos testículos, como observado nos animais do grupo III e V, ou seja animais oriundos de matrizes que receberam metformina durante a gestação, destacando-se os animais do grupo III que apresentaram os menores níveis de testosterona plasmática. Os animais do grupo V, não apresentaram alterações hormonais e histopatológicas provavelmente em decorrência da associação da metformina com a melatonina.

A melatonina apresenta receptores em diversas células testiculares, atuando no desenvolvimento desse órgão (KASAHARA et al. 2010), onde níveis séricos e seminais dessa idolamina são significativamente menores em pacientes com infertilidade (FRUNGIERI et al. 2017). Também apresenta propriedades lipofílicas e hidrofílicas podendo passar através da barreira hemato-testicular e entrar nas células testiculares. Atua através de vários receptores específicos, como MT1 e MT2 que acoplados com proteína G regulam a síntese de testosterona (ODAWARA et al. 2009).

Os efeitos da melatonina nos níveis dos hormônios reprodutivos são variáveis e dependem das condições fisiológicas e espécies de animais (REITER et al. 2013). Em animais sazonais, como roedores, a melatonina reduz a expressão do receptor de andrógeno (AHMAD et al. 2010), e tratamentos durante a gestação com esse hormônio induzem o desenvolvimento testicular precoce e a produção de espermatozoides (FOSBERG, et al. 1990).

Vários trabalhos demonstraram benefícios da melatonina em relação aos testículos, onde esta indolamina apresentou efeitos protetores devido ao seu papel antioxidante, evitando os danos decorrentes do estresse oxidativo testicular, bem como sua atuação como molécula moduladora controlando a síntese dos hormônios esteróides, diminuindo a apoptose, atrofia e degeneração tubular, além de aumentar a população de células de Leydig e Sertoli (GLUNELI et al. 2008, MURATOGLU et al. 2018, YU et al. 2018). Além disso, trabalho realizado por Días-Lópes et al. (1995) indica que a glândula pineal e o tratamento com melatonina exógena durante a gestação em ratas podem atuar no desenvolvimento fetal e influenciar a ontogênese pós-natal dos hormônios envolvidos no eixo neuroendócrino-reprodutivo em ratos em desenvolvimento, atuando na fisiologia e maturação testicular.

CONCLUSÃO

Assim pode-se concluir que a melatonina administrada durante o período gestacional para o tratamento da SOP apresentou maior eficácia em reverter às características fetais decorrentes da síndrome, bem como diminuiu os danos decorrentes da administração da metformina durante a gestação, possuindo efeitos protetores tanto a níveis ovarianos quanto testiculares.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e ao apoio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflitos de interesse na presente pesquisa

REFERÊNCIAS

- Abbott D.A. & Dumesic D. A. 2009. Fetal androgen excess provides a developmental origin for polycystic ovary syndrome, *Expert Rev. Obstet.Gynecol.* 4(1): 1-7.
- Abbott D.H., Barnett D.K., Bruns C.M. & Dumesic D.A. 2005. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update.* 11(4):357-74.
- Ahmad R. & Haldar C. 2010. Effect of intra-testicular melatonin injection on testicular functions, local and general immunity of a tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Endocrine.* 37:479-488.
- Azziz R., Carmina E., Chen Z., Dunaif A., Laven J.S., Legro R.S., Lizneva D., Natterson-Horowitz B., Teede H.J. & Yildiz B.O. 2016. Polycystic ovary syndrome. *Nat. Revs. Dis. Primers.* 11 (2):16057.
- Barry J.A., Azizia M. M. & Hardiman P.J. 2014. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Rep. Update.* 20 (5):748-758.
- Cos S., Martínez-Campa C., Mediavilla M.D. & Sánchez-Barceló E.J. 2004. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. pineal Res.* 38 (2): 136-142.
- Dargham S.R., Shewehy A.E., Dakrouy Y., Kilpatrick E.S. & Atkin S.L. 2018. Prediabetes and diabetes in a cohort of Qatari women screened for polycystic ovary syndrome. *Sci. Rep.* 8 (1): 3619.
- Devoto L., Kohen P., Vega M., Castro O., González R.R., Retamales I., Carvallo P., Christenson L.K. & Strauss J.F. 2002. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186 (2): 137-141.
- Díaz López B., Colmenero Urquijo M.D., Díaz Rodríguez M.E., Arce Fraguas A., Esquifino Parras A. & Marín Fernández B. 1995. Effect of pinealectomy and melatonin treatment during pregnancy on the sexual development of the female and male rat offspring. *Eur J Endocrinol.* 132(6):765-70.
- Dumesic D.A., Abbott D.H. & Padmanabhan V. 2007. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord.* 8(2):127-41.
- Elia E., Sander, V. & Luchetti C.G. 2006. The mechanism involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol. Human Rep.* 12 (1):475-481.
- Forsberg M. & Madej A. 1990. Effects of melatonin implants on plasma concentrations of testosterone, thyroxine and prolactin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *J. Rep. Fert.* 89:351-358.
- Frungieri M.B., Calandra R.S. & Rossi S.P. 2017. Local actions of melatonin in somatic cells of the testis. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (6):E1170.
- Fujimoto A., Osuga Y., Fujiwara T., Yano T., Tsutsumi O., Momoeda M., Kugu K., Koga K., Morita Y., Wada O., & Taketani Y. 2002. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low- late midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J. Assist. Reprod. Gen.* 19 (12): 550-554.
- Glueck C.J., Goldenberg N., Pranikoff J., Khan Z., Padda J. & Wang P. 2013. Effects of metformin-diet intervention before and throughout pregnancy on obstetric and neonatal outcomes in patients with polycystic ovary syndrome. *Curr. Med. Res. Opin.* 29 (1): 55-62.
- Goldman B.D. 2003. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. *Sci. STKE.* 192: 29-31.
- Guneli E., Tugyan K., Ozturk H., Gumustekin M., Cilaker S. & Uysal N. 2008. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. *Eu. Surg. Res.* 40 (4):354-360.

- Hanem L.G.E., Stridsklev S., Júlíusson P.B., Salvesen Ø., Roelants M., Carlsen S.M., Ødegård R. & Vanky E. 2018. Metformin Use in PCOS Pregnancies Increases the Risk of Offspring Overweight at 4 Years of Age: Follow-Up of Two RCTs. *J. Clin. End. Met.* 103 (4): 1612–1621.
- Jakubowicz D.J., Luorno M.J., Jakubowicz S., Roberts K.A. & Nestler J.E. 2002. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. End. Met.* 87(2): 524-529.
- Johnson, N. 2011. Metformin is a reasonable first-line treatment option for non-obese women with infertility related to anovulatory polycystic ovary syndrome--a meta-analysis of randomised trials. *Aust. N Z J. Obstet. Gynaecol.* 51 (2):125-129.
- Kafali H., Iriadam M., Ozardali I. & Demir N. 2004. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch. Med. Res.* 35 (2):103-108.
- Kasahara T., Abe K., Mekada K., Yoshiki A. & Kato T. 2010. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 107 (14): 6412–6417.
- Kovo M., Haroutiunian S., Feldman N., Hoffman A. & Glezerman M. 2008. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Bio.* 136 (1): 29–33.
- Kuyucu Y., Çelik L.S., Kendirlihan Ö., Tap Ö. & Mete U.Ö. 2018. Investigation of the uterine structural changes in the experimental model with polycystic ovarysyndrome and effects of vitamin D treatment: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Reprod. Biol.* 18 (1):53-59.
- Lautatzis M. E., Goulis D.G. & Vrontaks M. 2013. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Met. Clin. Exp.* 62 (1):1522-1534.
- Manikkam M., Thompson R.C., Herkimer C., Welch K.B., Flak J., Karsch F.J. & Padmanabhan V. 2008. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on pre- and postnatal gonadotropin regulation in sheep. *Bio. Reprod.* 78 (4):648–660.
- Martinez-Pinto J., Piquer B., Tiszavari M. & Lara H.E. 2018. Neonatal exposure to estradiol valerate reprograms the rat ovary androgen receptor and anti-Müllerian hormone to a polycystic ovary phenotype. *Reprod. Toxicol.* 75:127–135.
- McGrath R.T., Glastras S.J., Scott E.S., Hocking S.L. & Fulcher G.R. 2018. Outcomes for Women with Gestational Diabetes Treated with Metformin: A Retrospective, Case-Control Study. *J. Clin. Med.* 7 (3):E50.
- Morin-Papunen L., Rantala A.S., Unkila-Kallio L., Tiitinen A., Hippeläinen M., Perheentupa A., Tinkanen H., Bloigu R., Puukka K., Ruokonen A., Tapanainen J.S. 2012. Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J. Clin. End. Met.* 97 (5):1492-1500.
- Muratoğlu S., Akarca Dizakar O.S., Keskin Aktan A., Ömeroğlu S. & Akbulut K.G. 2018. The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. *Andrologia.* E13203.
- Mohammadi-Sartang M., Ghorbani M. & Mazloom Z. 2018. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 37(6):1943-1954.
- Nakamura Y., Tamura H., Kashida S., Takayama H., Yamagata Y., Karube A., Sugino N. & Kato H. 2001. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto- placental unit during pregnancy. *J. Pineal res.* 30(1): 29-33.
- Odawara H., Iwasaki T., Horiguchi J., Rokutanda N., Hirooka K., Miyazaki W., Koibuchi Y., Shimokawa N., Iino Y., Takeyoshi I. & Koibuchi N. 2009. Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related

orphan receptor (ROR) alpha in breast cancer cells: Identification of a novel ROR response element. *J. Biol. Chem.* 284 (26):17711–17719.

- Panchaud A, Rousson V, Vial T, Bernard N, Baud D, Amar E, De Santis M, Pistelli A, Dautriche A, Beau-Salinas F, Cassina M, Dunstan H, Passier A, Kaplan Y.C, Duman M.K, Maňáková E, Eleftheriou G, Klinger G, Winterfeld U, Rothuizen L.E, Buclin T, Csajka C.& Hernandez-Diaz S. 2018. Pregnancy outcomes in women on metformin for diabetes or other indications among those seeking teratology information services. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84 (3):568-578.
- Prata-Lima, M.F., Baracat, E.C. & Simões, M.J. 2004. 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.* 37 (7):987-995.
- Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S. & Manchester L.C. 2013. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini -Rev. Med. Chem.* 13 (3):373–384.
- Ricci G., Catizone A., Esposito R., Pisanti F.A., Vietri M.T. & Galdieri M. 2009. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia.* 41(6):361-368.
- Santos K.R.P. Teixeira A.A.C., Silva Neto E.J., Teixeira V.W. & Cunha, F.M. 2004. Morphometric analysis of the development of the ovarian follicles in pinealectomized rats. *Inter. J. Morphol.* 22(2):109-112.
- Sivalingam V.N., Myers J., Nicholas S., Balen A.H. & Crosbie E.J. 2014. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. *Hum. Reprod. Update.* 20(6):853-868.
- Solymár M., Ivic I., Póto L., Hegyi P., Garami A., Hartmann P., Pétervári E., Czopf L., Hussain A., Gyöngyi Z., Sarlós P. Simon M., Mátrai P., Bérczi B. & Balaskó M. 2018. Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly - A meta-analysis. *PLoS One.* 13(11):e0207947.
- Sotomayor-Zárate R., Dorfman M., Paredes A. & Lara H.E. 2008. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat, *Biol. Reprod.* 78(4):673–680.
- Tamura H., Takasaki A., Taketani T., Tanabe M., Lee L., Tamura I., Maekawa R., Aasada H., Yamagata Y. & Sugino N. 2014. Melatonin and female reproduction. *J Obstet Gynaecol Res.* 40(1):1-11.
- Tartarin P¹, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, Frydman N, Pozzi S, Frydman R, Lecureuil C, Froment P. 2012. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum. Reprod.* 27(11):3304–3314.
- Teixeira A.A.C., Simoes M.J., Wanderley Teixeira V. & Soares Junior J.M. 2004. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int. J. morph.* 22(3):189-194.
- Veiga-Lopez A., Ye W., Phillips D.J., Herkimer C., Knight P.G. & Padmanabhan V. 2008. Developmental programming: deficits in reproductive hormone dynamics and ovulatory outcomes in prenatal, testosterone-treated sheep. *Biol. Reprod.* 78(4):636–647.
- Yu H.F., Chen H.S., Rao D.P. & Gong J. 2016. Association between polycystic ovary syndrome and the risk of pregnancy complications: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 95(51):e4863.
- Yu K., Deng S.L., Sun T.C., Li Y.Y. & Liu Y.X. 2018. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. *Molecules.* v.23 (2):447, 2018.
- Zhang Z., Zhou B., Wang H., Wang F., Song Y., Liu S. & Xi S. 2014. Maize Purple Plant Pigment Protects Against Fluoride-Induced Oxidative Damage of Liver and Kidney in Rats. *Inter. J. Environ. Res. Public Health.* 11(1): 1020-1033.

Zhou R., Bruns C.M., Bird I.M., Kemnitz J.W., Goodfriend T.L., Dumesic D.A. & Abbott D.H. 2007. Pioglitazone improves insulin action and normalizes menstrual cycles in a majority of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Reprod Toxicol.* 23:438–448.

LEGENDA DAS FIGURAS

Fig.1. Gráfico do peso e índice organossomático dos filhotes. (A)- peso dos ovários. (B)-peso dos testículos. (C)- IO dos ovários e (D)-IO dos testículos.

Fig.2. Níveis hormonais. (A)- Níveis de estradiol dos filhotes fêmeas. (B)- Níveis de testosterona total dos filhotes machos.

Fig.3. Fotomicrografia dos ovários dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- ovário dos filhotes do grupo I; (B)- Ovário dos filhotes do grupo II; (C)- ovário dos filhotes do grupo III; (D)- ovário dos filhotes do grupo IV; (E)- ovário dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da análise morfométrica ovariana. Observar a ausência de diferenciação entre camada cortical e medular, e corpos lúteos, além da presença de diversos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo (FS)- Folículo secundário, (FT)- Folículo terciário.

Fig.4. Fotomicrografia dos testículos dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- testículo dos filhotes do grupo I; (B)- Testículo dos filhotes do grupo II; observar a presença de vacuolização (seta) e degeneração tubular (círculo) (C)- testículo dos filhotes do grupo III; (D)- testículo dos filhotes do grupo IV; (E)- testículo dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da análise morfométrica testicular. Observar a presença de diversos túbulos seminíferos (TS) e interstício (IT), onde alguns túbulos já apresentam a formação do lúmen (L). As espermatogônias- triângulo- e espermatócitos asteriscos (*), externamente observar a presença da cápsula (CP).

Fig.5. Fotomicrografia dos ovários dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- ovário dos filhotes do grupo I; (B)- Ovário dos filhotes do grupo II; (C)- ovário dos filhotes do grupo III; (D)- ovário dos filhotes do grupo IV; (E)- ovário dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da quantificação da marcação em pixels. Observar a coloração acastanhada da marcação do receptor de andrógeno (RA).

Fig.6. Fotomicrografia dos testículos dos filhotes dos diferentes grupos experimentais. (A)- testículo dos filhotes do grupo I; (B)- testículos dos filhotes do grupo II; (C)- testículo dos filhotes do grupo III; (D)- testículo dos filhotes do grupo IV; (E)- testículo dos filhotes do grupo V e (F)- gráfico da quantificação da marcação em pixels. Observar a coloração acastanhada da marcação do receptor de andrógeno (RA).

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1. Média $\pm$ desvio padrão do peso (g) dos filhotes dos diferentes grupos experimentais

DIAS DE VIDA PÓS-NATAL	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Nascimento	6,14 $\pm$ 0,5b	7,02 $\pm$ 0,82a	5,6 $\pm$ 0,92b	6,23 $\pm$ 0,35b	5,96 $\pm$ 0,7b	0,001
7 dias	10,10 $\pm$ 1,47b	14,41 $\pm$ 1,79a	11,22 $\pm$ 1,06b	9,50 $\pm$ 1,09b	11,16 $\pm$ 1,64b	0,003
14 dias	18,45 $\pm$ 3,50b	22,92 $\pm$ 2,11a	17,52 $\pm$ 1,73b	16,59 $\pm$ 3,54b	18,49 $\pm$ 3,53b	0,005
20 dias	28,22 $\pm$ 4,49b	38,57 $\pm$ 5,20a	30,18 $\pm$ 1,40b	28,34 $\pm$ 2,48b	32,16 $\pm$ 4,05b	0,0001

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

Quadro 2. Média $\pm$ desvio padrão do comprimento (cm) dos filhotes dos diferentes grupos experimentais

DIAS DE VIDA PÓS-NATAL	GI	GII	GIII	GIV	GV	P
Nascimento	5,79 $\pm$ 0,41b	6,47 $\pm$ 0,33a	5,22 $\pm$ 0,30b	5,18 $\pm$ 0,44b	6,17 $\pm$ 0,27ab	0,0001
7 dias	8,04 $\pm$ 0,62b	9,67 $\pm$ 0,42a	8,38 $\pm$ 0,57b	7,37 $\pm$ 0,61b	9,62 $\pm$ 0,79a	0,001
14 dias	11,80 $\pm$ 0,48b	12,82 $\pm$ 0,62a	11,58 $\pm$ 0,61b	11,08 $\pm$ 0,81b	12,20 $\pm$ 1,07a	0,004
20 dias	14,32 $\pm$ 1,01c	17,88 $\pm$ 0,77a	16,18 $\pm$ 0,38b	15,32 $\pm$ 1,07bc	16,73 $\pm$ 0,36b	0,002

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Anova one-way com post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$)

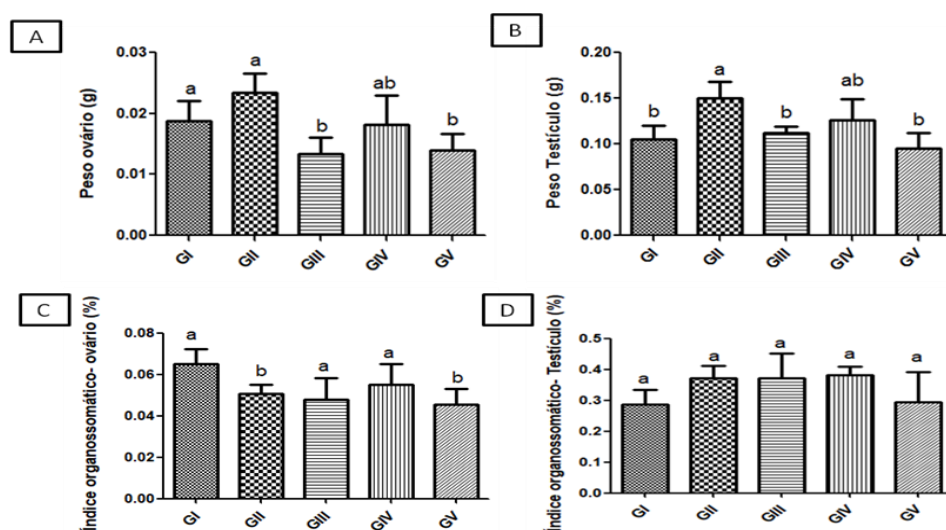
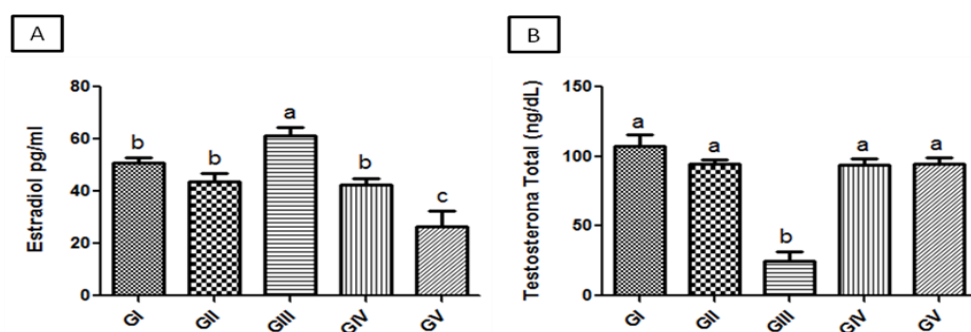
Fig.1.**Fig. 2.**

Fig. 3.

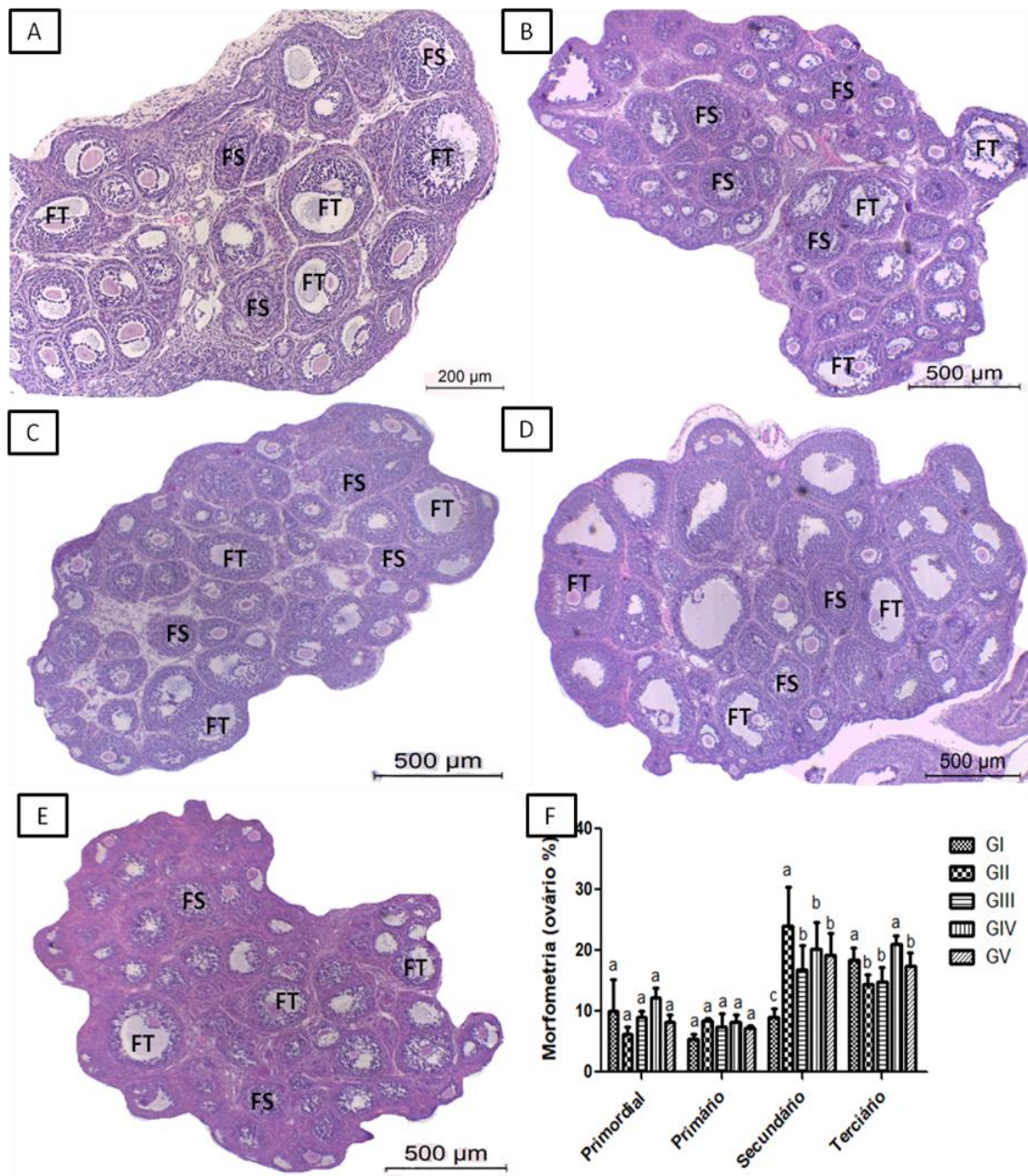


Fig. 4.

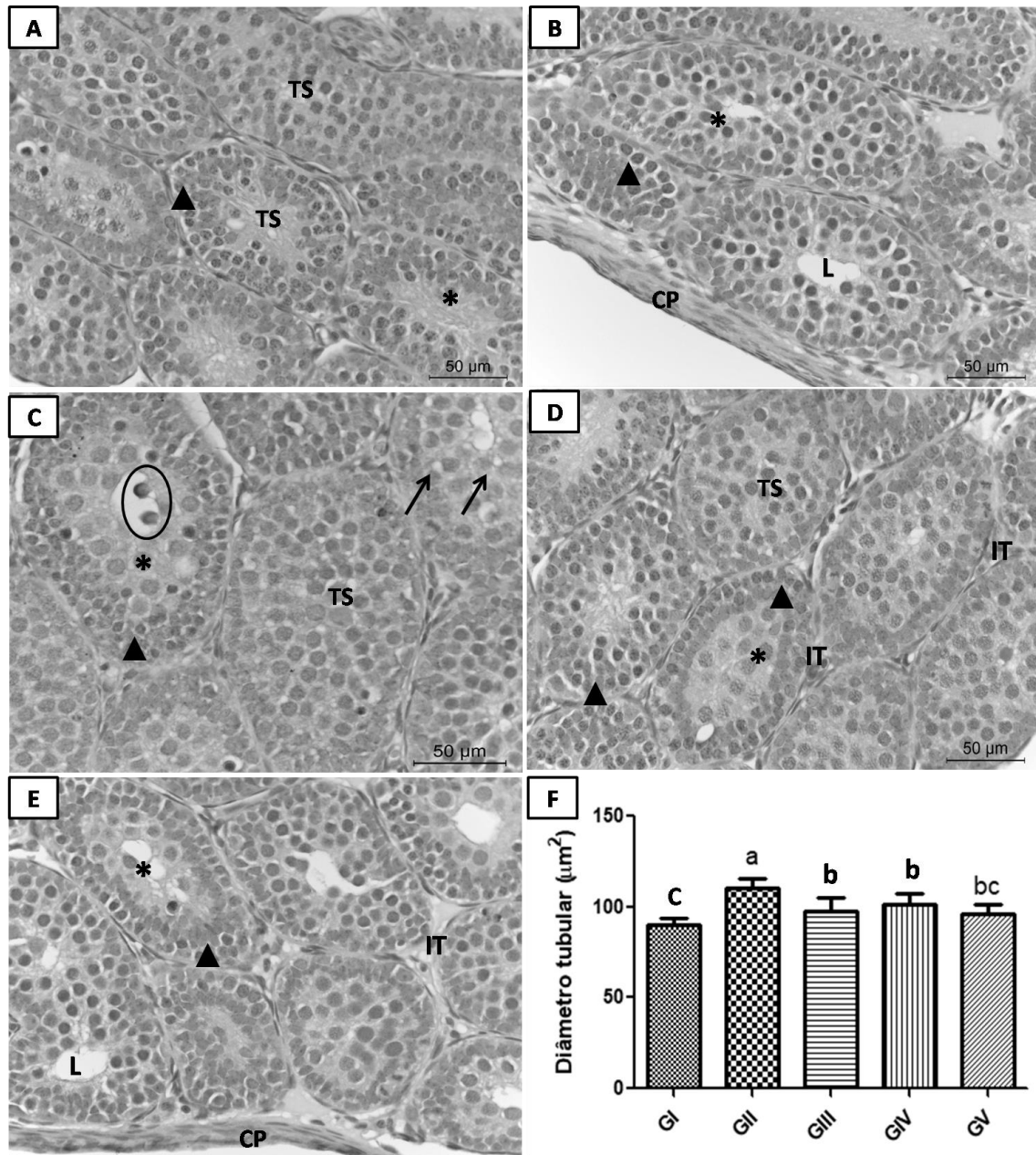


Fig.5.

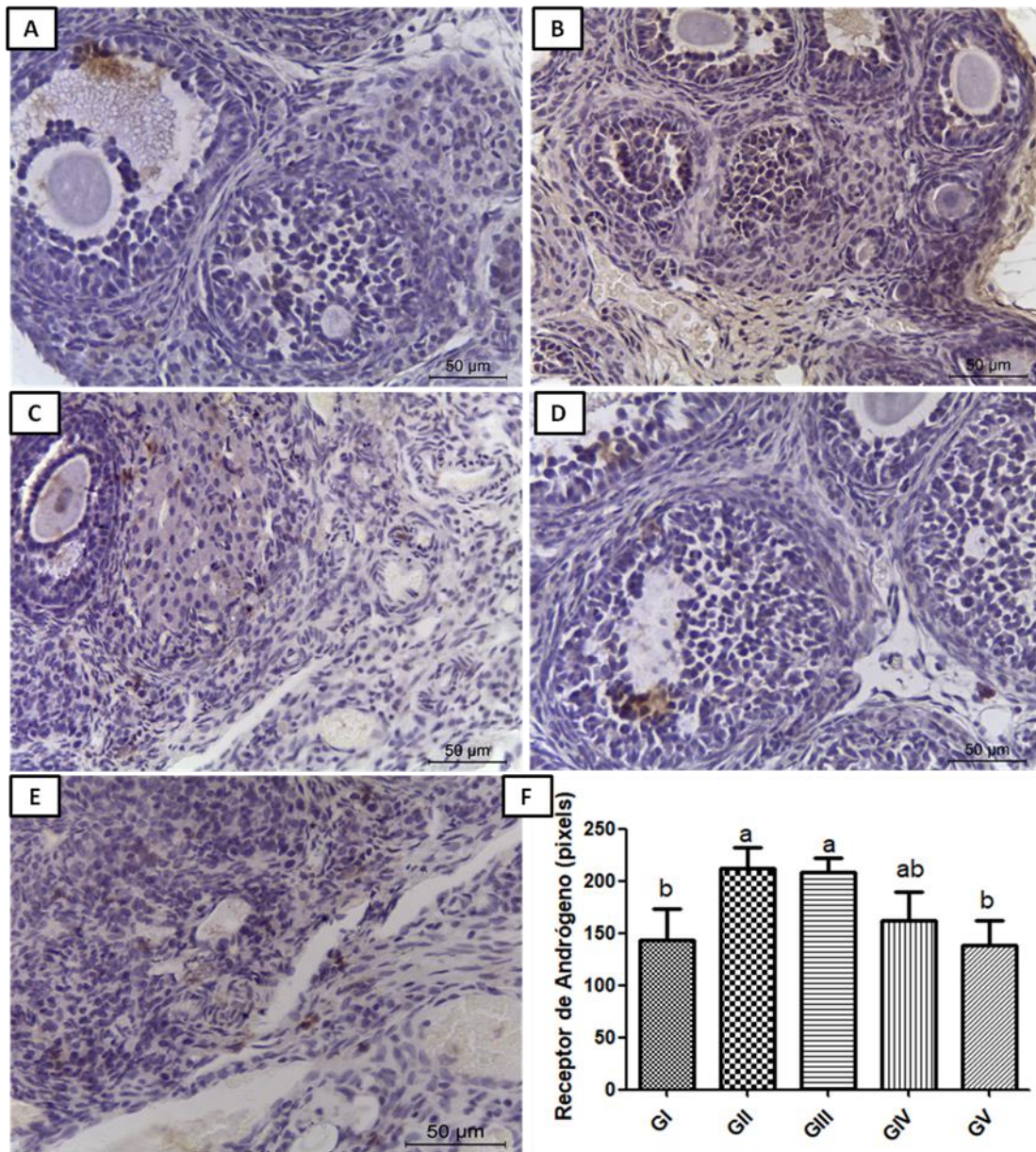


Fig.6.

