



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

Sandra Maria Souza da Silva

**Efeito de xenoestrógeno associado à melatonina sobre o
aparelho reprodutor de ratas adultas**

RECIFE

2013

Sandra Maria Souza da Silva

“Efeito de xenoestrógeno associada melatonina sobre o aparelho reprodutor de ratas adultas”

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Teixeira

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros

RECIFE

2013

SANDRA MARIA SOUZA DA SILVA

“Efeito de xenoestrógeno associado à melatonina sobre o aparelho reprodutor de ratas adultas”

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

Aprovada em de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) - UFRPE

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira–UFRPE

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros – UFPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que tive, por toda força, por tudo que tenho, pelas pessoas maravilhosas colocadas em meu caminho.

À professora Valéria Wanderley Teixeira pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a realização de mais um sonho.

Ao Professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por sempre estar por perto, tirando minhas dúvidas, me orientando e ajudando na construção dessa defesa.

Ao professor Anísio Francisco Soares e a professora Paloma Liz de Medeiros pela parceria e disponibilidade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Histologia da UFRPE, aos amigos do Laboratório de Histologia da UFPE e aos colegas de trabalho da unidade de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas HC-UFPE. Obrigada por toda ajuda dada diariamente e por toda amizade construída e fortalecida durante esse período todos esses anos.

Ao professor Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE.

A todos os funcionários e técnicos que fazem o Departamento de Morfologia da UFRPE.

Principalmente aos meus familiares, pai, mãe, irmãos, minha pequena filha Júlia e meu marido José Maria Rocha Carvalho que sempre me ensinaram que acreditar em nossos sonhos é permanecer vivo. A todos muito obrigada!

RESUMO

RESUMO O cloridrato de cimetidina, um bloqueador de receptores H₂ das células parietais gástricas, que age reduzindo a secreção de ácido no estômago, tem sido estudado como substância xenoestrogênica. O uso crônico da cimetidina produz distúrbios hormonais e toxicidade no aparelho reprodutor masculino, além de reduzir o estradiol 2-hidroxilado e aumentar níveis séricos de estradiol e prolactina em mulheres levando a hiperprolactinemia, que pode ser fator de risco para o câncer. A melatonina um neurohormônio, sintetizado pela glândula pineal tem importante papel na função reprodutiva, regulando a produção de estrógeno, progesterona e prolactina. Na referida pesquisa testou-se a hipótese de que a melatonina pode bloquear ou reduzir os efeitos estrogênicos da cimetidina sobre o estroma uterino interferindo nos receptores de estrógeno, no teor de fibras colágenas e nos níveis hormonais (estrógeno, progesterona e prolactina) em ratas adultas. Utilizou-se 45 ratas albinas, pesando entre 167 a 284g, foram distribuídas de forma aleatória em três grupos experimentais: i) ratas tratadas com placebo (controle); ii) ratas tratadas com cimetidina (50mg/kg/animal) e iii) ratas tratadas com cimetidina (50mg/kg/animal) associado à melatonina (200µg/100g/animal) por 7, 14 e 19 dias. Os resultados revelaram que a cimetidina permitiu marcações mais intensas de receptores de estrógenos nos animais tratados por 19 dias, além de ocasionar maior intensidade da distribuição de fibras colágenas no endométrio e maiores níveis séricos de estradiol e prolactina e redução da progesterona, enquanto que a melatonina associada à cimetidina bloqueou

esses efeitos. Assim, conclui-se que a melatonina apresenta atividade citoprotetora aos efeitos da cimetidina no estroma endometrial reduzindo ou impedindo o aumento na síntese de fibras colágenas pelos fibroblastos por regular a atividade de estradiol sérico, bem como a expressão dos seus receptores endometriais, além de manter os níveis normais de progesterona e prolactina.

Palavras-chave: Melatonina, receptor estrogênico, xenoestrógeno, útero, morfometria, níveis hormonais.

ABSTRACT

Cimetidine, a H₂ receptor blocker parietal cell acts as xenoestrogênica substance. Chronic use produces hormonal disorders and toxicity in the male reproductive system in addition to reducing the 2-hydroxylated estradiol and increase serum levels of estradiol and prolactin in women leading to hyperprolactinemia, which may be a risk factor for cancer. The neurohormone melatonin one synthesized by the pineal gland plays a key role in reproductive function by regulating the production of estrogen, progesterone and prolactin. The study tested the hypothesis that melatonin can block or reduce the estrogenic effects of cimetidine on the uterine stromal interfering with estrogen receptors in the content of collagen and hormonal levels (estrogen, progesterone and prolactin) in adult rats. We used 45 albino rats randomly divided into three experimental groups: I rats treated with placebo (control), II rats treated with cimetidine (50mg/kg/animal) and III rats treated with cimetidine (50mg/kg/animal) associated melatonin (200µg/100g/animal) for 7, 14 and 19 days. The results revealed that cimetidine has allowed more intensive markings of estrogen receptors in animals treated for 19 days, in addition to causing higher intensity distribution of collagen fibers in the endometrium and higher serum levels of estradiol and progesterone and reduce prolactin, whereas melatonin associated with blocking these effects cimetidine. Thus, it is concluded that melatonin has cytoprotective activity of cimetidine effects on endometrial stroma reducing or preventing the increase in collagen synthesis by fibroblasts by regulating the activity of serum estradiol as well as the expression of its receptors endometrial, while maintaining normal levels of progesterone and prolactin.

KEYWORDS: Melatonin, estrogen receptor, xenoestrógeno, uterus, morphometry, hormone levels

SUMÁRIO

Capítulos I

1	1.INTRODUÇÃO	10
.	2. REVISAO DE LITERATURA	13
	2.1. Xenoestrógeno	13
	2.2. Mecanismo de ação dos xenoestrógeno.	14
	.2.3. Hormônios estrogênicos	15
	2.4. Melatonina síntese e secreção	16
	2.5. Melatonina e reprodução	18
	2.6. Estroma endometrial	19
	2.7. Hormônios esteróides e seus receptores	20
	3. REFERENCIAS	22
2	Administração associativa da cimetidina e melatonina exógena sobre receptores endometriais de estrógeno, fibras colágenas e níveis hormonais em ratas.adultas	28
	Resumo.....	29
	Introdução.....	30
	Material e métodos.....	32
	Resultados.....	35
	Discussão.....	36
	Conclusão.....	38

Referências.....	38
Anexos-----	43

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Os xenobióticos são substâncias exógenas que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios. Essas substâncias químicas podem agir através de diferentes mecanismos, dependendo do período e extensão de exposição, modificando a estrutura do DNA e expressão gênica (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000). A maioria dos estudos com xenobióticos concentra-se na ação estrogênica de várias substâncias químicas de origem sintética, as quais de acordo com Stone (1994) são conhecidas como xenoestrógenos ou disruptores endógenos, xenobióticos com estrutura não esteróide e com ação similar a do estrogênio.

Pode-se caracterizar uma substância como estrogênica a partir de duas propriedades: afinidade pelo receptor de estrogênios (ER), demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo*, e pelo efeito trófico no trato reprodutivo feminino (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

A ideia de que a exposição de homens e animais a substâncias do meio ambiente com ação estrogênica poderia resultar em alterações adversas no desenvolvimento reprodutivo, funcional e/ou comportamental, não é nova. A primeira preocupação com este assunto surgiu há trinta anos, em relação ao DDT (o,p'-1,1,1-tricloro-2,2-bis-p-clorofeniletano). Ainda em 1938, foi feita a primeira demonstração de que alguns produtos químicos poderiam ter ação estrogênica quando administrados em animais (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

Na área médica, o uso de alguns tipos de medicamentos e produtos para esterilização de equipamentos cirúrgicos já são comprovadamente citados como interferentes endócrinos e oferecem risco a pacientes e profissionais da área (XELEGATI; ROBAZI, 2003). Os primeiros relatos de medicamentos xenoestrogênicos mostraram que o Dietilestilbestrol (DES), utilizado por mulheres para prevenir aborto espontâneo, entre os anos 50 e 70, apresentou

resultados desastrosos dentre eles o câncer da vagina e infertilidade nas filhas nascidas de mães que o usaram o DES (HERBST; BERN, 1988).

Segundo Roy; Colerangle; Singh (1998), a cimetidina é um fármaco que apresenta ação xenoestrogênica. Esse medicamento é usado para o tratamento de úlcera péptica e duodenal, atuando como bloqueador dos receptores de H₂ nas células parietais e inibindo acentuadamente a secreção ácida basal. Sendo assim, por reduzir a secreção ácida, esse medicamento reduz a dor, mas, uma desvantagem é que apresenta uma ação relativamente curta, o que torna necessária sua administração mais de uma vez ao dia durante a fase aguda da terapia (COOGAN et al., 2005; MINNEMAN, 2006).

Rzodkiewicz et al. (2010) mencionou que a cimetidina, como todos os anti-histaminicos conhecidos, pode afetar vários eventos inflamatórios, incluindo a quimiotaxia de eosinófilos, e a liberação de quimiocinas e citocinas.

Michnovicz; Galbraith (1991) e Nahas et al. (2006), relataram que o uso crônico de cimetidina em homens, pode está associado a efeitos colaterais como, hiperestrogenismo resultando em ginecomastia e hiperprolactinemia. A cimetidina também tem sido relatada como tóxica para a reprodução em ratos machos, os quais apresentam várias alterações morfológicas no trato reprodutivo, caracterizadas pelas alterações nas células mióides peritubulares e redução significativa do peso dos órgãos sexuais acessórios (FRANÇA et al., 2000; SASSO-CERRI; CERRI, 2008).

Durante a gestação a azia e o refluxo ácido, aumentam a severidade de náuseas e vômitos, podendo ocorrer o aparecimento de úlcera péptica, sendo normalmente tratados com os antagonistas dos receptores H₂ (RICHTER 2005; ALI; EGAN 2007). Estudos referentes à biodisponibilidade da cimetidina em mulheres grávidas indicaram que esta se distribui por todo o organismo, sendo de 15% a 20% associada a proteínas plasmáticas, atravessando a placenta e eliminada no leite materno, além disso, aumenta a incidência de partos prematuros (PALHARES; FIGUEIREDO; MOURA et al., 2005). Em ovelhas estudos relatam que a placenta aparentemente controla a taxa de transferência da cimetidina para a circulação fetal (MIHALY et al., 1983).

Foi demonstrado também que a cimetidina reduz o estradiol 2-hidroxilado e aumentaníveis séricos de 17 β -estradiol em mulheres (MICHNOVICZ; GALBRAITH, 1991), além de aumentar as concentrações séricas de prolactina

(PRL), levando a hiperprolactinemia, que pode ser fator de risco para o câncer de mama entre mulheres na pós-menopausa (HANKINSON et al., 1999).

A melatonina um neurohormônio, sintetizado pela glândula pineal, o qual é secretado ritmicamente, tem demonstrado papel chave na função reprodutiva tanto em animais sazonais como nos animais não sazonais, caracterizando-se pela regulação na produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade e crescimento ovariano (MAEKAWA et al., 2007).

Segundo, Lanoix et al. (2008), há evidências de que ocorra síntese e liberação de melatonina nos órgãos do trato gastrointestinal, nos rins, em células do sistema imune, no fígado e em algumas regiões do cérebro. A ritimicidade da produção circadiana da melatonina é captada via retina-hipotálamo em direção aos pinealócitos da pineal, sendo este hormônio uma indolamina lipofílica (LANOIX; OUELLETTE; VAILLANCOURT, 2006).

De acordo com Freeman et al. (2000) animais tratados com melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, apresentam uma diminuição do número de lactotrofos, redução do estradiol e conseqüente diminuição da secreção de PRL, tendo em vista que o estradiol é um hormônio que estimula a produção de PRL, pois regula a expressão do gene para PRL, bem como sua sensibilidade associada com os níveis de melatonina (CLOSE; FREEMAN 1997).

Experimentalmente a melatonina previne a promoção e o crescimento de tumores mamários induzidos espontânea ou quimicamente em roedores (MARTINEZ-CAMPA et al., 2005). Além disso, estudos sugerem que a melatonina teria influência no funcionamento do sistema genital, principalmente nas gônadas (FREEMAN et al., 2000; ADRIAENS et al., 2006; MAGANHIN et al., 2008). Sabendo-se que o estradiol medeia efeitos pró-reprodutivos, através de ações em vários órgãos do sistema reprodutor feminino (ovários, trompas, útero e na formação de placenta), bem como processos bioquímicos (ROSSELLI et al., 2000; DEROO; KORACH, 2006), estudos experimentais de reprodução referentes aos efeitos adversos provocados pela frequente exposição a substâncias xenoestrogênicas, têm sido realizados, reafirmando a importância e o nível constante de exposição no qual atualmente a população

mundial se encontra exposta (BROMER et al., 2010). Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da administração da cimetidina associada ou não à melatonina sobre o estroma endometrial em ratas adultas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Xenoestrógenos

Nos últimos dez anos, têm sido publicados novos dados na literatura científica referente, a variados compostos químicos introduzidos no meio ambiente, capazes de alterar o equilíbrio hormonal. (LONG et al., 2000; ALVES et al., 2007). Foi a partir dos anos quarenta quando começou a produção em massa e liberação no ambiente de muitos destes resíduos químicos, que o homem e seu ambiente tornaram-se facilmente expostos a esses produtos, tanto a partir do momento do fabrico, quanto através do processo de distribuição, uso e degradação final (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000; CHIGHIZOLA; MERONI, 2012).

Dentre os vários resíduos produzidos, destacamos os com atividade xenoestrogênicas, dentre os quais: hormônios presentes em cosméticos, anabolizantes utilizados em rações animais, fitoestrógenos, medicamentos e poluentes orgânicos (DEGEN et al., 2002; PELIS et al., 2007). Coilleet al. (2002), de forma similar, classificam os perturbadores endócrinos em quatro tipos: estrogênios naturais (ex. estrona, estradiol, estriol); estrogênios sintéticos (ex. fármacos); fitoestrogênios; xenoestrogênios (ex. químicos industriais como, bisfenol A, pnonilfenol e DDT).

Dentre estes estudos experimentais destacamos o do bisfenol - A, substância xenoestrogênica utilizada no fabrico de plásticos de policarbonato, que nos grupos analisados, revelaram modificações epigenéticas, promovendo alterações fenotípicas nos animais estudados (BROMER et al., 2010). Quando testados experimentalmente através de ensaios biológicos eles também são causa de preocupação, devido á sua persistência no meio ambiente e resistência à ação de detergentes químicos e enzimáticos (TEILMANN et al., 2002).

2.2 Mecanismos de ação dos xenoestrógeno

Não existe um único mecanismo que explique a ação dos interferentes endócrinos. A diversidade química dessas substâncias, uma vez que eles pertencem a diferentes classes de compostos químicos, permite um mecanismo de ação variado (ALVES et al., 2007). Geralmente eles agem, interferindo no metabolismo e modificando toda funcionalidade hormonal através de sua ligação nos receptores específicos (KAMATA et al., 2009). Quando agem deste modo, regulam algumas funções celulares através do tecido dependente de estrógeno, modificando muitos genes através de interação direta com uma resposta estrogênica além de ativar mecanismos de ação genéticos promovendo interações atuando como ligante ativado para fatores de transcrição (JORDAN; MURPHY 1990).

A função reprodutiva em roedores expostos a componentes xenoestrogênicos apresentaram avanço no desenvolvimento da fase de puberdade, bem como alterações no desenvolvimento reprodutivo (Bromer et al., 2010). Embora o risco potencial para a saúde humana da exposição a substâncias xenoestrogênicas não seja conclusiva, informações significativas referentes à ação dessas substâncias tem contribuído para melhor compreender o comportamento e ação desses disruptores orgânicos (DEGEN et al., 2002; BROMER et al., 2010; RAMIREZ et al., 2012).

A literatura relata que a Cimetidina, um antihistaminico bloqueador de H₂ nas células parietais gástricas, pode agir de forma semelhante ao estrógeno. Este fármaco sofre biotransformação pelas enzimas hepáticas porém, 48% da dose de cimetidina é eliminada de forma inalterada por via renal (BOHMER et al., 2011). Quando administrado de forma concomitante com fármacos como a metilformina e glibenclamida, interferem nos mecanismos de absorção destas drogas, sendo necessário desenvolver meios de monitoramento para essas substâncias (ARAYNE et al., 2010). A cimetidina é um fármaco que tem afinidade pelos receptores de estrógenos, funcionando de forma semelhante aos mesmos. Desta forma, a competição pelos sítios específicos de ligação criada provoca alterações hormonais nos órgãos reprodutivos masculinos,

como redução significativa na população de células de tecido epididimal e diminuição da motilidade espermática (SINHA; BANERJEE; GANGULY 2006).

Em ratos adultos, a investigação do papel das células de Sertoli na conversão da testosterona em estrógeno, via citocromo p-450, uma enzima aromatase tem sido investigada nas células germinativas de ratos não tratados e tratados com cimetidina (SASSO-CERRI, 2009). Assim, esse fármaco tem mostrado ser um agente antiandrogênico, competindo pelos respectivos receptores (TAKESHI; KAI; SUITA, 2002).

2.3 Hormônios estrogênicos

Hormônios são moléculas secretadas na corrente sanguínea, que apresenta efeito biológico geralmente em locais distantes do seu sítio de produção, promovendo crescimento, diferenciação e funcionalidade de diversos órgãos alvo(FRIEDRICH, 2003). Os efeitos dos hormônios nos órgãos alvos são decorrentes de suas ligações com os receptores intracelulares, modulando a expressão dos genes e, conseqüentemente, a síntese de proteínas específicas (RAMOES, et al. 2012; GRUBER, 2012).

Desta forma, Estrógenos,são hormônios sexuais femininos, que desempenham importantes funções principalmente nos ciclos ovarianos e endometriais, participando assim do desenvolvimento e da manutenção dociclo reprodutivo (LAZARI, et al., 2009).

A síntese de estrógenos ocorre após a ligação do colesterol a receptores lipoprotéicos, visto que o colesterol é capturado por células esteroidogênicas e levado aos sítios de síntese de esteróides. (GRUBER, et al, 2002).

Os diferentes hormônios esteróides são formados pela clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol - reduzindo o número dos átomos de carbono de 27 para 18, que ocorre nas mitocôndrias de tecidos formadores de hormônios esteróides (WANG, et al, 2012).

Uma atitude importante na produção de esteróides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna mitocondrial (RAMOS, et al, 2012).Assim, Todas as reações de hidroxilação e oxigenação que ocorrem durante a biossíntese de esteróides, são catalisadas por oxidases de função-

mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ para a síntese destes hormônios (FRIEDRICH, 2003).

Desta forma, surgem diferentes tipos de estrógenos endógenos, como por exemplo o 17 β-estradiol, a estrona e oestriol, que são esteróides com 18 átomos de carbono, derivados do colesterol e sintetizados nos ovários, testículos e glândulas adrenais (Gruber et al, 2002). Embora a estrona e oestriol, dois metabolitos E₂, liguem-se a receptores estrogênicos (ESRs) com alta afinidade, são agonistas mais fracos em comparação ao hormônio esteróide 17 β-estradiol.

Ademais, o estrógeno promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral alta (TGF-alfa) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), além disso, inibe o fator de crescimento tumoral β (TGF-β), e também estimula o crescimento ductal possibilitando desta forma o aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um fator-chave para a angiogênese (RAMOS, et al., 2012).

Além disso, estes exercem uma grande variedade de efeitos biológicos, nos sistemas cardiovascular, músculo-esquelético, imunológico, nervoso e central (LAZARI, et al., 2009; MAGANHIN, et al, 2008; RIOS, et al, 2009).

2.4 Melatonina: síntese e secreção

A melatonina é conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, que é um composto orgânico, de coloração amarelo-claro, altamente lipossolúvel e é transportada no plasma, principalmente ligada a proteínas, em especial, à albumina (MAGANHIN et al., 2008). É sintetizada a partir do triptofano pelos pinealócitos e imediatamente secretada (PEKELMAN et al., 2003). O estímulo para a síntese de melatonina depende de uma via neural que começa nas células ganglionares da retina, e projetam-se para o hipotálamo principalmente para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Os neurônios dos NSQ projetam-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPVH), ou seja, o estímulo neural responsável pela síntese de melatonina origina-se no NPVH enquanto que os NSQ são os responsáveis pela sincronização da síntese de melatonina ao ciclo claro escuro ambiental (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 1999).

Os pinealócitos captam o triptofano do sangue ao mesmo tempo em que a noradrenalina interage com receptores adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos e desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares. O triptofano é convertido para serotonina através da hidroxilação via triptofano 5- hidroxilase e descarboxilação via aminoácido aromático descarboxilase. A serotonina é então convertida em N-acetilserotonina pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase. Por fim, a N-acetilserotonina é metilada para a forma de melatonina pela enzima hidrox-indole-O-metil transferase (TAMURA, 2009)

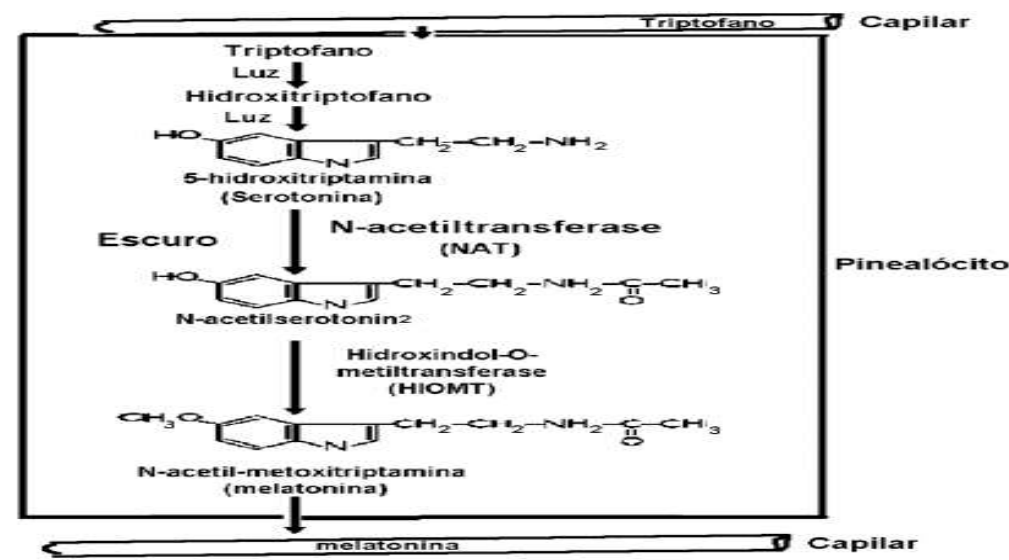


Figura 1. Biossíntese da melatonina. A síntese da Hidroxitriptamina a partir do triptofano é estimulada pela luz, no entanto a atividade da enzima N-acetil-transferase (NAT) é estimulada pelo escuro. Fonte: (MAGALHIN et al., 2008).

A melatonina age através dos seus receptores específicos: MT1, MT2, MT3, contudo, alguns autores questionam se este último receptor (MT3) existiria ou seria uma enzima (redutasequinona - 2), (DUBOCOVICH et al., 2003). Quando a melatonina reage com o peroxinitrito (ONOO^-) forma o metabólito 6-hidroximelatonina que manifesta uma atividade antioxidante superior em determinados modelos *in vitro* (BLANCHARD; POMPOM; DUCROCQ, 2000). Além disso, estímulos ambientais exercem efeitos

importantes na expressão de ritmos endógenos (MARKUS et al., 2003). Assim, a melatonina influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite, a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corporal cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado. Com isso parece ser capaz de aumentar atividade e mobilidade das células de defesa, estimular a formação de anticorpos e facilitar a defesa contra microrganismos (MAGANHIN et al., 2008).

Também já foi demonstrado, que a glândula pineal interfere na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, um importante modulador do metabolismo de carboidratos. Ratos pinealectomizados apresentam um aumento na corticosterona plasmática ao longo do dia, o que pode estar envolvido na alteração da sensibilidade tecidual à insulina e, conseqüentemente, no metabolismo de carboidratos (SERAPHIM et al., 2000).

2.5 Melatonina e reprodução

A pineal é amplamente aceita como a glândula reguladora da reprodução em mamíferos. Sua capacidade de influenciar a função gonadal em ratas tem sido avaliada pelos níveis de melatonina, os quais variam de acordo com o ciclo estral no animal (MAGANHIN et al., 2008).

Sua ação no sistema reprodutor é mediada por receptores no hipotálamo que podem alterar a secreção dos pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez, controla a secreção das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) pela hipófise. Através da estimulação do FSH e do LH, as células granulosa-luteínicas passam a secretar progesterona e estrogênio, hormônios necessários para a manutenção do endométrio no decorrer da gestação. (DAIR et al., 2008).

Nos mamíferos a melatonina tem mostrado um papel chave na função reprodutiva tanto em animais sazonais como nos não sazonais, caracterizando-se pela regulação na produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade funcional e crescimento ovariano, redução do estresse oxidativo em folículos ovarianos e diminuição de

gonadotrofinas (GnRH) que regulam a concentração de FSH e LH (DEVOTO et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2002).

Essas modificações reprodutivas são devido a um complexo ritmo endógeno circanual impulsionado e sincronizado pela luz e pela melatonina, que controla a atividade pulsátil de neurônios GnRH no hipotálamo (CHEMINEAU et al, 2010). Desta forma, alterações nos níveis séricos de melatonina estão relacionadas com distúrbios da ovulação e alterações no estroma endometrial (TEIXEIRA et al., 2002; PRATA LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004).

2.6 Estroma endometrial

O útero dos roedores é composto por dois cornos longos que se unem formando um pequeno corpo uterino, que se continua com uma cérvix única que se projeta na vagina (SALGADO, 2009). O estroma endometrial é um tecido conjuntivo frouxo formado principalmente por fibroblastos e por uma rica matriz extracelular. Muitas das moléculas estruturais da matriz extracelular, bem como o colágeno, são proteínas que exercem diferentes funções biológicas (MYLLYHARRJU; KIVIRIKKO, 2004; RUEHL, 2005). Todos os colágenos têm em comum a molécula formada por tripla hélice de cadeias polipeptídicas denominadas α cadeias contendo domínios com repetições das sequências dos aminoácidos Glicina-Prolina-Hidroxprolina (RIBEIRO, 2011).

O conhecimento sobre o tecido conjuntivo tem progredido muito nos anos recentes, especialmente no que diz respeito à composição e potencialidades da sua matriz extracelular (ZILTON, 2005). Análises bioquímicas demonstraram que os colágenos do tipo I e II estão presentes no endométrio de ratas prenhes e que o colágeno tipo V é expresso após a decidualização (SPIESS; TEODORO; ZORN 2007).

Segundo, Gomes et al. (2007), a análise da camada endometrial, de camudongas sofre modificações morfológicas e bioquímicas sob a influência dos esteroides ovarianos durante o ciclo estral. Quando, por circunstâncias geradas por fatores inflamatórios, degenerativos ou neoplásicos, os estímulos para a fibrogênese superam aqueles da fibrólise, o tecido fibroso se acumula

em excesso, constituindo a fibrose (RICARD-BLUM; VILLE; GRIMAUD 1992; ZILTON, 2005).

2.7 Hormônios esteroides e seus receptores

Hormônios esteroides são moléculas regulatórias de natureza lipídica, que atuam através de seus receptores nucleares, ativando genes específicos nas células alvo. A atividade dos receptores de esteroides é dependente de ligante e os mesmos são encontrados classicamente no citossol e no núcleo das células. Foi a partir de 1896, quando George Beatson observou que mulheres portadoras de tumor de mama e submetidas à ovariectomia apresentavam redução do tumor (CUNHA et al., 2004).

Os receptores de esteroides conhecidos atualmente são receptores de estrógenos e progesterona, dois hormônios andrógenos, e glicocorticoides e mineralocorticoides, os quais compõem uma superfamília de genes com características estruturais e funcionais comuns (PRATT; TOFT, 1997).

Os receptores de estrógenos ER α e ER β , são produtos de dois genes distintos, denominados Esr1 e Esr2. Estes dois receptores apresentam alta homologia no domínio de ligação ao DNA interagindo no domínio de interação com o ligante (Fig.2), apesar de ambos apresentarem alta afinidade por estrogênios endógenos, como o estradiol e o estriol (HEWITT; KORACH, 2002). Ao ligar-se com o hormônio, estes receptores formam hetero ou monodímeros, que interagem com elementos específicos presentes na região promotora do gene alvo, chamado de elemento de resposta estrogênica (ERE) quando o alvo é o estrógeno (O`LONE et al., 2004).

A localização de receptores de estrógeno no útero de roedores já está bem documentada na literatura (HEWITT; KORACH, 2002). Estudos prévios mostraram que estes receptores são expressos nos epitélios luminal e glandular, no estroma endometrial e no miométrio, em diferentes espécies de mamíferos (ZORN et al., 2003).

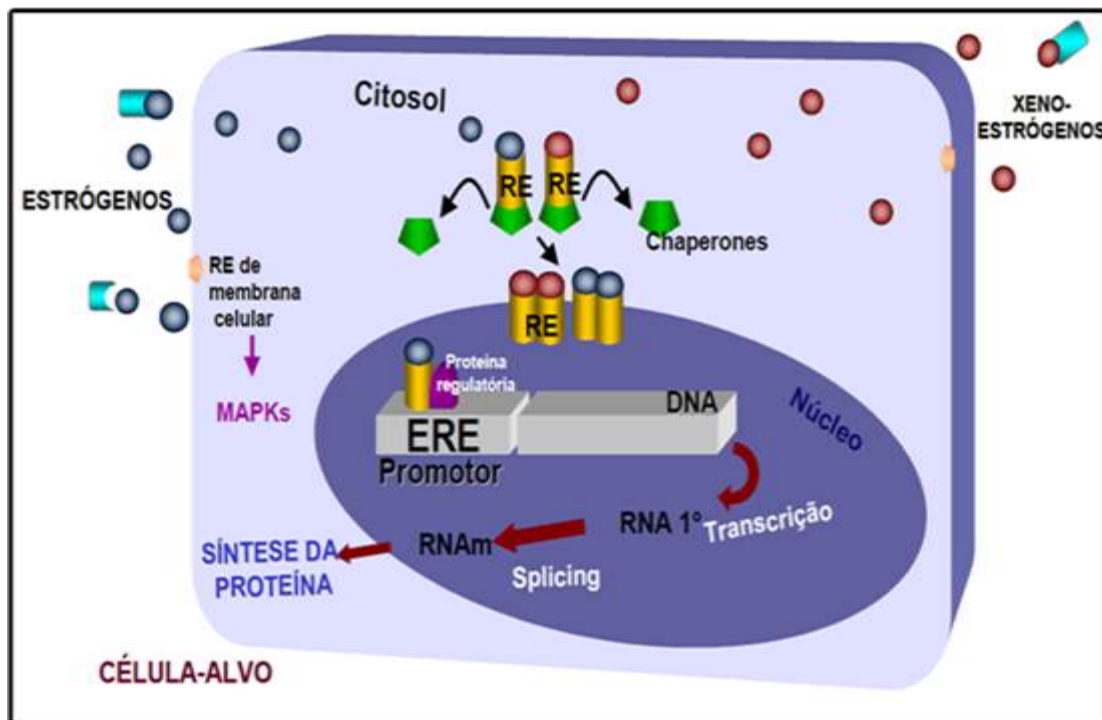


Figura 2. Estrutura de receptores estrogênicos a nível de membrana celular e nuclear e suas interações com a molécula estrogênica e substâncias xenoestrogênicas (FRIEDRICH., 2003).

Nas mamas várias evidências demonstram que os fatores de crescimento tais como o gene do tumor pituitário transformante (PTTG), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento de transformação $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de crescimento de transformação $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), e fator de crescimento transformante β receptor tipo II (TGF β RII) desempenham um papel importante na patogênese de prolactinomas induzidos pelo estrogênio (WANG et al.,2012).

3. REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, I; JACQUET, P; CORTVRINDT, R; JANSSEN, K; SMITZ, J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**. v. 228, n. 2-3, p. 333-343, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **The Cell**. 4 ed. 545p. New York:Garland Science, 2002.
- ALI, R; EGAN, L. Gastroesophageal reflux disease in pregnancy. **Best. Pract.Res. CL. GA**.v. 21, n. 5, p. 793-806, 2007.
- ALVES, C; FLORES, L.C; CERQUEIRA, T.S.; TORALLE, M.B. Environmental exposure to endocrine disruptors with estrogenic activity and the association with pubertal disorders in children. **Cad. Saúde.Pública**. v. 23, n. 5, p.1005-1014, 2007.
- ARAYNE, M.S.; SULTANA, N.; ZUBERI, M.H.; SIDDIQUI, F.A. Simultaneous determination of metformin, cimetidine, famotidine, and ranitidine in human serum and dosage formulations using HPLC with UV detection. **J. Chromatogr. Sci**. v. 48, n. 1, p. 721-725, 2010.
- BLANCHARD, B.; POMPOM, D.; DUCROCQ, C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. **J. P. Res**. v. 29, p. 184-192, 2000.
- BOHMER, G.M.; GLEITER, C.H.; MORIKE, K. NASSR, N.; Walz, A. ;LAHU, GEZIN.No dose adjustment on coadministration of the PDE4 Inhibitor oflumilast with a weak CYP3A, CYP1A2, and CYP2C19 inhibitor: An investigation using cimetidine. **J. Clin. Pharmacol**. v.51, p. 594, 2011.
- BROMER, J.G.; ZHOU, Y.; TAYLOR, M.B.; DOHERTY, L.; TAYLOR, H.S. Bisphenol-A exposure *in utero* leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. **FASEB**. v. 24, p. 2273-2280, 2010.
- CHEMINEAU, P.; BODIN, L.; MIGAUD, M.; THIERY, J.C.; MALPAUX, B. Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. **Reprod Domest Anim**. v. 45, p.42-49, 2010.
- CHIGHIZOLA C., MERONI P.L, The role of environmental estrogens and autoimmunity. **Autoimmun. Rev**.v 11, n 6-7, p. A493-A501,2012.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula Pineal. In AIRES MM (coord.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 805-811.
- CLOSE, F.T.; FREEMAN, M.E. Effects of ovarian steroid hormones on dopamine-controlled prolactin secretory responses in vitro. **Neuroendocrinology**. v. 65, p 430-435, 1997.
- COILLE, I.; REDER, S.; BUCHER, S.E.; GAUGLITZ, G. "Comparison of two fluorescence immunoassay methods for the detection of endocrine disrupting chemicals in water." **Biomol. Eng**. v. 18, n. 6, p.273-280, 1999.
- COOGAN, P.F.; ZHANG, Y.; PALMER, J.R.; STROM, B.L.; ROSENBERG, L. Cimetidine and other histamine2-receptor antagonist use in relation to risk of

breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** v. 14, n. 4, p. 1012-1015, 2005.

CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P.C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S.W.; WANHG, Y.Z.; DONJACOUR, A.A.; KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J. Ster. Biochem. Mol. Biol.** v. 92, n. 4, p. 221-236, 2004.

DAIR, EL, SIMÕES, R.S; SIMÕES , M.J.; ROMEU, L.R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M.A. Efeccts of melatonina on the endometrial morphology and embryo implantation in rats **Fertil. Steril.** v. 89, p. 1299-305, 2008.

DEGEN, G.H; JANNING, P.; DIEL, P.; BOLT, H.M. Estrogen isoflavones in rodent diets. **Toxicol. Lett.** v. 128, n. 1-3, p. 145-157, 2002.

DEROO, B.J.; KORACH, K.S. Estrogen receptors and human disease. **J. Clin. Invest.** v. 116, p. 561-570, 2006.

DEVOTO, L; KOHEN, P.; VEJA, M.; CASTRO, O.; GONZALEZ, R.R.; RITAMALES, I. Control of human luteal steroidogenesis. **Mol. Cell Endocrinol.** v. 186, n. 2, p.137-141, 2002.

DUBOCOVICH, L.; RIVIERA-BERMUDEZ, M.A.; GERLIN, M.J.; MASANA, M.I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian receptors. **Front. Biosci.**v. 8, n. 10, p. 1093-1108, 2003.

FRANÇA, L.R.; LEAL, M.C.; SASSO-CERRI, E.; VASCONCELOS, A.; DEBELJUK, L.; RUSSELL, L.D. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells.**Biol. Reprod.** v.63, p. 1403-1412, 2000.

FREEMAN, M.E.;KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion.**Physiol. Rev.** v. 80, p. 1523-1631, 2000.

FUJIMOTO, A.; OSUGA, Y.; FUJIWARA, T.; YANO, T.; TSUTSUMI O.; MOMOEDA, M. Human chorionic gonadotrophin combined with progesterone for luteal suport improves pregnancy rate in patients with low late midluteal estradiol levels in IVF cycles. **J. Assist. Reprod. Genetic.** v. 19, n. 12, p. 550-554, 2002.

GARBIS, H.; ELEFANT, E.; DIAV-CITRIN, O.; MASTROIACOVO, P.; SCHAEFER, C.; VIAL, T.; CLEMENTI, M.; VALTI, E.;MCELHATTON, P.; SMORLESI,C.; RODRIGUEZ, E.P.; ROBERT-GNANSIA, E.; MERLOB, P.; PEIKER, G.; PEXIEDER, T.; SCHUELER, L.; RITVANEN, A.; MATHIEU-NOLF, M. Pregnancy outcome after exposure to ranitidine and other H2-blockers: A collaborative study of the European Network of Teratology Information Services. **Reprod. Toxicol.**.. v. 19, n. 4, p. 453-458, 2005.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHENEEBERGER, C. & HUBER, J. C., 2002.Production and actions of estrogens.The New England Journal of Medicine, v. 346, n. 5, p. 340-352.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P.M.Xenoestrogênios: O exemplo do bisfenol-A. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**v. 44, n.4, p.323-330, 2000.

GOMES, R.C.T.; SIMÕES, R.S; JÚNIOR, J.M. S; NADER, H.B; SIMÕES, M.J.; BARACAT, E.C; Perfil de glicosaminoglicanos sulfatados no útero de

camudongas durante o ciclo estral. **Rev. Ass. Med. Bras.** v. 53, n. 3, p. 261-266, 2007

HANKINSON, S.E.; WILLETT, W.C.; MICHAUD, D.S.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; LONGCOPE, C.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. **J.Natl. Cancer Inst.** v. 91, p. 629-634, 1999.

HERBST, A.L.; BERN, H.A. Developmental effects of diethylstilbestrol (DES) in Pregnancy. New York: **Thieme-Stratton**. 203p, 1988.

HEWITT, S.C.; KORACH, K.S.; Estrogen receptors: structure, mechanisms, and function. **Rev. endocr. Metab. Discord.**v.3, n.3 p. 193, 2002.

JORDAN, V.C.; MURPHY, C.S. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. **Endocr. Rev.** v.1, p. 578–610, 1990.

KAMATA, R.F.; SHIRAISHI, I.T.; TAKAHASHI, S.; SHIMIZU A.; SHIRAISHI, H. Mechanisms of estrogen-induced effects in avian reproduction caused by transovarian application of a xenoestrogen, diethylstilbestrol. **Arch. Toxicol.** v. 83, n. 2, p. 161-71, 2009.

LANOIX, D., BEGHADADI, H.; LAFOND, J.; VAILLANCOURT, C. Human placental trophoblast synthesize melatonin and expression it's receptors. **J. Pineal Res.** v. 45, p. 50-60, 2008.

LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reprod.** v. 21, n. 8, p. 1981-1989, 2006.

LAZARI, M.F.M; LUCAS, T. F. G.; YASUHARA, F.; GOMES, G.R.O.; SIU, E. R.; ROYER, C.; FERNANDES, S. A. F.; PORTO, C. S. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.53 n.8 P. 923-933, 2009

LONG, X.; STEINMETZ, R.; BEN-JONATHAN, N. CAPERELL-GRANT, A.; YOUNG, P.C.; NEPHEW, K.P. BIGSBY, R.M. Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. **Environ. Health. Perspect.** v. 108, n. 3, p. 243-247, 2000.

MAEKAWA, R.; TAMURA, H.; TANIGUCHI, K.; TAKETANI, T.; SUGINO, A. Role and regulation of maternal melatonin during pregnancy in rats. **Biol. Reprod.** v. 77, p. 105-110, 2007.

MAGANHIN, C.C.; FERRAZ, A.A.C.; HALLEY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J. ; SIMÕES, R.S.; BARACAT, E.C.; SOARES, J.M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Rev.Assoc. Med. Bras.** v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008.

MARKUS R.P; AFECHE S.C; BARBOSA J.R EM; LOTUFO C.M.C.; FERREIRA ZS AND CIPOLA-NETO J. 2003. Glândula Pineal e Melatonina. In: MARQUES N AND MENNA-BARRETO L (Eds), Cronobiologia: princípios e aplicações, São Paulo: Edusp, São Paulo, Brasil, p. 191-222, 2003.

MARTINEZ-CAMPA, C; GONZALEZ, A.; MEDIAVILLA, M.D; ALONSO-GONZALEZ, C.; SANCHEZ-BARCELO, E.J. Melatonin enhances the inhibitory

effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. **Breast. Cancer Res. Treat.** v. 94, n. 3, p. 249-54, 2005.

MICHNOVICZ, J.J.; GALBRAITH, R.A. Cimetidine inhibits catechol estrogen metabolism in women. **Metabolism.** v. 40, n. 2, p. 170-174, 1991.

MIHALY, G.W.; JONES, D.B.; MORGAN, D.J.; CHING, M.S.; WEBSTER, L.K.; SMALLWOOD, R.A.; HARDY, K.J. Placental transfer and renal elimination of cimetidine in maternal and fetal sheep. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 227, n. 2, p. 441-445, 1983.

MINNEMAN, K.P.B. **Farmacologia Humana.** Ed. Elsevier, 4ª Edição, São Paulo, 800p. 2006.

MYLLYHARRJU, J.; KIVIRIKKO, K.L. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trens in Genetics.** v. 20, p. 33-43, 2004.

NAHAS, E.A.P.; NAHÁS-NETO, J.; PONTES, A.; DIAS, R.; FERNANDES, C.E. Estados hiperprolactinêmicos – inter-relações com o psiquismo. **Rev. Psiquiatr. Clín.** v. 33, n. 2, p. 68-73, 2006.

O' LONE, R.; FRITH, M.C.; KARISSON, E.K.; HANSEN, U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. **Mol. Endocrinol.** v. 18, n. 8, p. 1859-1875, 2004.

PALHARES, D.B.; FIGUEIREDO, C.S. M.; MOURA, A.J.C.M. **Medicamentos em neonatologia**, 1ª Edição, São Paulo: Atheneu, p.64-65, 2000.

PEKELMANN, R.M.; MONTAIN, E.J.; BARBOSA, J.; FERREIRA, Z.S. Ritmos biológicos; entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein.** v. 1, p. 143-148, 2003.

PELIS, R.M.; HARTMAN, R.C.; WRIHGT, S.H.; WUNZ, T.M.; GROVES, C.E. Influence of estrogen and xenoestrogens on basolateral uptake of tetraethylammonium by opossum kidney cells in culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 323, n. 2, p. 555-561, 2007.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, n. 7, p. 987-995, 2004.

PRATT, W.B.; TOFT, D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocr. Rev.** v. 18, n. 3, p. 306-360, 1997.

RAMOS, R.S.; AVANZIL, B.R.; VOLPATOL, R.; PIGNATON, W.; CASTANLL, E.P.; COSTALL, F.A.A.; LOPES, M.D. Expressão gênica dos RE α , RE β e PR em tumores mamários de cadelas por meio do q-PCR. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.64 n.6, p. 1471-1477, 2012.

RAMIREZ, M.C.; BOURGUIGNON, N.S.; BONAVENTURA, M.M.; LUX-LANTOS, V.; LIBERTUN, C.; BECU-VILLALOBOS, D. Neonatal xenoestrogen exposure alters growth hormone-dependent liver proteins and genes in adult female. **Toxicol. Lett.** v. 213 p. 325-331, 2012,.

RIBEIRO, R.F. Estabelecimento de um modelo de gestação complicada por diabetes tipos 1 em camundongos: avaliação do seu impacto sobre o ambiente

uterino no início da gestação, 49f. 2011. (Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo).

RICARD-BLUM, S.; VILLE, G.; GRIMAUD, J.A. Pyridinoline, a mature collagen cross-link, in fibrotic livers from schistosoma mansoni infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 47, p. 816-820, 1992.

RICHTER, J.: The management of heartburn in pregnancy. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 22, p. 749-757, 2005.

RIOS, A.O. A.B.; DUPRATLL, A.C.; SANTOS, A. R. Pesquisa de estrógeno e progesterona no epitélio das pregas vocais de mulheres por imunohistoquímica. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** v.74 n.4, P. 487-493, 2008

ROSSELLI, M.; REINHART, K.; IMTHURN, B.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental estrogens may influence the reproduction function. **Hum. Reprod.** v. 6, p. 332-350, 2000.

ROY, D.; COLERANGLE, J.B.; SINGH, K.P. Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability? **Front Biosci.** v. 3, p. 913-921, 1998.

RUEHL, M. The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. **J. Biol. Chem.** v.280, n. 5. p. 38537-38543, 2005.

RZODKIEWICZ, P.; WOJTECKA-LUKASIK, E.; SZUKIEWICZ, D.; SCHUNACK, W.; MASLINSKI, S. Antihistaminic drugs modify casein-induced inflammation in the rat. **Inflammation Res.** v. 59, p. 187-188, 2010.

SALGADO, R.M. Caracterização de proteoglicanos do útero de camundongos durante o ciclo estral em animais ovariectomizados: Análise dos efeitos da castração e da reposição hormonal. São Paulo, 2009. p. 43 (Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências).

SETIAN, N. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.53 n.1, p. 1-12, 2007.

SASSO-CERRI, E, Enhanced ERβ immunoreactivity and apoptosis in the germ cells of cimetidine-treated rats. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v. 7, p. 127, 2009.

SASSO-CERRI, E.; CERRI, P.S. Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v. 6, n. 18, p. 1-10, 2008.

SERAPHIM, P.M. SUMIDA, D.H., NISHIDE, F.T., LIMA, F.B. CIPOLLA-NETO, J, MACHADO, U.F. A Glândula Pineal e o Metabolismo de Carboidratos. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.44 n.4, p.31-38, 2000.

SINHA, R.B, BANERJEE, P.; GANGULY, A.K. Serum concentration of testosterone, epididymal mast cell population and histamine content in relation to sperm count and their motility in albino rats following H2 receptor blocker treatment. **Nepal. Med. Coll. Journal.** v. 8, n. 1, p.36-39, 2006.

SPIESS, K.; TEODORO, W.R.; ZORN, T.M. Distribution of collagen types I, II, III and V in pregnant mouse endometrium. **Connect. Tissue. Rev.** v. 48, n. 2 p. 99-108, 2007.

STONE. R. Environmental estrogens stir debate. **Science.** v. 265, p.308-310, 1994.

TAKESHI S.; KAI, H.; SUITA, S. Effects of the prenatal administration of cimetidine on testicular descent and genital differentiation in rats. **Surgery.** v. 131,p. S301-S305, 2002.

TAMURA, E.K. Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico in vitro e in vivo. 68f, 2009. (Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo)

TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, E.S.; TOPPARI, J. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human.**Best. Pract. Res. Clin Endocrinol. Metab.**v. 16, n 1, p. 105-121, 2002.

TEIXEIRA, C.A.A.; SIMÕES, M.J.; EVÊNCIO NETO, J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats.**Rev. Chil. Anat.** v. 20, n. 2, p.145-149, 2002.

WANG,C.; SU, Z.; SANAI, N.; XUE, X.; Lu, L.; CHEN,Y.; WU, J.; ZHENG,W.; ZHUG, Q.; WU, Z. microRNA expression profile and differentially-expressed genes in prolactinomas following bromocriptine treatment. **ONCOL. REP.** v. 27, n. 5, p.1312-1320, 2012.

XELEGATI, R.; ROBAZZI, M.L.C.C. Riscos químicos a que estão submetidos os trabalhadores de enfermagem: uma revisão de literatura. **ver. Latino-Am. Enfermagem.** v.11, n.3, p. 350-356, 2003.

ZILTON, A.A.Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.

ZORN, T.M.; SOTO-SUAZO, M.; PELEGRINI, C.R.; OLIVEIRA, J.G.; STUMPF W.E. E2 receptor binding to the epithelium of uterine lumem and glands: region- and time gland-related changes during preimplantation and periplantation periods studied by autoradiography. **Histochem. Cell Biol.** v. 120, n. 1, p. 1-12, 2003.

CAPÍTULO II

Efeito da administração associativa da cimetidina e melatonina exógena sobre receptores endometriais de estrógeno, fibras colágenas e níveis hormonais em ratas adultas

Sandra Maria Souza da Silva¹, Laíse de Souza Elias¹, Romildo Luciano da Silva²; Valéria Wanderley Teixeira^{1*}, Paloma Lys de Medeiros³, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira³, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

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

²Universidade Federal Pernambuco, Unidade de Anatomia Patológica (HC- UFPE).

³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia, Recife, Brasil.

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA, V)

RESUMO

A cimetidina, um bloqueador do receptor H₂ das células parietais gástricas pode agir como substância xenoestrogênica, produzindo distúrbios hormonais e toxicidade no aparelho reprodutor masculino e aumentando os níveis séricos de estradiol e prolactina em mulheres levando a hiperprolactinemia, que pode ser fator de risco para o câncer. A melatonina um neurohormônio sintetizado pela glândula pineal tem papel chave na função reprodutiva, regulando a produção de estrógeno, progesterona e prolactina. A pesquisa testou a hipótese de que a melatonina pode bloquear ou reduzir os efeitos estrogênicos da cimetidina sobre o estroma uterino interferindo nos receptores de estrógeno, no teor de fibras colágenas e níveis hormonais (estrógeno, progesterona e prolactina) em ratas adultas. Utilizou-se 45 ratas albinas distribuídas em três grupos: I ratas tratadas com placebo (controle); II ratas tratadas com cimetidina (50mg/kg) e III ratas tratadas com cimetidina (50mg/kg) associado à melatonina (200µg/100g). Os tratamentos foram realizados por 7, 14 e 19 dias. A cimetidina promoveu marcações mais intensas dos receptores RE α no útero dos animais tratados por 19 dias, maior intensidade na distribuição de fibras colágenas no endométrio, elevação dos níveis séricos de 17 β -estradiol e prolactina e redução da progesterona. A melatonina associada à cimetidina bloqueou esses efeitos. Assim, conclui-se que a melatonina apresenta atividade citoprotetora aos efeitos crônicos da cimetidina no estroma endometrial reduzindo ou impedindo o aumento na síntese de fibras colágenas pelos fibroblastos por regular a atividade de estradiol sérico, a expressão do receptor endometrial RE α e mantendo os níveis normais de progesterona e prolactina.

Palavras-chave: Melatonina, receptor estrogênico, xenoestrógeno, útero, morfometria, níveis hormonais.

1. Introdução

A cimetidina é um fármaco bloqueador de H₂ das células parietais gástricas, utilizado no tratamento da dispepsia, úlceras gástricas e duodenais, que não inibe apenas os efeitos estimulantes da histamina sobre a secreção de ácidos gástricos, mas também as ações de todos os outros estimulantes gástricos (Saiyn 2012). Estudos experimentais têm demonstrado afinidade da cimetidina pelos receptores de estrógenos RE α e RE β , agindo de forma semelhante aos mesmos, exercendo assim ação xenoestrogênica (Takeshi *et al.* 2002; Sinha *et al.* 2006). Esses dois subtipos de receptores apresentam padrões de expressão diferentes nos diversos órgãos (Kuiper *et al.* 1996), sendo o RE α com maior expressão no útero e testículo, e o RE β , na próstata e ovário (Mosselman *et al.* 1996).

Nahas *et al.* (2006), relataram que o uso crônico de cimetidina em homens, pode está associado a efeitos colaterais como, hiperestrogenismo resultando em ginecomastia e hiperprolactinemia. A cimetidina também tem sido relatada como tóxica para a reprodução em ratos machos, os quais apresentam várias alterações morfológicas no trato reprodutivo, caracterizadas pelas alterações nas células mioides peritubulares e redução significativa do peso dos órgãos sexuais acessórios (França *et al.*, 2000; Sasso-Cerri & Cerri 2008). Foi demonstrado também que a cimetidina aumenta níveis séricos de estradiol e prolactina (PRL) em mulheres (Michnovicz & Galbraith 1991) levando a hiperprolactinemia, que pode ser fator de risco para o câncer de mama na pós-menopausa (Hankinson *et al.* 1999).

A melatonina um neurohormônio, sintetizado pela glândula pineal, o qual é secretado ritmicamente, tem demonstrado papel chave na função reprodutiva tanto em animais sazonais como nos animais não sazonais, caracterizando-se pela regulação na

produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade e crescimento ovariano (Maekawa *et al.* 2007).

De acordo com Freeman *et al.* (2000) animais tratados com melatonina, apresentaram uma diminuição do número de lactótrofos, redução do estradiol e consequente diminuição da secreção de PRL, tendo em vista que o estradiol é um hormônio que estimula a produção de PRL, pois regula a expressão do gene para PRL, bem como sua sensibilidade associada com os níveis de melatonina (Close & Freeman 1997). Além disso, a melatonina influencia no funcionamento do sistema genital, principalmente nas gônadas e útero (Freeman *et al.* 2000; Teixeira *et al.* 2004; Adriaens *et al.* 2006; Maganhin *et al.* 2008).

Sabendo-se que o estradiol medeia efeitos pró-reprodutivos, através de ações em vários órgãos do sistema reprodutor feminino (ovários, trompas, útero e na formação de placenta), bem como processos bioquímicos (Rosselli *et al.* 2000; Deroo & Korach 2006), estudos experimentais de reprodução referentes aos efeitos adversos provocados pela frequente exposição a substâncias xenoestrogênicas, têm sido realizados, reafirmando a importância e o nível constante de exposição no qual atualmente a população mundial se encontra exposta (Bromer *et al.* 2010). Assim, a presente pesquisa testou a hipótese de que a melatonina pode bloquear ou reduzir os efeitos estrogênicos da cimetidina sobre o estroma uterino, interferindo na expressão do receptor RE α , no teor de fibras colágenas e níveis hormonais (estrógeno, progesterona e prolactina) em ratas adultas.

2. Material e Métodos

2.1 Animais experimentais

Foram utilizadas 45 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. As fêmeas foram mantidas em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. As fêmeas foram divididas em três grupos com 15 animais cada, e o tratamento realizado por 7, 14 e 19 dias.

Grupo I – Ratas tratadas com placebo (controle);

Grupo II – Ratas tratadas com cimetidina;

Grupo III – Ratas tratadas com cimetidina associada á melatonina.

Nas análises foram utilizados cinco animais por período de avaliação. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional da UFRPE, sob o n°. 23082022371/2011-46.

2.2 Administração da cimetidina

Foi administrada na dose de 50 mg/kg i.p. de cimetidina (Tagamet[®], SmithKline Beecham, Brasil) (Sasso-Cerri & Cerri 2008). O estabelecimento da dosagem selecionada, seguiu protocolo das medidas utilizadas em seres humanos, que variam de 400 mg/kg/dia, para o tratamento da hiperacidez, e 800 mg/kg/dia para o tratamento da úlcera aguda. Em ratos, essas dosagens são equivalentes a 35 mg/kg/dia e 70 mg/kg/dia, respectivamente. Assim, optamos por uma dose intermediária (50mg/Kg/dia) seguindo a metodologia proposta por França et al. (2000).

2.3 Administração da melatonina

A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada na dose de 200µg/100g de peso corporal do animal, por meio de injeções subcutânea no início da noite (18:00h), sendo dissolvida em etanol (0,02 mL) e diluída em 1 mL de NaCl 0.9% (Dair *et al.* 2008). Os animais do grupo controle receberam solução placebo de 1mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%).

2.4 Dosagens hormonais

Para avaliação dos níveis séricos de estradiol, progesterona e prolactina amostras de sangue foram coletadas nos períodos de 7, 14 e 19 dias através de punção da veia caudal, centrifugadas a uma temperatura de 4°C com a velocidade de 3000rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante congelado a -20°C até o momento das dosagens hormonais, pelo método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comercial (Teixeira *et al.* 2004). As amostras foram colhidas em triplicatas.

2.5 Estudo imunohistoquímico

As fêmeas foram anestesiadas nos respectivos períodos de avaliação, com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. Fragmentos do útero foram fixados em formol tamponado 10% e processados para inclusão em parafina. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10mM e pH 6,0, em camara úmida por 15 minutos a 98°C. Logo após foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase-Blocking Reagent - SM802) por 5 minutos, e a incubação em câmara úmida com o anticorpo primário monoclonal mouse Anti-Human estrogen Receptor α clone 1D5 (Dakocytomation – CA USA.) sem diluição, por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a incubação com anticorpo secundário ligado à peroxidase (Envision® Flex HRP – Dakocytomation – CA, USA. Cód SM805) durante 20 minutos, lavado em tampão

TRIS e revelado pelo DAB (3,3'-diaminobenzidina - Dakocytomation – CA USA. SM803) por dez minutos ao abrigo da luz. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina.

2.6 Estudo histomorfométrico

Cortes do útero corados pelo tricrômico de Masson foram utilizados para análise do colágeno. Imagens de quatro campos por lamina de cada animal foram capturadas e transferidas para programa histomorfométricos ImageJ® (versão 1,41 NIH, Bethesda, E.U.A.), regularmente calibrado, para a mensuração das áreas desejadas em micrômetro, pela delimitação dos contornos das regiões coradas, com o auxílio do mouse, avaliando-se desta forma o processo de deposição das fibras colágenas (Fig. 1A e 1B).

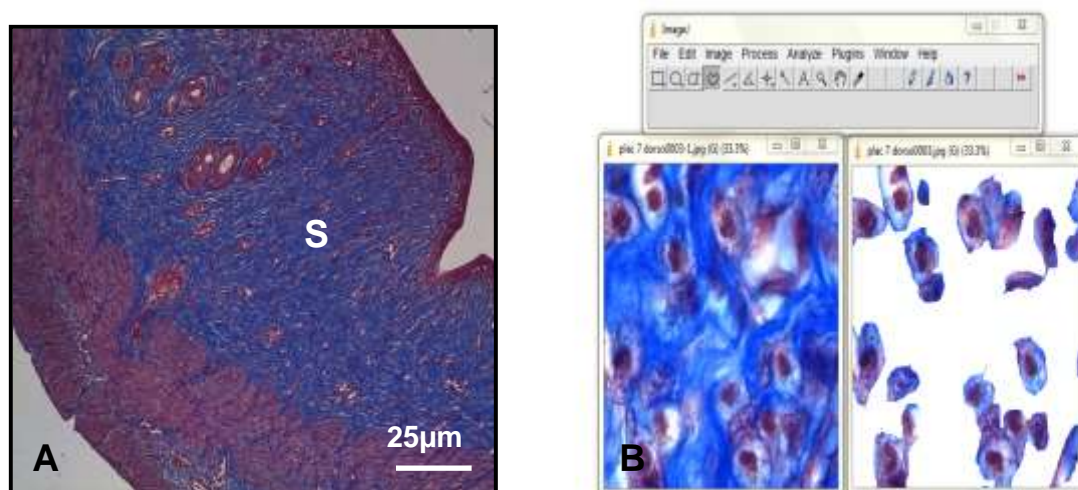


Figura 1. (A) Fotomicrografia do corte transversal de útero de rata adulta do grupo placebo. Região do estroma uterino (E), utilizada para mensuração de fibras colágenas. Coloração de Tricrômico de Masson. (B) Mensuração de área de fibras colágenas utilizando software ImageJ, com ferramenta de seleção de área estudada.

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos níveis séricos de estrógeno, progesterona e prolactina, e quantificação das fibras colágenas foi realizada por meio do método não-paramétrico de

Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1 Análise imunohistoquímica

As observações imunohistoquímicas do REα revelaram diferentes intensidades de marcação e concentração nas células ao longo do período de administração das substâncias nos grupos experimentais, com exceção do grupo controle, que se manteve uma regularidade de marcação nuclear no decorrer dos períodos de 7, 14 e 19 dias (Fig. 2 A-B; Fig. 3 A-B; Fig. 4 A-B). Quando comparadas as marcações nucleares nos grupos cimetidina e cimetidina associada à melatonina nos períodos de 7, 14 e 19 dias, essas amostras revelaram significativa diferença de marcação, de modo que no útero das que receberam cimetidina associada à melatonina houve maior concentração de células marcadas no período de 19 dias, porém, com menor intensidade (Fig. 4 E-F), quando comparado ao útero das ratas que receberam cimetidina (Fig. 4 C –D).

3.2. Estudo histomorfométrico de fibras colágenas

A análise histomorfométrica da distribuição de fibras colágenas no endométrio revelou maior concentração dessas fibras no estroma de ratas tratadas com cimetidina (Fig. 5 B, E e H) em relação ao estroma endometrial das ratas tratadas com placebo e a associação da cimetidina e melatonina (Fig. A, C, D, F, G e I). Entretanto, a análise estatística revelou uma maior quantidade de fibras colágenas no estroma endometrial de ratas tratadas com cimetidina nos períodos de 14 e 19 dias (Figs. 6, 7 e 8).

3.3. Níveis plasmáticos de estradiol, progesterona e prolactina.

As dosagens dos níveis séricos de estradiol e prolactina revelaram um aumento significativo desses hormônios nas ratas apenas no período de 19 dias de administração da cimetidina. Já a progesterona nesse mesmo período e grupo experimental apresentou

redução significativa. O tratamento associado manteve os níveis séricos desses hormônios similares aos apresentados pelas ratas tratadas com placebo em todos os períodos de avaliação (Tabelas 1, 2 e 3).

4. Discussão

Os resultados da imunohistoquímica revelou diferenciação na intensidade e positividade de marcação para receptores de estrógenos no estroma endometrial nas ratas dos grupos experimentais, sendo mais expressivas nos receptores nucleares das ratas dos grupos que receberam administração de cimetidina associada a melatonina no último período de avaliação. No entanto, embora os receptores RE α tenham apresentado-se com maior expressão no endométrio das ratas deste grupo, estes mostraram menor intensidade.

Os biomarcadores são comumente usados como indicadores bioquímicos, fisiológicos, e histológicos de exposição a xenobióticos ou de efeito de contaminantes químicos (Jesus & Carvalho 2008). Dessa forma, a presença e a intensidade da marcação nos receptores refletem, respectivamente, a positividade da célula e a concentração destes (Robinson *et al.*, 2010). De acordo com Martin *et al.* (2008) o aumento ou diminuição na concentração dos receptores endometriais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) está relacionado com a expressão do RNAm para esses receptores, sugerindo a existência de mecanismos de regulação dos RE e RP endometriais que envolvem os próprios hormônios, pois o aumento da concentração desses receptores ocorrem simultaneamente com a elevação da concentração plasmática e tecidual dos hormônios. Assim, a menor intensidade de marcação verificada no grupo que recebeu administração associada de cimetidina e melatonina, pode ser devido a ação anti-estrogênica da melatonina (Freeman *et al.* 2000), fato esse também confirmado, pelo aumento nas dosagens dos níveis séricos de 17 β -estradiol obtidos nos grupos

experimentais quando tratados exclusivamente com cimetidina. Desta forma, dados como estes, confirmam a capacidade de ativação estrogênica da cimetidina, que age alterando o padrão de síntese e secreção hormonal de estrógeno (17β -estradiol), e com isso, regulando o comportamento sexual e a função reprodutiva (Akingbemi *et al.* 2004; Bredfeldt *et al.* 2010).

A análise dos resultados referentes às concentrações plasmáticas de progesterona demonstram que a melatonina bloqueou o efeito da cimetidina por manter esse hormônio nos níveis similares aos dos animais do grupo controle, o que corrobora com os estudos realizados por Tamura *et al.* (2008) e Taketani *et al.* (2011) os quais relataram que a melatonina protege as células luteínicas da camada granulosa, aumentando a produção de progesterona no folículo durante a ovulação melhorando desta forma a taxa de fertilização. Além disso, o aumento nas dosagens plasmáticas de prolactina no grupo tratado com cimetidina confirma o papel estimulador do estrógeno (também elevado nos animais desse grupo), sobre a secreção de prolactina, que segundo Katayama & Fishman (1982) e Christin-Maitre *et al.* (2007); induz a hiperprolactinemia em ratos machos Wistar quando tratados por administração contínua de 17β -estradiol.

Sabe-se que a estrutura fibrilar do endométrio é controlada pelos hormônios sexuais (Oxlund *et al.* 2010). O 17β - estradiol age estimulando a síntese do RNAm para as fibras colágenas (sindecán-3), modelando o padrão de distribuição destas fibras (Myllyharrju & Kivirikko 2004; Oxlund *et al.* 2010; Silva *et al.* 2011). Assim, no presente estudo foi demonstrado a ação xenoestrogênica da cimetidina estimulando a sínteses de fibras colágenas no estroma endometrial nos períodos de 14 e 19 dias, enquanto a associação com a melatonina inibiu esse efeito. Sabe-se que os fibroblastos são estrógenos dependentes e que a melatonina pode ser um fator regulador na síntese de fibras colágenas sintetizadas pelos fibroblastos, tendo em vista que ratas

pinealectomizadas apresentam grande concentração de fibras colágenas no endométrio (Teixeira *et al.* 2002; Medeiros *et al.* 2003). Assim, conclui-se que a melatonina apresenta atividade citoprotetora aos efeitos da cimetidina no estroma endometrial reduzindo ou impedindo o aumento na síntese de fibras colágenas pelos fibroblastos por regular a atividade de estradiol sérico, bem como a expressão dos seus receptores endometriais, além de manter os níveis normais de progesterona e prolactina.

5. REFERÊNCIAS

Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K & Smits J 2006 Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* 228 333-343.

Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR & Hardy MP 2004 The inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145 592–603.

Bredfeldt TG, Greathouse KL, Safe SH, Hung MC, Bedford MT & Walker CL 2010 Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT. *Molecular Endocrinology* 24 993–1006.

Bromer JG, Zhou Y, Taylor MB, Doherty L & Taylor HS 2010 Bisphenol-A exposure *in utero* leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 2273-2280.

Christin-Maître S, Delemer B, Touraine P & Young J 2007 Prolactinoma and estrogens: pregnancy, contraception and hormonal replacement therapy. *Annales d'Endocrinologie* 73 497-556.

- Close FT & Freeman ME** 1997 Effects of ovarian steroid hormones on dopamine-controlled prolactin secretory responses in vitro. *Neuroendocrinology* 65 430-435.
- Dair EL, Simões RS, Simões MJ, Romeu LRG, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, Baracat EC & Soares-Junior JM** 2008 Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertility and Sterility* 89 1299-1305.
- Deroo BJ & Korach KS** 2006 Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116 561-570.
- Flutterm M, Dalm S & Oitzl MS** 2000 A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Laboratory Animals* 34 372-378.
- França LR, Leal MC, Sasso-Cerri E, Vasconcelos A, Debeljuk L & Russell LD** 2000 Cimetidine (Tagamet[®]) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biology of Reproduction* 63 1403-1412.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80 1523-1631.
- Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, Rosner B & Speizer FE** 1999 Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 91 629-634.
- Jesus TB & Carvalho CEV** 2008 Using biomarkers in fish to detect environmental contamination by mercury. *Oecologia Australis* 12 680-693.
- Katayama S & Fishman J** 1982 2-Hydroxyestrone suppresses and 2-methoxyestrone augments the preovulatory prolactin surge in the cycling rat. *Endocrinology* 110 1448-1450.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA** 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138 863-870.

- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA** 1996 Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 5925–5930.
- Maekawa R, Tamura H, Taniguchi K, Taketani T & Sugino A** 2007 Role and regulation of maternal melatonin during pregnancy in rats. *Biology of Reproduction* 77 105-110.
- Maganhin CC, Ferraz AAC, Halley JH, Fuchs LFP, Oliveira-Júnior IS, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC & Soares JM** 2008 Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira* 54 267-271.
- Martin I; Torres Neto R, Oba E, Buratini JJr, Binelli M, Laufer-Amorim R & Ferreira JC** 2008 Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. *Reproduction in Domestic Animal* 43 415-421.
- Medeiros JP, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, Baratella-Evencio L, Evencio Neto J** 2003 Análise ultra-estrutural do pinealectomia e falta de influência da luz sobre o colágeno no endométrio de ratos. *International Journal of Morphology* 21 231-235.
- Michnovicz JJ & Galbraith RA** 1991 Cimetidine inhibits catechol estrogen metabolism in women. *Metabolism Clinical and Experimental* 40 170-174.
- Mosselman S, Polman J & Dijkema R** 1996 ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392, 49–53.
- Mylyharrju J & Kivirikko KL** 2004 Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics* 20 33-43.
- Nahas EAP, Nahás-Neto J, Pontes A, Dias R & Fernandes CE** 2006 Estados hiperprolactinêmicos – inter-relações com o psiquismo. *Revista de Psiquiatria Clínica* 33 68-73.

- Oxlund BS, Ortoft G, Bruel A, Danielsen C, Bor P, Oxlund H & Uldbjerg N** 2010 Collagen concentration and biomechanical properties of samples from the lower uterine cervix in relation to age and parity in non-pregnant women. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 82-90.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE & Wathes DC** 2010 Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 122 965-979.
- Rosselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller PJ & Dubey RK** 2000 Cellular and biochemical mechanisms by which environmental estrogens may influence the reproduction function. *Human Reproduction* 6 332-350.
- Saiyn U** 2012 EPR analysis of gamma irradiated single crystal cimetidine. *Journal of Molecular Structure* 1031 132-137.
- Sasso-Cerri E & Cerri PS** 2008 Morphological evidences indicate that the interference of cimetidine on the peritubular components is responsible for detachment and apoptosis of Sertoli cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 6 1-10.
- Silva RD, Glazebrook MA, Campos VN & Vascocelos AC** 2011 Achilles tendinosis – a morphometrical study in a rat model. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 4 683-691.
- Sinha RB, Banerjee P & Ganguly AK** 2006 Serum concentration of testosterone, epididymal mast cell population and histamine content in relation to sperm count and their motility in albino rats following H₂ receptor blocker treatment. *Nepal Medical College Journal* 8 6-9.
- Takeshi S, Kai H & Suita S** 2002 Effects of the prenatal administration of cimetidine on testicular descent and genital differentiation in rats. *Surgery* 1 301-305.

Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Shimamura K, Reiter RJ, Sugino N 2011 Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *Journal Pineal Research* 51 207-213.

Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N 2008 Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal Pineal Research* 44 280-287.

Teixeira AAC, Simoes MJ, Evencio-Neto J & Wanderley-Teixeira V 2002 Morphologic aspects of endometrium in the estrus phase, of pinealectomized rats. *Revista Chilena de Anatomia* 20 145-159.

Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley-Teixeira V & Soares JMJr 2004 Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *International Journal of Morphology* 22 189-194.

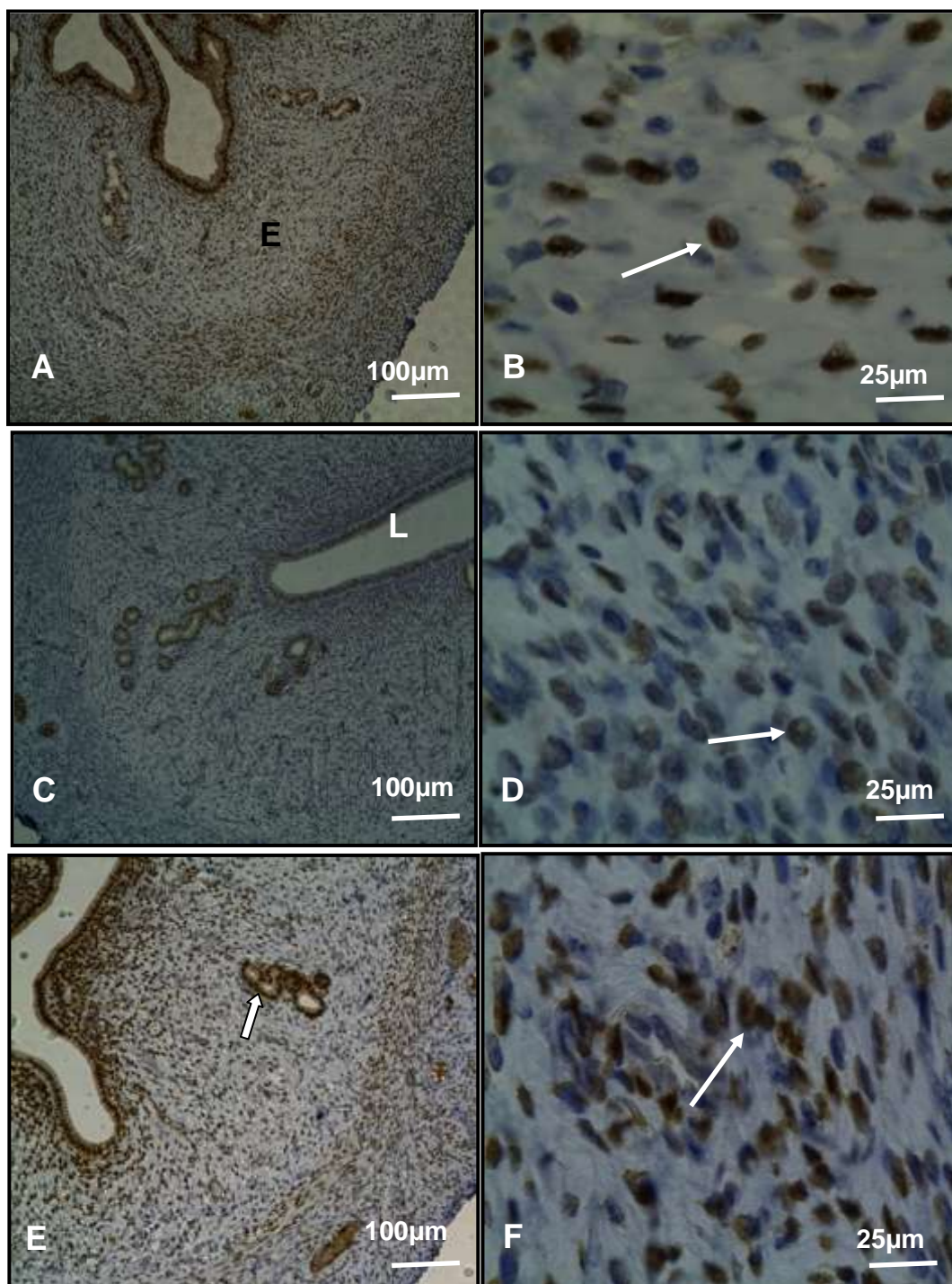


Figura 2. Fotomicrografia de imunomarcção de receptores endometriais de estrógeno em ratas adultas tratadas com placebo (A-B), cimetidina (C-D) e cimetidina associada à melatonina (E-F) por 7 dias. Estroma uterino (E); glândulas endometriais (seta); seta Longa - núcleos marcados positivamente, lúmen uterino (L). Contra corados com Hematoxilina de Harris.

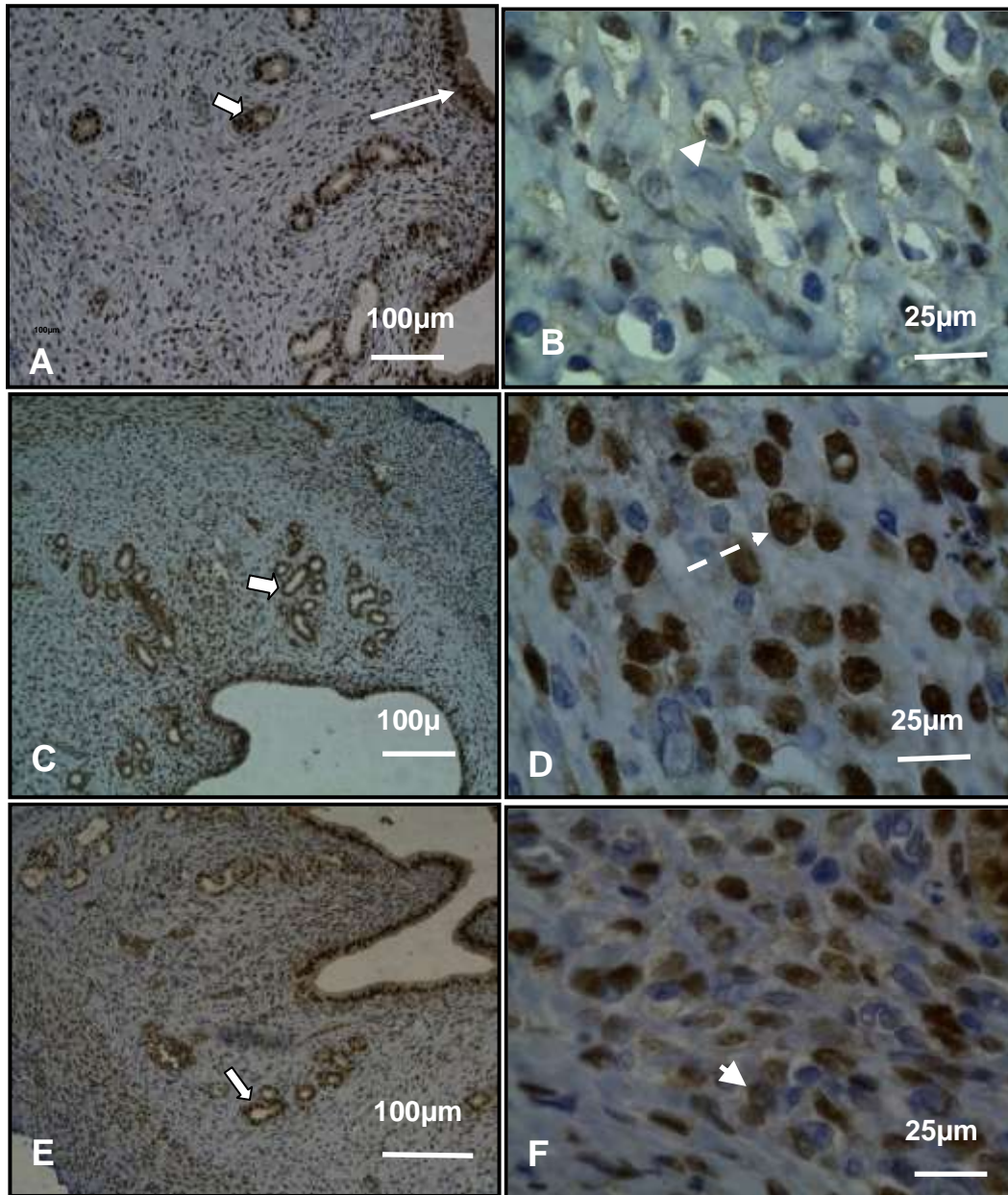


Figura 3. Imunomarcção de receptores endometriais de estrógeno em ratas adultas tratadas com placebo (A-B), cimetidina (C-D) e cimetidina associada à melatonina (E-F) por 14 dias. Glândulas endometriais marcadas positivamente (seta curta); marcação epitelial de receptores (seta longa), núcleos intensamente positivos (seta tracejada), núcleos marcados com menor intensidade (ponta de seta), contra corados por Hematoxilina de Harris.

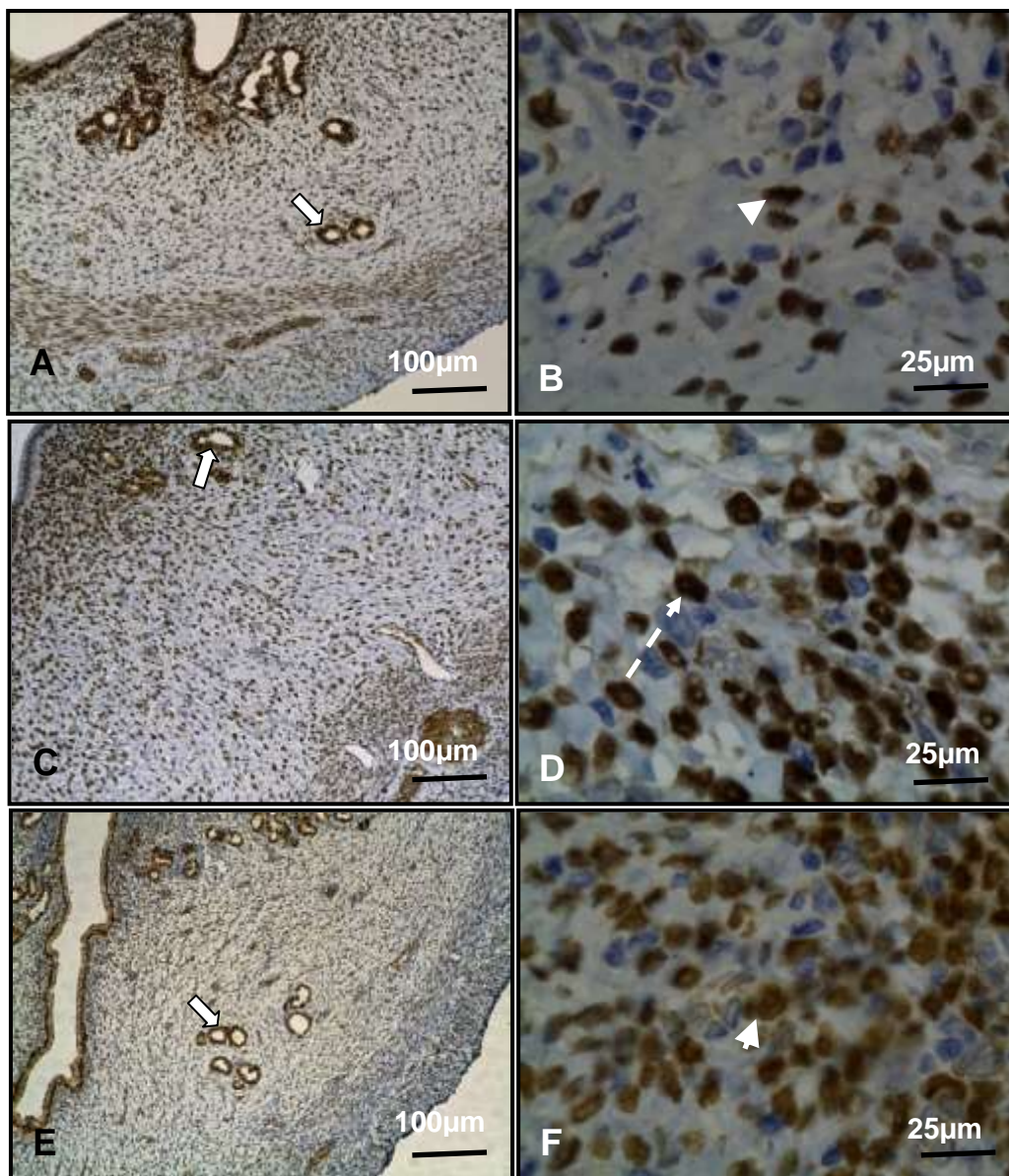


Figura 4. Fotomicrografia de imunomarcção de receptores endometriais de estrógeno em ratas adultas tratadas com placebo (A-B), cimetidina (C-D) e cimetidina associada à melatonina (E-F) por 19 dias. Glândulas endometriais marcadas positivamente (seta curta); marcação epitelial de receptores (seta longa), núcleos intensamente positivos (seta tracejada), núcleos marcados com menor intensidade (ponta de seta), contra corados por Hematoxilina de Harris.

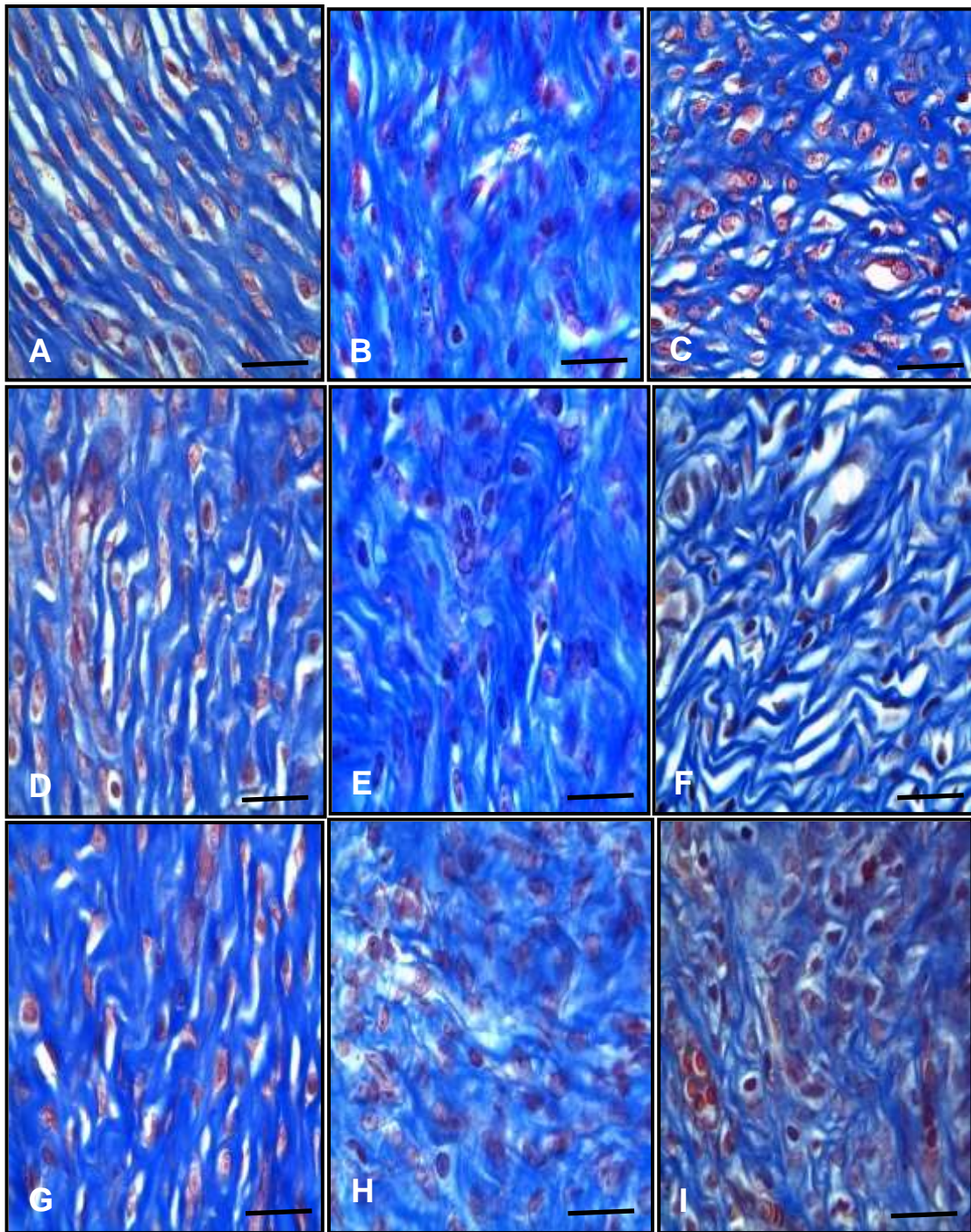


Figura 5. Fotomicrografia do estroma uterino de ratas adultas. Controle (A-D-G - 7, 14 e 19 dias respectivamente), cimetidina (B-E-H - 7, 14 e 19 dias respectivamente) e cimetidina associada à melatonina (C-F-I - 7, 14 e 19 dias respectivamente). Coloração de Tricrômico de Masson. Barras = 25 μ m.

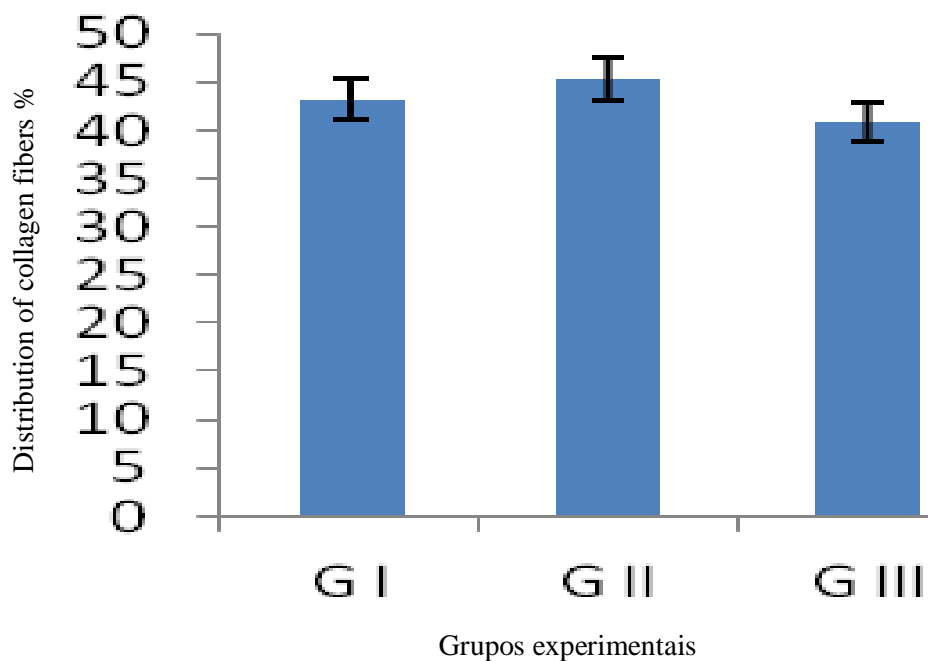


Figura 6. Distribuição de fibras colágenas no útero de ratas adultas tratadas com placebo, cimetidina e cimetidina associada à melatonina por 7 dias ($P=0.6808$).

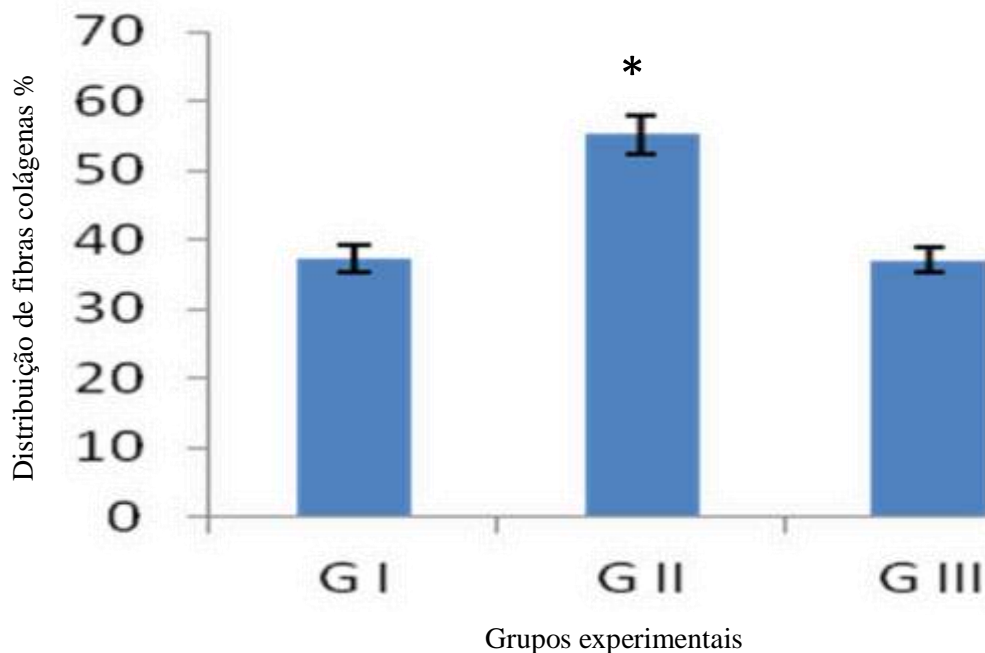


Figura 7. Distribuição de fibras colágenas (DFC) em útero de ratas adultas tratadas com placebo, cimetidina e cimetidina associada à melatonina durante 14 dias ($P= 0,0105$).

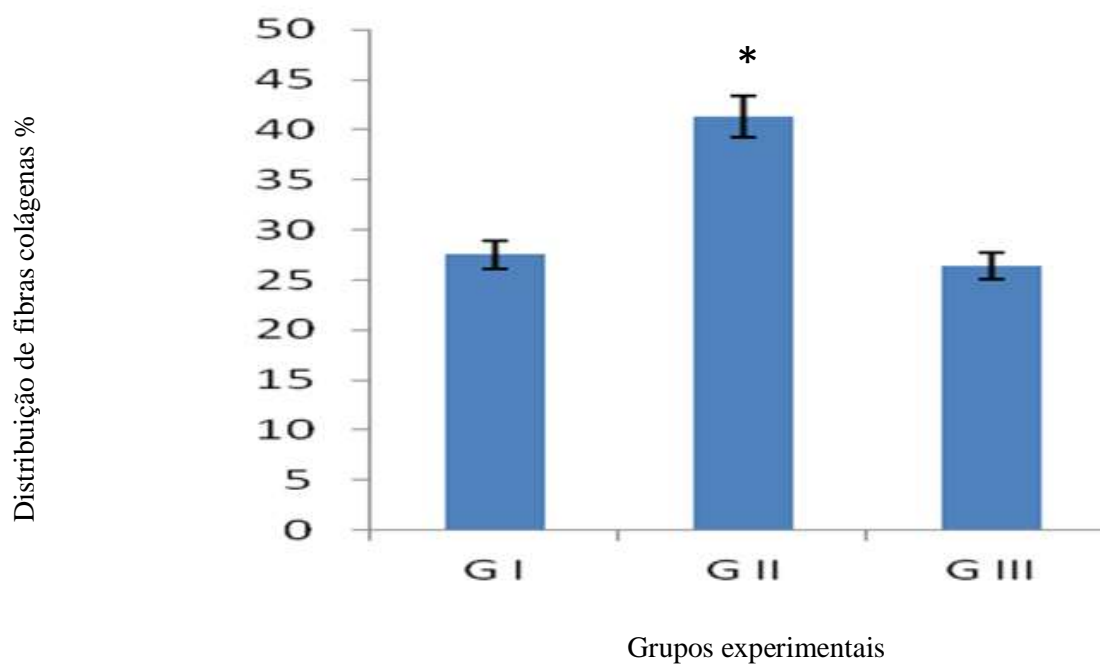


Fig. 8 - Distribuição de fibras colágenas em útero de ratas adultas tratadas com placebo, cimetidina e cimetidina associada à melatonina durante 19 dias (P=0,0052).

Tabela 1. Médias dos níveis séricos de estradiol (ng/mL) nas ratas dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	P
Estradiol				
7 Dias	414,66 ± 5,23a	407,88 ± 4,03a	410,34 ± 5,76a	0,0809
14 Dias	489,19 ± 7,55a	502,77 ± 6,21a	499,36 ± 5,93a	0,1055
19 Dias	482,79 ± 3,50a	519,66 ± 4,19b	477, 83 ± 6,29a	0,0304

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p > 0,05$).

Tabela 2. Médias dos níveis séricos de progesterona (ng/mL) nas ratas dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	P
Progesterona				
7 Dias	536,06 ± 6,82a	546,97 ± 9,20a	534,93 ± 9,53a	0,1472
14 Dias	550,20 ± 5,17 a	545,99 ± 2,75a	547,39 ± 3,02a	0,1024
19 Dias	563,37 ± 3,48a	515,38 ± 1,60b	564,36 ± 4,76a	0,0145

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p > 0,05$).

Tabela 3. Médias dos níveis séricos de prolactina (ng/mL) nas ratas dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	P
Prolactina				
7 Dias	2,07 ± 0,43a	2,13 ± 0,58a	2,08 ± 0,47a	0,9828
14 Dias	2,09 ± 0,30 a	2,23 ± 0,36a	2,04 ± 0,49a	0,7518
19 Dias	2,24 ± 0,54a	6,03 ± 0,71b	1,98 ± 0,43a	0,0021

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p > 0,05$).