



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

**Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos**

**Administração associativa do cloridrato de metformina e melatonina na  
reversão da policistose ovariana e os efeitos sobre o fígado e reprodução em  
ratas albinas**

**Recife**

**2013**

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

**ANA JANAINA JEANINE MARTINS DE LEMOS**

**“Administração associativa do cloridrato de metformina e melatonina na reversão da policistose ovariana e os efeitos sobre o fígado e reprodução em ratas albinas”**

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

**Orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Wanderley Teixeira**

**Co-orientadores:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Christina Alves Peixoto**

**RECIFE**

**2013**

Ficha catalográfica

L555r

Lemos, Ana Janaina Jeanine Martins de  
"Administração associativa da metformina e melatonina na reversão da policistose ovariana e os efeitos sobre o fígado e reprodução em ratas albinas" / Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos. -- 2012.  
93 f. : il.

Orientadora: Valéria Warderley-Teixeira.  
Tese (Doutorado em Biociência Animal) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia, Recife, 2010.  
Inclui referências e anexo.

1. Síndrome dos ovários policísticos 2. Melatonina  
3. Cloridrato de metformina 4. Fertilidade 5. Fígado 6. Estresse oxidativo .I  
Warderley-Teixeira, Valéria, orientadora II. Título

CDD 591.824

**ANA JANAINA JEANINE MARTINS DE LEMOS**

**“Administração associativa do cloridrato de metformina e melatonina na reversão da policistose ovariana e os efeitos sobre o fígado e reprodução em ratas albinas”**

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

Aprovada em 22 de outubro de 2013.

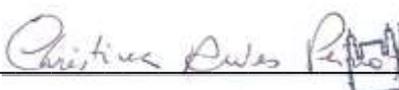
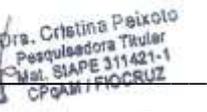
BANCA EXAMINADORA:

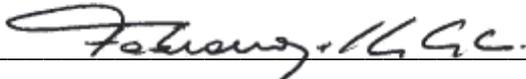
---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) - UFRPE**

---

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE**

  
  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christina Alves Peixoto – Fundação Oswaldo Cruz**

  
**Prof. Dr. Fabiano Sellos Costa - UFRPE**

---

**Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE**

## **AGRADECIMENTOS**

A realização desta etapa de minha vida profissional é uma vitória que foi alcançada com muito esforço e barreiras. Os amigos e familiares foram verdadeiras correntes que sustentaram os pilares necessários para construção da tese. Dentre os vários amigos, e perdoem-me os não citados, pois foram muitos, desejo agradecer primeiramente a Deus, pois nele depus minhas forças e mantive minha fé nos momentos mais difíceis. Agradeço a meus pais, ambos me fazem sentir muito amada, às vezes até paparicada com muito carinho, fico emocionada sempre que falo destas pessoas tão especiais, em especial minha mãe, Ana Cristina Lemos por estar sempre cobrando meu empenho e estimulando meu crescimento. Aos meus pais acadêmicos, Prof<sup>a</sup>. Valéria Teixeira e Prof. Álvaro Teixeira por serem de fato orientadores na minha vida tanto profissional quanto pessoal, vocês são amigos verdadeiros, do tipo que reclama e elogia de maneira justa, sempre pensando no nosso melhor. Serei eternamente agradecida, vocês são um exemplo para mim, eu amo muito vocês.

Agradeço aos amigos do laboratório, pois todos levaram junto comigo as atividades necessárias à elaboração do experimento, além de serem sempre companheiros e alegres. Nós somos uma super equipe! Alguns nomes dentre vários que posso citar são: Solange Bezerra, Cinthia Giselle Martins, Shimene Figueirôa, Hilda Santos, Eduardo Silva, Fernanda Tenório, Carolline Guimarães, Clóvis Lapa Neto e nossa agregada Cibele Alves, entre outros.

Nestes últimos anos do curso, fiz novas amizades e renovei algumas amizades antigas com meninas que também levaram junto comigo as atividades necessárias à elaboração dos artigos, todas as amigas do Aggeu Magalhães e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), como as amigas Rayana Leal, Sura Rocha, Gabrielle Oliveira, Wilma Oliveira, Karolina Nunes, Amanda Silva, entre outras. Além da responsável pela competência de todas estas amigas e a quem tive a honra de ter como co-orientadora, sempre disposta a ajudar, a sincera Prof<sup>a</sup> Christina Peixoto à qual tenho grande admiração e respeito, serei sempre agradecida.

À Pós-graduação, por proporcionar o desenvolvimento do curso e por apoiar todas as atividades desenvolvidas, também aos Professores e colegas da pós-graduação,

sempre dispostos a ajudar e aperfeiçoar as ideias prévias do Projeto enquanto desenvolvimento, também ao Reuni por auxiliar financeiramente minha manutenção no curso. Este recurso foi fundamental às atividades desenvolvidas ao longo destes anos.

À UFRPE, esta instituição é minha segunda casa, eu a frequento desde sempre e devo-lhe toda minha formação acadêmica. Nesta casa fui sempre bem recebida por todos e tive o prazer de participar de várias atividades que proporcionaram construir amizades que jamais serão esquecidas. Em destaque estão as Pró-reitorias de Atividade de Extensão e de Ensino de Graduação, bem como os Departamentos de Registro e Controle Acadêmico e de Morfologia e Fisiologia Animal.

Agradeço ao nosso bioterista e querido amigo Marcos André, por ser sempre muito dedicado a manutenção dos animais e preocupando-se com nossas atividades, seu apoio é fundamental.

Aos meus irmãos e sobrinhos, minhas paixões, vocês são as alegrias da minha vida. E por último, mas não menos importante, o meu futuro marido, sempre namorado, meu noivo João Carlos Jordão. Meu lindo, você foi quem mais acompanhou minhas angústias e incertezas. Fomos cúmplices, companheiros, amigos... Você me completa. Espero ficar velhinha ao seu lado.

## RESUMO

A síndrome do ovário policístico (SOP) é um distúrbio endócrino feminino extremamente comum na idade reprodutiva e apresenta quadro clínico bastante heterogêneo, entre eles os cistos foliculares ovarianos aumentados, hiperandrogenismo, infertilidade resistência à insulina, e dislipidemia. Em casos de pacientes com policistose ovariana que desejam tratar a infertilidade, o cloridrato de metformina é a droga mais utilizada e considerada mais segura em comparação com os demais tratamentos. Ao diagnosticar a síndrome, tem-se observado que mulheres apresentam grande prevalência a doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, fibrose, alterações hepático-enzimáticas e aumento do estresse oxidativo plasmático, elevando a preocupação dos médicos quanto às patologias hepáticas. Além disso, recentes estudos têm relacionado o estresse oxidativo na patogênese de doenças que causam a infertilidade, por esta razão, pesquisas tem sugerido a utilização de antioxidantes como a melatonina como suplemento a outras drogas. No entanto, não há relatos na literatura sobre a associação do cloridrato de metformina e melatonina para o tratamento da policistose ovariana. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da combinação terapêutica desses fármacos em ratas induzidas à SOP sobre os aspectos reprodutivos e hepáticos. Para tanto, foram utilizadas 75 ratas albinas, divididas aleatoriamente em cinco grupos de 15 animais. Todas as ratas, exceto as do grupo I, foram submetidas à indução da SOP pela iluminação constante, e as ratas dos grupos III, IV e V receberam tratamentos com os fármacos melatonina, cloridrato de metformina e a associação destes, respectivamente. Após a confirmação da SOP e tratamentos, foram analisados os efeitos plasmáticos bioquímicos e hormonais dos tratamentos, e as ratas foram acasaladas para análise dos sítios de implantação e acompanhamento gestacional dos níveis de estresse oxidativo. Ao final do experimento foi analisada a histopatologia e imunohistoquímica do fígado das ratas. Os tratamentos farmacológicos diminuíram o número de dias para confirmação do acasalamento, aumentaram os níveis séricos de progesterona, bem como o número e o peso dos filhotes. Reduziram os níveis plasmáticos de estrógeno e teor de fibras colágenas. No fígado, os tratamentos com cloridrato de metformina, melatonina, e mais significativamente a associação destes fármacos, reduziram os níveis plasmáticos da enzima hepática alanina transaminase, do óxido nítrico e da glutathione total,

levando a resultados semelhantes aos animais do grupo controle, mais uma vez, as ratas que receberam associação dos fármacos quanto assemelhou-se ao grupo controle quanto ao conteúdo hepático de polissacarídeos, e aos de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, pôde-se concluir que a associação do cloridrato de metformina com melatonina proporciona os melhores resultados em comparação aos demais tratamentos, de forma a regular hormonal e histoquimicamente o sistema reprodutor e aumentar as chances de concepção de forma semelhante ao grupo controle. No fígado a associação dos fármacos atuou de forma mais eficaz contra a toxicidade hepática produzida pela SOP experimental, favorecendo uma normalização dos parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo durante a gestação, quando comparada às monoterapias destas drogas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndrome dos ovários policísticos, biguanida, melatonina, reprodução, fígado, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The polycystic ovary syndrome (PCOS) is endocrine disorder in women of reproductive age extremely common and heterogeneous clinical features. In cases of patients with ovarian polycystic wishing to treat infertility, metformin hydrochloride is the drug most widely used and considered safer compared to the other treatments. When diagnosing the syndrome, it has been observed that women have a high prevalence of nonalcoholic fatty liver disease, steatosis, fibrosis, abnormal liver-enzyme factors and increased indicators of oxidative stress in plasma, raising concern among doctors about the disease in the liver. Furthermore, recent studies have linked oxidative stress in the pathogenesis of diseases which cause infertility, for this reason, research has suggested the use of antioxidants such as melatonin, due to liver protecting effect in the pharmacological treatment or supplementation to combat these types of disease. However, there are no reports in the literature about association of metformin hydrochloride and melatonin for the treatment of PCOS. The objective of this work was to investigate the effects of combination therapy of these drugs in rats induced to PCOS on to reproductive and liver. Thus, we used 75 albino rats were divided randomly into five groups of 15 animals. All rats except those in group I were subjected to induction of PCOS by constant illumination, and the rats of groups III, IV and V received treatment with the drug melatonin, metformin hydrochloride and the drug combination, respectively. After confirmation of PCOS and treatments, we analyzed the effects of plasma biochemical and hormonal treatments, and rats were mated and monitored during pregnancy for analysis of implantation sites, ovarian, weight gain, reproductive viability and levels of oxidative stress. At the end of the experiment was conducted histopathology, and immunohistochemistry staining of liver of rats and analysis of the puppies. Pharmacological treatments decreased the time allowed copulation, increased plasma levels of progesterone, the number and weight of pups and reduced plasma levels of estrogen and endometrial content of collagen fibers. In the liver, treatment with metformin hydrochloride, melatonin and more significantly the association of these drugs reduced plasma levels of the liver enzyme alanine trasaminase, nitric oxide and total glutathione, leading to results similar to the control group, were also observed similarities between those of control rats and rats that received a

combination of drugs for the content of hepatic polysaccharide, and of pro-inflammatory cytokines. Thus, we conclude that the association of metformin with melatonin provides the best results compared to the other treatments, in order to regulate hormonal and histochemical the reproductive system and increase the chance of conception resembling the control group, and the liver, the combination of drugs works more effectively against liver toxicity produced by PCOS, favoring normalization of biochemical parameters and oxidative stress during pregnancy, compared to therapies only these drugs.

**KEYWORDS:** Polycystic ovary syndrome, biguanide, melatonin, reproduction, liver, oxidative stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>SOP</b>	Síndrome dos ovários policísticos
<b>CC</b>	Citrato de clomifeno
<b>US</b>	Ultrassonografia
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like-peptide-1
<b>TG</b>	Triglicerídeos totais
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>AMPK</b>	Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase
<b>HER-2/neu</b>	Human Epidermal growth factor Receptor 2
<b>LaPO</b>	Lactoperoxidase
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>CYP 17</b>	Citocromo P450c17 hidroxilase/17,20 liase
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b>	17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 5
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>SHBG</b>	Hormônios sexuais ligados a globulina
<b>AOPP</b>	Produto de oxidação proteica
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>AMPK</b>	Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- alfa
<b>DMBA</b>	7,12-dimetilbenzoantraceno
<b>NMU</b>	Nitrosometilurea
<b>GSH-Px</b>	Enzima glutathione peroxidase
<b>LPO</b>	Peroxidação lipídica
<b>TC</b>	Tempo de cópula
<b>PT</b>	Peso das ratas durante o tratamento
<b>Gp</b>	Ganho de peso durante a gestação

<b>PG</b>	Peso durante a gestação
<b>PO</b>	Peso dos ovários
<b>SI</b>	Sítios de implantação
<b>E</b>	Estradiol
<b>Prog</b>	Progesterona
<b>NF-κB</b>	fator nuclear Kappa B
<b>IL-1β</b>	Interleucina 1- beta
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Íon nitrito
<b>NEED</b>	(N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride)
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade
<b>H. E.</b>	Hematoxilina-eosina
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>AST</b>	Aspartato transaminase
<b>ALT</b>	Alanina transaminase

## SUMÁRIO

### Preâmbulo

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII

### Capítulos

1	INTRODUÇÃO.....	07
	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
	REFERÊNCIAS.....	29
2	Melatonina associada ou não ao cloridrato de metformina assegura a implantação em ratas albinas com policistose ovariana induzida.....	39
	RESUMO.....	40
	INTRODUÇÃO.....	41
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
	RESULTADOS.....	47
	DISCUSSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	54
3	Efeito da associação do cloridrato de metformina e melatonina sobre estresse oxidativo, antes e durante a gestação, e análise bioquímica e histopatológica do fígado após tratamento para síndrome dos ovários policísticos em ratas.....	64
	RESUMO	65
	INTRODUÇÃO.....	67
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
	RESULTADOS.....	75
	DISCUSSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	84

### ANEXOS

GUIA PARA AUTORES DAS REVISTAS EM SUBMISSÃO	
---	--

PLOS ONE.....	98
REPRODUCTIVE TOXICOLOGY.....	107

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é um distúrbio endócrino feminino extremamente comum na idade reprodutiva, chegando a atingir 13% das mulheres na idade fértil no Brasil. Pacientes acometidas pela desordem apresentam quadro clínico bastante heterogêneo, com presença de hiperandrogenismo, amenorreia, infertilidade, cistos ovarianos etc. Porém, até os dias atuais, os mecanismos fisiopatológicos desta endocrinopatia ainda são controversos (ANGONESE, 2011; AZZIZ et al., 2004; MELO et al., 2012).

A síndrome pode levar ao aumento de triglicerídeos totais (TG), de lipoproteína de baixa densidade (LDL), de colesterol e da pressão arterial sistólica etc, podendo ocasionar conseqüentemente problemas cardiovasculares e danos hepáticos. Por estes motivos, pesquisas médicas recentes têm sugerido que sejam realizados testes diagnósticos a nível hepático quando detectadas as características clínicas da SOP, pois mulheres com este distúrbio endócrino-reprodutor têm apresentado grande prevalência de patologias hepáticas como doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, fibrose e principalmente alterações hepato-enzimáticas (BARFIELD et al., 2009; REHM et al., 2011; VUPPALANCHI; CHALASANI, 2009).

Em casos clínicos de policistose ovariana em pacientes que desejam tratar a infertilidade, o cloridrato de metformina é a droga mais utilizada e considerada mais segura em comparação com os demais tratamentos (MORAES et al., 2002; PALOMBA; FALBO; LA SALA, 2013). Este fármaco, além de considerado não teratogênico, possui benefícios conhecidos que inclui não causar hipoglicemia, reduzir os níveis de hemoglobina glicosilada, melhorar o perfil lipídico e a atividade fibrinolítica (FISMAN et al., 2004). Quanto ao mecanismo de ação fisiológica do cloridrato de metformina, o pouco que se sabe, é que o fármaco possui capacidade de aumentar a atividade do glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) no plasma, promovendo a inibição da secreção do glucagon, diminuição da atividade de síntese de glicogênio,

retardo do esvaziamento gástrico, saciedade e inibição da ingestão de alimentos (DRUCKER, 2001, 2002; MANNUCCI et al., 2001). Outro possível mecanismo de ação do medicamento é por meio da ativação da enzima AMPK (Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase). Esta ação contribui para a diminuição da glicemia, melhora o perfil metabólico, diminui o colesterol e triglicerídeos, provoca a diminuição de liberação de glicose produzida pelo fígado e aumenta o transporte de glicose muscular, além de promover benefícios ao perfil lipídico sanguíneo (LECRERC et al., 2004; MISRA; CHAKRABARTI, 2007; ZOU et al., 2004).

Estudos têm implicado o estresse oxidativo na patogênese de doenças que causam a infertilidade, endometriose e desordens no sistema reprodutor feminino, por este motivo diversas pesquisas têm utilizado antioxidantes como a melatonina para tratar ou suplementar tratamentos que amenizem patologias diversas, inclusive cânceres (APONTE; AGARWAL, 2013; CERDA et al, 2008; PRATA-LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004). Seus efeitos antioxidantes podem ser analisados em vertentes diversas, como a redução das reações específicas de oxigênio e nitrogênio, efeitos antiexcitatórios e anti-inflamatórios, além do estímulo a atividade de enzimas antioxidantes e redução da ação de enzimas pró-oxidantes (JIMÉNEZ-ORTEGA et al., 2009). Neste contexto, com o intuito de melhorar o potencial de ação e amenizar possíveis danos do tratamento, pesquisas recentes têm investido na associação do tratamento do cloridrato de metformina com a melatonina para reduzir o crescimento de tumor *in vivo* em ratos transgênicos para o receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER-2/neu) e aumentar significativamente o tempo de vida em 8% e de latência do adenocarcinoma mamário em 13,2%. Além de suprimir o crescimento do tumor de Ehrlich em 40%, sendo sugerida pelos autores, a utilização da associação para o tratamento de câncer de mama (ANISIMOV et al., 2010). Em outro estudo, Man'cheva et al. (2011), induziram tumores de pele utilizando Benzopireno em solução com acetona durante 26 semanas e tratou as ratas com melatonina, cloridrato de metformina ou ambos, e observou que todos os tratamentos promoveram significativa redução do número e do tamanho dos tumores de pele em comparação aos animais que não receberam

tratamentos. Além disso, a terapia combinada mostrou melhores resultados quanto aos níveis de lactoperoxidase (LaPO) em comparação com as monoterapias destas drogas. No tratamento do diabetes mellitus Kadhim et al. (2006) identificaram melhora quando associaram cloridrato de metformina, melatonina e zinco, dos resultados do perfil lipídico, reduziu LDL, triglicérides, colesterol total, além de aumentar o HDL em comparação com os demais grupos experimentais.

A suplementação com antioxidantes em mulheres com SOP pode melhorar a sensibilidade à insulina e restaurar o balanço oxido-redutor. Foi observado que 50 a 60% de perdas gestacionais relatadas em artigos estão associadas ao estresse oxidativo, e sugeriu-se que além da SOP, o estresse oxidativo influencia também em outras doenças fisiológicas reprodutivas, como infertilidade e endometriose, além de controlar a função reprodutiva em mamíferos com ciclos reprodutivos sazonais e não sazonais tanto de hábitos diurnos quanto noturnos, selvagens ou domésticos, como cães, gatos, ou coelhos selvagens etc (ANISIMOV, 2003; BERGER, 2008; FUCHS et al., 2010; SEKHON et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2004). No entanto, não há relatos na literatura sobre estudos da terapia associativa das drogas cloridrato de metformina e melatonina para tratar a SOP. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da combinação terapêutica do fármaco cloridrato de metformina em associação com o hormônio melatonina em ratas induzidas à SOP através do modelo de iluminação constante quanto à melhoria dos aspectos reprodutivos e gestacionais, aspectos histopatológicos hepáticos e plasmáticos bioquímicos e do estresse oxidativo.

## REVISÃO DE LITERATURA

### ***A Síndrome dos ovários policísticos***

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma das desordens endócrino-ginecológicas mais comuns na idade reprodutiva, com prevalência variando quanto à disposição geográfica e etnia, entre 5% a 13%. Suas características clínicas são bastante heterogêneas, sua principal alteração fisiopatológica é desconhecida e acredita-se que esta doença pode ser classificada geneticamente como desordem complexa multifatorial (AZZIZ et al., 2004; MELO et al., 2010; YARAK et al., 2005).

A síndrome foi descrita pela primeira vez em 1935, com as características de amenorreia, infertilidade, obesidade, ovários policísticos e hirsutismo (STEIN; LEVENTHAL, 1935), porém foi observado que estas características são similares a patologias como hiperplasia adrenal congênita e câncer de ovários ou adrenais que também levariam a alterações como hiperandrogenismo, que é ocasionado por aumento da ação biológica dos andrógenos e aumento de andrógenos circulantes (hiperandrogenemia). Sua expressão clínica máxima é a virilização em mulheres que se caracterizam pela presença de alterações bioquímicas, incluindo puberdade precoce, hirsutismo, acne, seborreia, alopecia, distúrbios menstruais e disfunção ovulatória com infertilidade durante a vida reprodutiva, síndrome metabólica e disfunção psicológica. A intensidade e extensão dessas manifestações clínicas dependem de vários fatores, e não existe correlação estreita entre a intensidade do quadro clínico e as alterações bioquímicas, ou seja, o hiperandrogenismo pode ocorrer etiologicamente em várias patologias, não sendo patognomônico, desta forma, para o quadro clínico da SOP (GUTIERREZ-GROBE et al., 2010; SPINEDI et al., 1990).

Em 2004 critérios diagnósticos da síndrome foram revisados pelo The Rotterdam ESHRE/ASRM – sponsored PCOS consensus workshop group. Assim, o diagnóstico da SOP em seres humanos é realizado por exclusão de hiperplasia adrenal congênita e câncer de ovários ou adrenais, tendo pelo

menos a identificação de dois dos seguintes critérios: oligovulação ou anovulação, que se manifesta, em geral, com oligomenorréia ou amenorreia, níveis elevados de andrógenos no sangue (hiperandrogenemia) ou manifestações clínicas de excesso de andrógenos (hiperandrogenismo) e cistos de ovários definidos pela ultrassonografia, com a presença de 10 ou mais cistos foliculares subcapsulares com diâmetro entre 2 e 10 mm, além de um estroma ovariano aumentado definidos ao ultrassom, apesar de algumas modificações poderem estar presentes em aproximadamente 22% das mulheres endocrinologicamente normais (AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, 2001; THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004).

A fisiopatologia da síndrome não está definida, existem muitas controvérsias, porém sabe-se que a doença está associada a um desequilíbrio hormonal que se caracteriza por uma circulação constante de altas concentrações de estrogênios, de modo suficiente para manter baixos os níveis de hormônio folículo estimulante (FSH). Estudos têm relacionado a SOP à hiperinsulinemia e à resistência insulínica periférica, de forma que a insulina parece estar envolvida na secreção anormal do hormônio luteinizante (LH) e, a nível periférico, promove a secreção ovariana de andrógenos, através do aumento da expressão do gene da proteína esteroidogênica citocromo P450c17 hidroxilase/17,20 liase(CYP17), tendo ação sinérgica com o LH, tanto diretamente como através do estímulo da secreção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). Desta forma, aumenta a biodisponibilidade da insulina, do IGF-1, da testosterona e do estrógeno, que por sua vez vão interferir com a secreção de hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH), com a ação do FSH no ovário e nas enzimas codificadas pelo CYP17. A insulina também atua sinergicamente com o LH aumentando a produção ovariana de androgênios (EHRMANN, 2005; MARCONDES; BARCELLOS; ROCHA, 2013). Nos folículos ovarianos, este desequilíbrio leva a atividade aumentada da enzima aromatase, e conseqüentemente aumenta a conversão de androgênios com manutenção da alta concentração de estrógenos e LH. Nestas pacientes, os índices de produção de progesterona pelas células da

teca são altos, porém a androstenediona está relativamente aumentada, sugerindo maior conversão, podendo estar a níveis séricos reduzidos (DOLDI et al., 1998). Ou seja, em pacientes com SOP as dosagens de progesterona são frequentemente aumentadas de forma discreta, pois há conversão aumentada pela enzima 17-hidroxiliase em 17 OH-progesterona e conversão desta em androstenediona pela enzima 17-20-liase, de forma que sua análise pode apoiar o diagnóstico da SOP dentro de um quadro clínico compatível e exclusão de hiperplasias adrenais (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001).

O aumento relativo da secreção hipofisária de LH ocasiona aumento de produção de androstenediona pelas células da teca, a qual é convertida pela 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 5 (17 $\beta$ -HSD) em testosterona ou aromatizada em estrona. Os androgênios em excesso são convertidos em estrona nos tecidos periféricos e a estrona inibe a dopamina hipotalâmica provocando um aumento da frequência de pulsos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o que torna maior a produção do LH sobre a formação do FSH (EHRMANN et al., 2006; REIS, 2004). A redução da dopamina hipotalâmica pode estar associada, em alguns casos, ao aumento da prolactina, que por sua vez é fator de estímulo para adrenal produzir androgênio (HOMBURG, 2008).

O tratamento da SOP varia de acordo com os sintomas apresentados pelas pacientes e ocorre principalmente pela administração de antiandrogênios, como cloridrato de metformina, associado ou não a hormônios contraceptivos, dependendo do caso (GANIE et al., 2004; MANSFIELD et al., 2003). Pacientes anovulatórias com hiperandrogenismo são tratadas com anticoncepcionais combinados, pois os estrogênios diminuem os níveis androgênicos circulantes ao incrementarem os níveis séricos de hormônios sexuais ligados a globulina (SHBG) e diminuírem a atividade da 5- $\alpha$ -redutase. Contudo, mulheres com SOP têm alta prevalência de aterosclerose subclínica, refletindo na desregulação da função endotelial, bem como em anomalias na coagulação e no sistema fibrinolítico, aumentando o risco de fenômenos tromboembólicos. Nestes casos, recomendam-se o uso de progestogênio isolado quando há

antecedentes de tromboembolismo ou hipertensão arterial sistêmica (MAK; DOKRAS, 2009; SOARES et al., 2009; SOARES-JÚNIOR; BARACAT, 2010).

No tratamento da infertilidade, a prescrição de uma dieta e um programa de exercícios físicos representa o tratamento de primeira linha, pois contribuem para a melhora da qualidade de vida, da resistência à insulina e do retorno dos ciclos ovulatórios. Drogas que diminuem os níveis de insulina também podem ser utilizadas, de forma isolada ou em associação. A droga mais utilizada e que apresenta maior segurança e sem riscos de teratogenicidade é o cloridrato de metformina. As pacientes candidatas à utilização do cloridrato de metformina devem apresentar funções hepáticas e renais normais, e com o objetivo de evitar os efeitos colaterais gastrointestinais, a droga deve ser administrada junto às refeições e deve-se iniciar o tratamento com uma dose mais baixa e ir aumentando progressivamente (MORAES et al., 2002).

Em estudos de caso, mulheres inférteis com SOP e com aumento de hormônios masculinos, a opção pela fertilização *in vitro* pode ser viável, apesar de o tratamento por hiperestimulação ovariana controlada promover uma piora ovocitária e diferenças na foliculogênese. O estudo do fluido folicular após aspiração sugeriu nestas pesquisas que há interferência parácrina ovariana em relação às dosagens de progesterona e aumento da quantidade do produto de oxidação proteica (AOPP) e glutathione (GSH) em mulheres não obesas com SOP (RESENDE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010).

Hildebrandt et al. (2007) em sua revisão concluiu que mulheres com SOP podem apresentar agravamento no quadro fisiopatológico da doença, contribuindo para co-morbidades ou complicações metabólicas como elevação sérica de insulina liberada pelo pâncreas, alterações bioquímicas, infertilidade etc, sendo fundamental que mulheres com SOP mantenham reduzido seu índice de massa corpórea (IMC). Além disso, foi observado pelo grupo de trabalho da Cooperativa Multicenter em Medicina Reprodutiva dos Estados Unidos da América (EUA), que mulheres com obesidade ou não, estando acometidas da SOP têm maior incidência de resistência à insulina, cerca de 50 a 80%, quando comparadas a mulheres sem a síndrome (CHANG et al., 1983; LEGRO et al., 1999, 2007). Assim, o risco de adquirir outras doenças aumenta,

principalmente quando há aumento relevante de índice de massa corpórea (IMC), glicose e níveis de hormônios sexuais ligados à globina associado às características clínicas que definem a síndrome (GAMBINERI et al., 2012).

Estudo comparativo realizado entre mulheres com mesma idade e IMC mostrou que as pacientes com SOP têm aumento nas alterações da homeostase associada à resistência a insulina e aumento dos níveis de aminotransferases, o que pode estar associado à resistência a insulina. Estes autores sugerem que mulheres com SOP devem ser acompanhadas quanto à coexistência de doenças hepáticas devido à potencialidade progressiva da doença (CERDA et al., 2008; REHM et al., 2011). A heterogeneidade da SOP reflete a participação de múltiplos mecanismos fisiopatológicos, como anormalidades bioquímicas e resistência a insulina no tecido muscular e adiposo, com hiperinsulinemia compensatória pela provável disfunção pancreática e alteração na dinâmica das gonadotropinas, interferindo no eixo-hipotálamo-adrenais-ovário (Fig. 1).

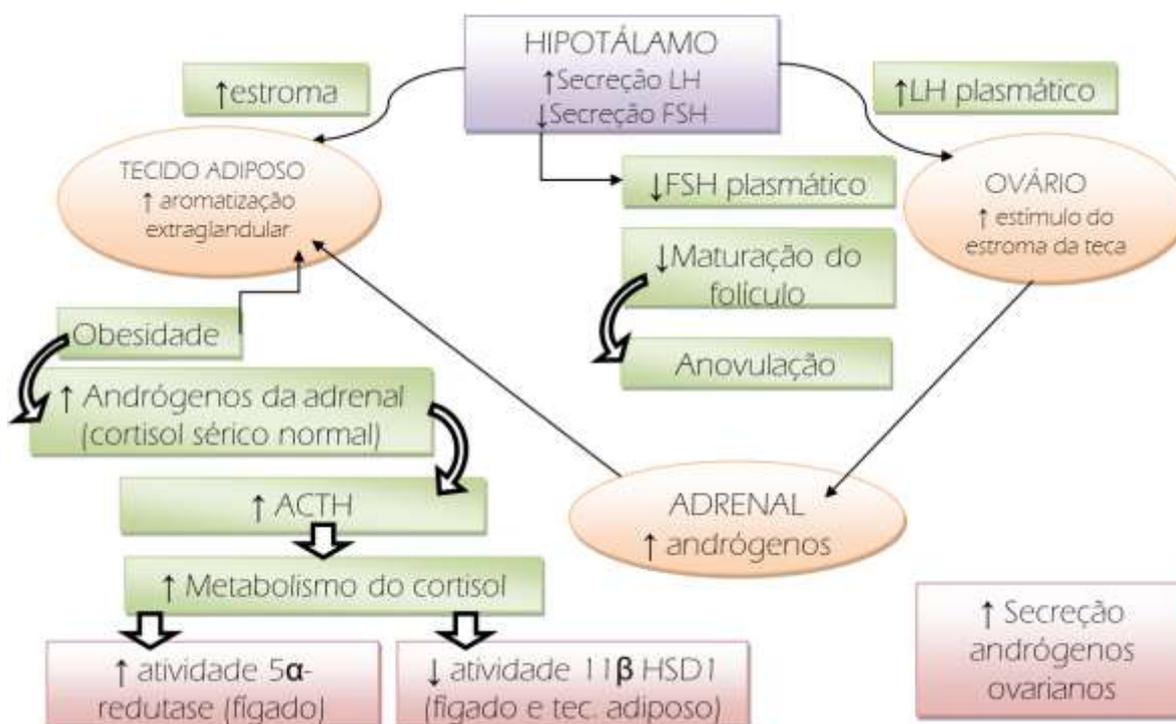


Figura 1: Reação da síndrome dos ovários policísticos no eixo hipotalâmico-ovariano-adrenal.

Fonte: modificado de Yarak et al., (2005).

Recentemente tem-se observado que mulheres com SOP apresentam grande prevalência de patologias hepáticas como doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, fibrose e alterações hepato-enzimáticas, desta forma, ao ser diagnosticada, tem-se sugerido inclusive que sejam realizados testes diagnósticos hepáticos quando detectadas as características clínicas da SOP (BARFIELD et al., 2009; REHM et al., 2011; VUPPALANCHI; CHALASANI, 2009). Estas doenças podem estar associadas ao aumento de gordura visceral ou aumento do estresse oxidativo, o qual também está associado à patogênese de doenças que causam a infertilidade, endometriose e desordens no sistema reprodutor feminino. O estresse oxidativo vem mostrando-se muito comum na vida moderna, por este motivo diversas pesquisas têm utilizado antioxidantes como a melatonina para tratar ou suplementar a farmacocinética (APONTE; AGARWAL 2013; CERDA et al., 2008; PRATA-LIMA; BARACAT; SIMÕES 2004; SEKHON et al., 2010).

Vassilatou et al. (2010) também relataram doenças hepáticas em mulheres com SOP e relacionaram o principal fator de diagnóstico como sendo o aumento do nível das aminotransferases e/ou evidencia de esteatose hepática e concluíram que a doença hepática é comum nessas mulheres, e que o aumento de androgênios pode estar implicando de forma combinada levando a anormalidades metabólicas em mulheres com sobrepeso ou não obesas. Gutierrez-Grobe et al. (2010) também sugeriram estudos a respeito da associação de doenças hepáticas com a SOP devido a uma grande prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica em 62% do total de mulheres com essa síndrome analisadas durante a pesquisa. Alguns autores acreditam que a associação da SOP com doenças hepáticas e síndrome metabólica está ligada diretamente à resistência à insulina. Experimentalmente estes autores observaram que a administração de ácido graxo ômega 3 ( $\omega$ -3) diminui a gordura hepática e os riscos cardiovasculares, mas não interfere nos níveis de HDL, LDL, glicose, andrógenos livre e hormônios sexuais ligados a globulina (SHBG) (ALWIS; DAY, 2008; CUSSONS et al., 2009).

Neste contexto hepatológico, Brock et al. (2005) e Bugianesi et al. (2005) explicam que o uso do cloridrato de metformina, apesar de ser considerado

seguro, apresentou efeitos controversos, pois aumentou os níveis de aminotransferases e outras enzimas hepáticas nas doses de 2g/dia durante 12 meses de tratamento e em casos de administração durante a gestação, sugerindo que sejam realizados estudos que avaliem parâmetros hepáticos em gestantes com SOP.

### ***Cloridrato de Metformina***

O cloridrato de metformina, 1,1-Dimetil-Guanil-Guanidina, é uma droga pertencente à classe das biguanidas, que historicamente retratam utilizações medicinais que remontam a idade média. Em meados de 1920 a planta *Gallega officinalis* L. foi utilizada como com substrato ao componente ativo guanidina, utilizado como hipoglicemiante em pessoas com diabetes não dependente de insulina, reduzindo os níveis de glicose em jejum por inibição da gliconeogênese hepática e aumentando a utilização de glicose pelos tecidos periféricos (BAILEY; PATH; TURNER, 1996; BELL; HADDEN, 1997). Sabe-se que o cloridrato de metformina tem uma meia-vida em torno de 1,5 a 4,9 horas, a droga é absorvida pelo intestino delgado, e aproximadamente 90% é eliminado intacto pelos rins, fígado e glândulas salivares. O cloridrato de metformina pode se ligar a membranas biológicas, mas não produz forte inibição da fosforilação oxidativa e também não se sabe o local de ação celular. A perda de peso dos pacientes tratados com o fármaco parece estar associada a uma perda de tecido adiposo e diminuição da liberação de ácidos graxos por diminuição de lipólise em alguns tecidos. Desta forma, combate os ácidos graxos livres que prejudicam a disponibilidade de glicose ao tecido muscular e levam à insensibilidade a insulina em mulheres com SOP (ABBASI et al., 1997; HUA, 2001; MORIN-PAPUNEN et al., 2000).

O mecanismo de ação do cloridrato de metformina não está completamente compreendido, porém uma das vias de sua função farmacológica é por meio da ativação da enzima AMPK (Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase), a qual promove a disponibilização de energia e aumenta a oxidação dos ácidos graxos, diminui a glicose,

colesterol e triglicerídeos. (MISRA, CHAKRABARTI 2007). Nos ovários, o cloridrato de metformina atua nas células da teca ovariana podendo inibir o gene CYP17 (proteína 17,20 liase) devido ao aumento da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que reduz os níveis de insulina. Com a redução dos níveis de insulina, ocorre a inibição da expressão dos receptores de LH na camada da granulosa do ovário, proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR), enzimas esteroidogênicas HSD3-b e CYP11a (citocromo envolvido na conversão de estrógenos). Além disso, atua de forma direta no aumento do AMPK, melhorando a defesa antioxidante no tecido ovariano, o que contribui para a menor produção de esteroides sexuais e a luteinização prematura e conseqüentemente melhora da ovulação. Em relação às pacientes com SOP, a ação do cloridrato de Metformina parece afetar a função ovariana, direta ou indiretamente, de duplo modo, pela redução da resistência à insulina e também por uma ação direta na esteroidogênese e no crescimento folicular (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2010).

Nos hepatócitos e músculos esqueléticos, o cloridrato de metformina atua promovendo a disponibilização de energia e estimulando o metabolismo de transporte de glicose, oxidação de ácidos graxos e redução do perfil lipídico (Fig. 2). No fígado, determina por fosforilação a inibição da ACC redutase (acetil CoA carboxilase) e 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGCoA), enzimas envolvidas na formação dos ácidos graxos e a longo prazo, da expressão de genes lipogênicos (FAS, S14, L-PK e SREBP-1) e neoglicogênicos (PEPCK e glicose-6-fosfatase). Dessa forma, contribui para a redução dos ácidos graxos e do colesterol, além de diminuir a síntese de lipoproteínas. Como conseqüência, ocorre menor esteatose hepática e aumento da sensibilidade do fígado à insulina (MISRA, CHAKRABARTI, 2007; ZOU et al., 2004).

O cloridrato de metformina é droga de primeira linha para o tratamento de diabetes mellitus do tipo 2 e vem sendo utilizada no tratamento da SOP desde de 1994. As pacientes candidatas à utilização do cloridrato de metformina devem apresentar funções hepática e renal normais, e com o objetivo de evitar os efeitos colaterais gastrointestinais, a droga deve ser

administrada junto às refeições e deve-se iniciar o tratamento com uma dose mais baixa e ir aumentando progressivamente (MORAES et al., 2002). Atualmente este fármaco vem sendo a principal opção terapêutica no tratamento da SOP com associação a contraceptivos, ou não, caso haja interesse pela paciente de engravidar. Este fármaco tem como função aumentar a captação de glicose pelos tecidos periféricos, sem modificar a secreção de insulina ou induzir hipoglicemia, porém seu mecanismo de ação fisiológico e molecular ainda não é conclusivo (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2010; MILLER; BIRNBAUM, 2010; NIES et al., 2011).

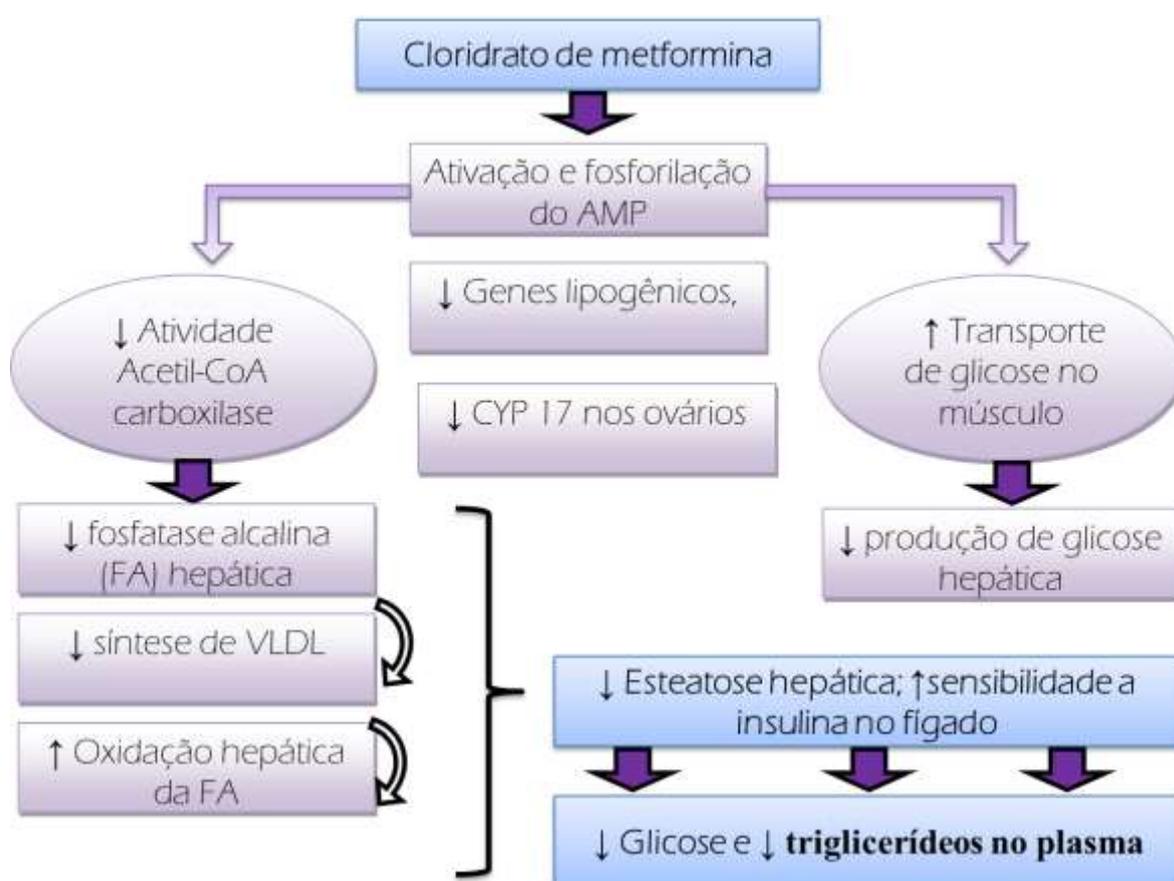


Figura 2: Ação do cloridrato de metformina no metabolismo hepático e muscular.

Fonte: modificado de Zhou et al. (2001) e Angonese, (2011).

Motta et al. (2012) explicam sobre as opções de tratamento para mulheres anovulatórias com SOP, e relata que o citrato de clomifeno (CC) ainda é a droga de escolha. Este fármaco é um agente não esteróide agonista

parcial dos receptores de estrógenos, que estimula aumento de liberação de FSH e LH pela hipófise, porém, aumenta a chance de multiparidade em 10% com alguns casos de malformações congênitas. Das mulheres que recebem este tratamento, cerca de 80% irão responder ao estímulo ovariano com clomifeno, mas apenas 50% irão engravidar em até seis meses de tratamento. Além disso, em algumas pacientes consideradas resistentes ao clomifeno, estas podem se beneficiar da associação com o cloridrato de metformina, principalmente em casos de obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina. Nestes casos específicos de interesse em engravidar, salienta-se que o cloridrato de metformina não deve ser utilizado como indutor isolado em casos de indução a fertilidade (KATSIKI; HATZITOLIOS, 2010; LADSON et al., 2011; SIEBERT et al., 2006).

Modelos experimentais foram submetidas ao estro permanente do ciclo ovulatório por testosterona na dose de 0,1mL utilizando óleo mineral como veículo via subcutânea, e tratadas com cloridrato de metformina na dosagem de 50mg/kg durante 6 semanas. Observou-se histomorfometricamente que os ovários das ratas tratadas com cloridrato de metformina apresentaram corpos lúteos, enquanto que o grupo androgenizado e tratado apenas com placebo não apresentou corpos lúteos. Além disso, o cloridrato de metformina auxiliou também na redução da degeneração folicular, redução da área de células intersticiais e no endométrio reduziu o número de glândulas e eosinófilos por área em  $\mu\text{m}^2$  (MAHAMED et al., 2011).

Legro et al (2007) analisaram os efeitos do cloridrato de metformina isolada (comprimidos 500mg), ou em associação ao citrato de clomifeno (comprimidos de 50mg) durante 6 meses, variando de 1 a no máximo 4 comprimidos ao final do tratamento, em 626 mulheres inférteis com SOP aleatoriamente, e concluiu-se que o grupo que recebeu apenas cloridrato de metformina apresentou um índice de ovulação significativamente mais baixo (21,7%) que o grupo tratado apenas com citrato de clomifeno (39,5%) e a associação terapêutica (46%), porém observaram-se complicações da administração associada em casos de gravidez múltiplas, enquanto que as

demais características de efeitos adversos não foram estatisticamente significativas.

Vanky et al. (2005) explicaram que o cloridrato de metformina atravessa livremente a barreira placentária e os fetos são expostos às concentrações terapêuticas, porém não foram evidenciados efeitos teratogênicos ou influência ao pH sanguíneo da artéria umbilical, o tratamento foi realizado em mulheres gestantes com SOP na dosagem de 850mg duas vezes ao dia e as análises foram realizadas na oitava semana gestacional, porém Checa et al. (2005) relataram a preocupação quanto ao uso do cloridrato de metformina devido a ao pequeno número de artigos publicados que tratam da aplicação do cloridrato de metformina durante a gestação.

O cloridrato de metformina tem mostrado resultados controversos em algumas pesquisas a nível hepático e renal, por exemplo, algumas crianças acometidas pelo diabetes mellitus do tipo 2, clinicamente tratadas com cloridrato de metformina na dose de 1,0mg duas vezes ao dia, quando comparadas ao grupo placebo, tiveram alterações enzimáticas hepáticas, acidose láctica ou dores abdominais, porém quando os dados foram analisados entre os 82 jovens de 10 a 16 anos de idade, não houve diferença (JONES et al., 2002). Já em modelos experimentais, ratos induzidos a esteatose por alimentação hipercalórica, e tratados com o cloridrato de metformina na dose diária de 250mg/kg durante 4 semanas, apesar de terem reduzido a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), não apresentaram melhoras histopatológicas ou na gravidade da inflamação hepática dos animais quando comparados aos demais grupos experimentais (RASO et al., 2009).

Existem publicações sobre os efeitos adversos associados ao cloridrato de metformina, que incluem relatos de caso de acidose láctica, distúrbios gastrointestinais, hipoglicemia, má absorção de vitamina B12 e ácido fólico hemolisado. A patogênese da acidose láctica associada ao cloridrato de metformina não é inteiramente conhecida e geralmente coexiste com alguns fatores: insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), disfunção hepática, doença cardiovascular, ou mesmo overdose, cerca de 60g

do medicamento. O que resultou na criação de uma série de critérios de exclusão para o uso do cloridrato de metformina no diabetes mellitus, como: falha renal (níveis de creatinina sérica  $\geq 1,5\text{mg/dl}$ ), doença cardíaca ou pulmonar, com o risco de causar susceptibilidade a hipóxia, acidose láctica, história de infecção prévia hepática ou associados ao consumo de álcool. A falta desta análise inicial levou a mortalidade de 50 a 80% nos EUA devido a não restrição ao uso da droga por estes pacientes (GJEDDE et al., 2003; HEANEY; JUNOR, 1997). São necessárias conseqüentemente, pesquisas que analisem os efeitos da administração do cloridrato de metformina a nível hepático em doenças como a SOP e resistência a insulina devido às controvérsias a nível fisiopatológico hepático nestas doenças, visto que o cloridrato de metformina é uma das primeiras linhas de tratamento para estas patologias (GUTIERREZ-GROBE et al., 2010; LADSON et al., 2011).

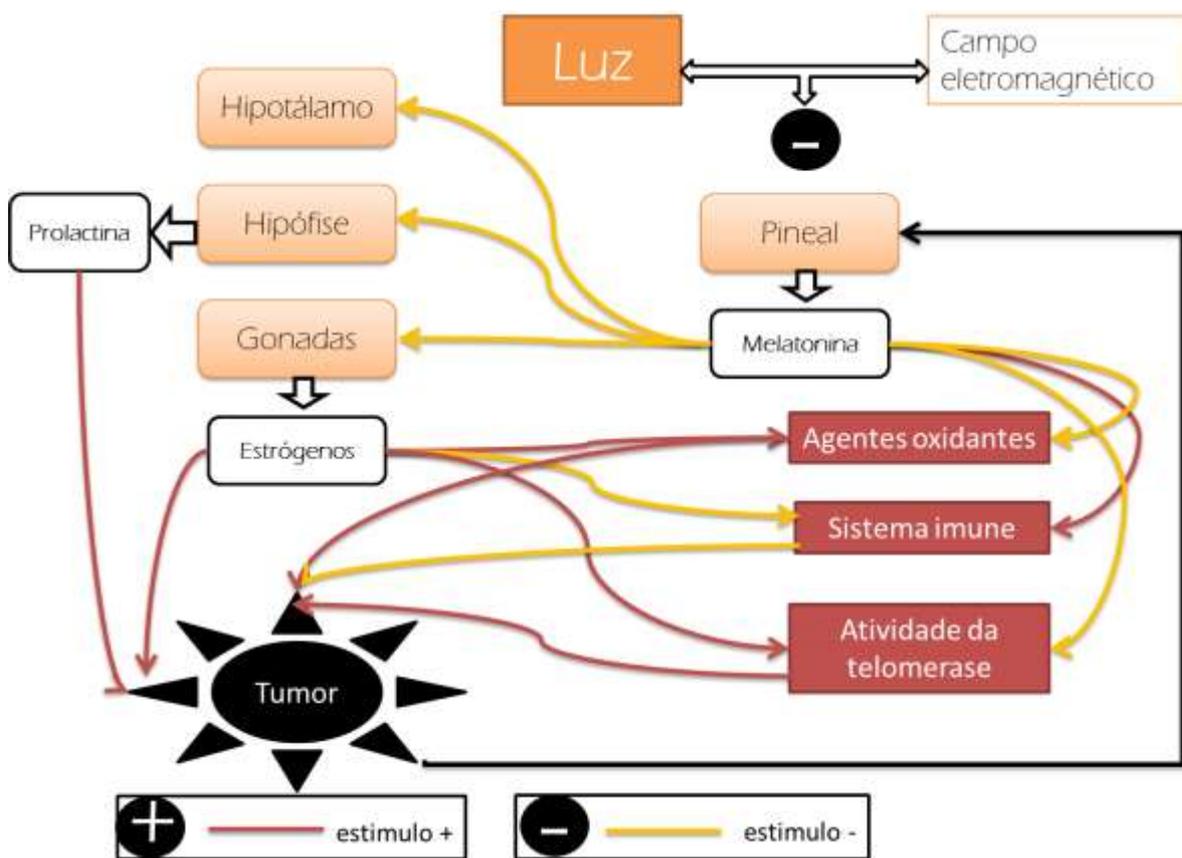


Figura 3: Ação da melatonina.

Fonte: modificado de Salminen; Hyttinen; Kaarniranta (2011) e Xu; Vanhoutte (2012).

## **Melatonina**

A melatonina, N-acetil-5-hidroxitriptamina, um hormônio produzido pela glândula pineal, tem seu pico no sangue durante a fase escura, e tem como principais funções fisiológicas informar sobre os ciclos circadianos organismo, além de controlar a função reprodutiva em mamíferos com ciclos reprodutivos sazonais e não sazonais (ANISIMOV, 2003; BERGER, 2008; TEIXEIRA, et al., 2004).

A pineal foi descrita no século XVII pelo francês René Descartes como “o centro da alma”, localizada entre os dois hemisférios cerebrais, é inervada pelo sistema nervoso autônomo através do *nervi conarii* o qual emerge do gânglio cervical superior e recebe sinais da medula espinhal. Sua ação é ativada através da ligação retino-hipotalâmico e a partir da retina, faz com que os núcleos supraquiasmáticos recebam informações sobre a iluminação ambiental. O tecido da glândula pineal é altamente vascularizado e constituído de células conhecidas como pinealócitos que produzem melatonina e peptídeos como a vasopressina, e células da neuroglia, astrócitos do tecido nervoso (REITER, 1981). A iluminação ambiental é identificada pela retina, e esta informação é enviada para o núcleo supraquiasmático através do nervo óptico, passando pelas fibras pré-ganglionares da medula espinhal, gânglio cervical superior, nervos simpáticos pós-ganglionares, chegando até a glândula pineal. Na condição de escuro constante o ritmo da produção persiste. Já a exposição à luz suprime rapidamente a síntese de melatonina (ZHDANOVA; WURTMAN, 1997).

A melatonina não é armazenada no local de síntese e, por conseguinte, é segregada diretamente para o líquido cefalorraquidiano e circulação vascular (GANGULY et al., 2010; REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010). A síntese de melatonina é produzida em quantidades reduzidas também pela retina, corpo ciliar, cérebro, medula espinhal, testículo, ovário, pele, entre outros. A melatonina atua sobre os receptores MT1 e MT2 em vários tecidos, que permitem transmitir ritmicidade a estruturas que estão do lado de fora da barreira hematocefálica. Este hormônio faz com que o início da maturidade reprodutiva e efeitos endócrinos gonadais ocorram sob o controle do eixo

hipotálamo-hipófisário-gonadal (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT 2010; JOCKERS et al., 2008).

Alguns dos efeitos importantes da melatonina são: atuar como transdutor neuroendócrino, integrando os sinais neurais da retina, que depende da duração e intensidade da iluminação ambiental, liberando sinais na corrente sanguínea de sincronização dos ritmos circadianos. Atuar como neuroprotetor, pois as ações antioxidantes da melatonina, tanto na formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio antiexcitatórios e inflamatórios, como na inibição de enzimas pró-oxidantes e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa e interleucina IL-1 e as enzimas inflamatórias iNOS e COX-2 (CHAHBOUNI et al., 2010; KORKMAZ et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 2007). Assim, a melatonina funciona como um antioxidante de largo espectro na eliminação de radicais livres (TAN et al., 2007).

A pinealectomia experimental induz diminuição da gliconeogênese hepática e muscular, bem como aumento na concentração de piruvato plasmático. Além disso, infusão de extrato de pineal promove redução glicêmica, que envolve aumento na tolerância à glicose e na gliconeogênese hepática e muscular, em resposta a uma sobrecarga glicídica (FARIA et al., 2013; LIMA et al., 1998). Ou seja, a glândula pineal atua na regulação do metabolismo de carboidratos, demonstrado em estudos das alterações na concentração plasmática da glicose, insulina e glucagon em ratos pinealectomizados, sendo verificado uma redução no mRNA do GLUT4, no peso do coxim periepididimal, tecido adiposo marrom interescapular e músculo solear, sem, entretanto, alterar o conteúdo de mRNA do GLUT4 em músculo extensor digital longo. Desta forma conclui-se que há uma regulação tanto transcricional como pós-transcricional no gene do GLUT4, que é tecido-específico (LIMA et al., 1998; SERAPHIM et al., 2000).

Quando ratas são submetidas à iluminação constante ou pinealectomizadas, desenvolvem ovários policísticos. As consequências ao tecido uterino apresentam-se por epitélio endometrial bastante hipertrófico, com áreas apresentando brotos celulares, o estroma compacto, não edematoso, rico em fibras colágenas, e contendo poucas glândulas, as quais na maioria

das vezes apresentam áreas de estratificação (MEDEIROS et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2002).

Sabe-se que a melatonina está envolvida na fisiologia ovariana, incluindo o desenvolvimento folicular, ovulação, oócito, maturação e função lútea. Sua deficiência inclusive parece estar envolvida na fisiologia patológica da SOP e endometriose. O uso clínico da melatonina nos seres humanos tem sido explorado e os resultados abrem novas oportunidades para a gestão de várias doenças, aumentando a taxa de fertilização e reduzindo danos oxidativo, e SOP, sendo necessárias novas pesquisas na área (TAMURA et al., 2009). Além disso, os níveis plasmáticos da melatonina tendem a aumentar durante a gestação, atingindo valores elevados no final desse período, sugerindo que esse hormônio desempenhe um papel importante na manutenção da gestação (BISHNUPURI; HALDAR 2000, 2001; NAKAMURA et al., 2001).

No ser humano, em primatas e em alguns roedores, como o camundongo e o rato, a melatonina apresenta ação antigonadotrófica. 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 (hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), pela hipófise. A frequência de liberação do GnRH é de, aproximadamente, um pulso a cada 90 minutos na fase folicular, e a cada 220 minutos, na fase lútea. Sua liberação pode ser modificada pela melatonina, principalmente durante o final da fase lútea e o início do período menstrual, com diminuição da frequência dos pulsos, o que também repercute na hipófise e nas gônadas (DAIR et al., 2008; SOARES-JUNIOR; HOLANDA; BARACAT, 2008).

Os efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina podem estar relacionados às suas propriedades bioquímicas e/ou metabólicas e uma série de estudos foram realizados a fim de desvendar seu mecanismo de ação. Estudos em humanos demonstraram que os níveis de melatonina diminuem cerca de 50% em pacientes com tumores primários de mama em expansão, enquanto, em pacientes com tumores secundários os níveis são semelhantes aos de controles (BARTSCH et al., 1989; SOUSA-NETO; SCALDAFERRI,

2005). Estudos de administração de melatonina a pacientes oncológicos sugeriram que 20mg/dia de melatonina oral podem amplificar a resposta terapêutica ao tamoxifeno em mulheres com câncer de mama metastático e induzir a regressão tumoral em pacientes que não respondem ao tamoxifeno isoladamente (LISSONI et al., 1999). Apesar dos efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina serem inquestionáveis, os seus mecanismos de ação ainda não estão bem esclarecidos. Há evidências de que ela atue diferentemente em tipos distintos de câncer e, apesar da existência de teorias consistentes, há necessidade de novos estudos para a comprovação dos mecanismos mais importantes em cada caso (LISSONI et al., 1995; SOUSA-NETO; SCALDAFERRI, 2005).

Cos; Sánchez-Barceló (2000) propuseram a hipótese de que a melatonina exerce ações antiandrogênicas em tumores mamários hormônio-dependentes. Pois estes tumores foram reduzidos experimentalmente em ratas induzidas ao câncer de mama através da utilização de substâncias químicas como o 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) e nitrosometilurea (NMU), na dosagem de 20mg administradas via oral em dose única aos 55 dias de vida, e tratadas com melatonina adicionada à água de beber durante 9 semanas sempre no período da noite, na concentração de 25µg/mL, perfazendo a dosagem de 500µg/mL por dia. Estes autores sugerem dois mecanismos diferentes para explicar como a melatonina reduz o desenvolvimento do câncer de mama ao longo de suas interações com o as vias de sinalização de estrógeno, primeiro, com o mecanismo indireto neuroendócrino que inclui a regulação pela melatonina do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, e segundo, por ação direta a nível celular tumoral, interferindo na ativação dos receptores de estrógeno e atuando como um modulador seletivo (Fig. 3) (BLASK et al., 1991; LEON-BLANCO et al., 2003; SÁNCHEZ-BARCELÓ; MEDIAVILLA; TUCKER, 1990).

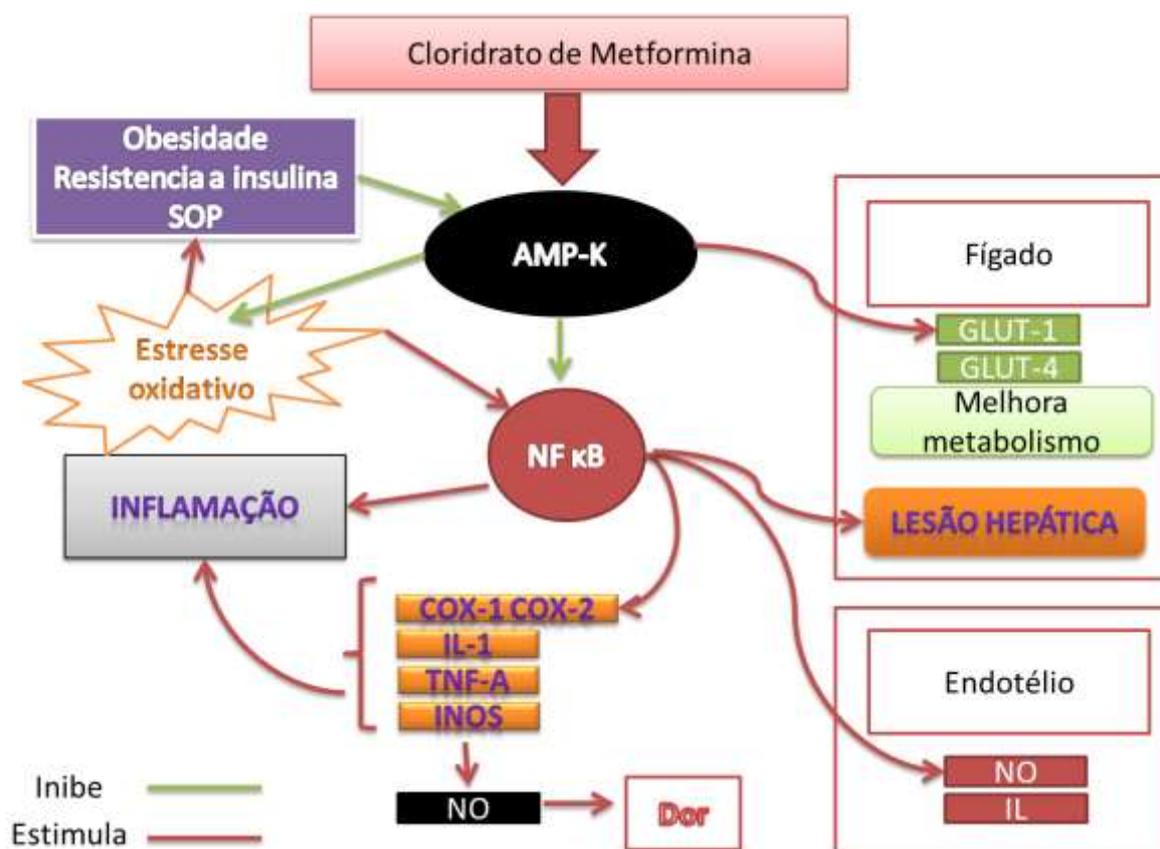


Figura 4: Ação metabólica da melatonina nos sistema fisiológico endócrino.

Fonte: Modificado de Cos; Sánchez-Barceló, (2006).

A aplicação da luz constante leva conseqüentemente à deficiência de produção de melatonina pela glândula pineal, danos do sistema reprodutor e aumento do estresse oxidativo. Em ratos submetidos à luz constante verificou-se que a peroxidação lipídica foi aumentada e que a reposição pela administração de melatonina causou diminuição da peroxidação lipídica, nos tecidos estudados, em especial no fígado e no cérebro. Além disso, a aplicação de melatonina resultou numa maior atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), que tem efeito antioxidante. Deste modo, a melatonina não é apenas um combatente de radicais tóxicos diretos, mas também estimula a atividade da enzima antioxidante GSH-Px para desintoxicar radicais hidroxílicos produzidos por exposição à luz constante (BAYDAŞ et al., 2001; HEILIGENBERG et al., 1999).

Estudo realizado com luz constante durante a gestação em ratas levou a alterações histológicas hepáticas na prole onde foram observadas poucas figuras de mitose, além de maior quantidade de células hematopoéticas e ausência de ductos bilíferos nos filhotes (OLIVEIRA et al., 2006). Assim, devido à importância da atuação da melatonina no sistema reprodutor, além da comprovada atividade antioxidante e viabilidade como suplemento farmacológico em tratamentos de diferentes doenças é fundamental a análise dos possíveis benefícios da complementação do tratamento com cloridrato de metformina.

### ***A associação do cloridrato de metformina com a melatonina***

Poucos artigos relatam sobre a combinação farmacêutica do cloridrato de metformina com a melatonina, seus autores mencionam bons resultados em relação à associação farmacológica entre estes compostos. Man'cheva et al. (2011) realizaram experimento em que foi induzido o câncer de pele através da aplicação do benzopireno diluído em acetona 0,2mL a 0,05% de benzopireno, aplicado duas vezes por semana durante 26 semanas em 200 animais. Após a indução ao câncer, os animais foram tratados com melatonina via água de beber na concentração de 2mg/litro e/ou tratados com cloridrato de metformina na dose de 200mg/por litro, os resultados da análise morfológica mostrou que a associação dos fármacos cloridrato de metformina e melatonina reduz o crescimento tumoral em comparação com as monoterapias, além de reduzir as reações de peroxidação lipídica induzida pelo benzopireno. Já Qasim; Maulood, (2009), administraram dieta rica em açúcar em seus animais experimentais por cinco semanas e tratou-os com cloridrato de metformina nas doses de 500mg/L na água de beber, e/ou melatonina na dose de 45mg/Kg na dieta. Neste estudo foi feita análise do sangue coletado por punção cardíaca quanto à glicose sanguínea e alguns íons e sais. Os resultados demonstraram que a associação dos fármacos manteve a hiperglicemia inalterada, enquanto foi reduzida fortemente pela melatonina, e ligeiramente pelo cloridrato de metformina nas monoterapias. Já os níveis de colesterol total e triglicérides

foram reduzidos significativamente pela associação do cloridrato de metformina com melatonina quando em comparação ao grupo controle.

Anisimov et al. (2010) administraram cloridrato de metformina (0,5mg/mL na água de beber) e melatonina (2mg/L na água de beber disponível durante a noite) em camundongos transgênicos HER2/neu (receptor de câncer de mama induzido por ultra-expressão), para análise de câncer de mama espontâneo, e em camundongos não transgênicos submetidos a transposição de carcinomas mamários e observaram que a associação dos fármacos aumentou o tempo de vida dos animais doentes e inibiu o crescimento dos tumores em ambos os grupos experimentais. Desta forma, como pouco se sabe sobre os efeitos da associação do cloridrato de metformina e melatonina, sendo ambas as drogas foram consideradas benéficas em diversos tratamentos. Além disso, não existem relatos da associação do cloridrato de metformina e melatonina para tratamento da síndrome dos ovários policísticos. Por isso, são necessários estudos a respeito da associação das drogas e seus efeitos sobre o sistema reprodutor feminino e o fígado.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, F.; KAMATH, V.; RIZVI, A. A.; CARANTONI, M.; CHEN, Y. D.; REAVEN, G. M. Results of a placebo-controlled study of the metabolic effects of the addition of metformin to sulfonylurea-treated patients. Evidence for a central role of adipose tissue. **Diabetes Care**. v. 20, p. 1863-1869, 1997.
- ALWIS, N. M. W.; DAY, C. P. Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears. **J. Hepatol**. v. 48, p. S104-S112, 2008.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS. Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders. **Endocr. Pract.** v. 7, p. 121-134, 2001.
- ANGONESE, N. T. **Ensaio clínico randomizado com uso de cloridrato de metformina nas doses de 1500mg e 1000mg dia em pacientes com síndrome de ovários policísticos**. 79 f. 2011. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná).
- ANISIMOV, V. N. Effects of exogenous melatonin- A Review. **Toxicol. Pathol.** v. 31, p. 589-603, 2003.
- ANISIMOV, V. N.; EGORMIN, P. A.; PISKUNOVA, T. S.; POPOVICH, I. G.; TYNDYK, M. L.; YUROVA, M. N.; ZABEZHINSKI, M. A.; ANIKIN, I. V.; KARKACH, A. S.; ROMANYUKHA, A. A. 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.
- APONTE, A.; AGARWAL, A. Oxidative stress impact on the fertility of women with polycystic ovary syndrome studies on women's health oxidative stress in applied basic **Res. Clin. Pract.** v.10, p. 169-180, 2013.
- AZZIZ, R.; WOODS, K. S.; REYNA, R.; KEY, T. J.; KNOCHENHAUER, E. S.; YILDIZ, B. O. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 89, p. 2745-2754, 2004.
- BAILEY, C. J.; PATH, M. R. C.; TURNER, R. C. Metformin. **N. Engl. J. Med.** v. 334, p.574-579, 1996.
- BARFIELD, E.; LIU, Y-H.; KESSLER, M.; PAWELCZAK, M.; DAVID, R.; SHAH, B. The prevalence of abnormal liver enzymes and metabolic syndrome in obese adolescent females with polycystic ovary syndrome. **J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.** v. 22, p. 318-322, 2009.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; FUCHS, U.; LIPPERT, T. H.; BELLMANN, O.; GUPTA, D. Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer. Correlation with prolactin, thyroid stimulating hormone and steroid receptors. **Cancer**. v. 64, n. 2, p. 426-433, 1989.
- BAYDAŞ, G.; ERÇEL, E.; CANATAN, H.; DÖNDER, E.; AKYOL, A. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. **Cell Biochem. Funct.** v. 19, n. 1, p. 37-41, 2001.

- BELL, P. M.; HADDEN, D. R. Metformin. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** v. 26, p. 523-537, 1997.
- BERGER, J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. **Pathol. Biol.** v. 56, p. 286-291, 2008.
- BISHNUPURI K.S.; HALDAR C. Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti*. **J. Reprod. Fert.** v. 118, n. 2, p. 295-301, 2000.
- BISHNUPURI, K. S.; HALDAR, C. Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. **Biol. Signais Recent.** v. 10, n. 5, p. 317-325, 2001.
- BLASK, D. E.; PELLETIER, D. B.; HILL, S. M.; LEMUS-WILSON, A.; GROSSO, D. S.; WILSON, S. T.; WISE, M. E. Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: Potential involvement of antiestrogenic mechanism *in vivo*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 117, p. 526-532, 1991.
- BROCK, B.; SMIDT, K.; OVESEN, P.; SCHMITZ, O.; RUNGBY, O. Is metformin therapy for polycystic ovary syndrome safe during pregnancy? **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v. 96, p. 410-412, 2005.
- BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatol.** v. 42, p. 987-1000, 2005.
- CERDA, C.; PÉREZ-AYUSO, R.M.; RIQUELME, A.; SOZA, A.; VILLASECA, P.; SIR-PETERMANN, T.; ESPINOZA, M.; PIZARRO, M.; SOLIS, N.; MIQUEL, J.F.; DAIR, E.L.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J.; ROMEU, L.R.G.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C.; SOARES-JUNIOR, J.M. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertil. Esteril.** v. 89, p.1299-604, 2008.
- CHAHBOUNI, M.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; SEVILLA, B.; GARCÍA, J. A.; LÓPEZ, L. C.; MUÑOZ-HOYOS, A.; MOLINA-CARBALLO, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. **J. Pineal Res.** v. 48, n. 3, p. 282-289, 2010.
- CHANG R. J.; NAKAMURA, R. M.; JUDD, H. L.; KAPLAN, S. A.; Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 57, p. 356-359, 1983.
- CHECA, M. A.; REQUENA, A.; SALVADOR, C.; TUR, R.; CALLEJO, J.; ESPINÓS, J. J.; FÁBREGUES, F.; HERRERO, J. Insulin-sensitizing agents: Use in pregnancy and as therapy in polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod. Update.** v. 11, n. 4, p. 375-390, 2005.
- COS, S.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. Melatonin and Mammary Pathological Growth. **Front. Neuroendocrinol.** v.21, p. 133-170, 2000.
- CUSSONS, A. J.; WATTS, G. F.; MORI, T. A.; STUCKEY, B. G. A. Omega-3 fatty acid supplementation decreases liver fat content in polycystic ovary

syndrome: A randomized controlled trial employing proton magnetic resonance spectroscopy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 94, n. 10, p. 3842-3848, 2009.

DAIR, E. L.; SIMOES, R. S.; SIMÕES, M. J.; ROMEU, L. R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. JR. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertil. Esteril.** v. 89, p. 1299-1305, 2008.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; ECONOMOU, F.; PALIMERI, S.; CHRISTAKOU, C. Metformin in polycystic ovary syndrome. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 1205, p. 192-198. 2010.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annu. Rev. Physiol.** v. 72, p. 517-549, 2010.

DOLDI, N.; GESSI, A.; DESTEFANI, A.; CALZI, F.; FERRARI, A. Polycystic ovary syndrome: Anomalies in progesterone production. **Hum. Reprod.** v. 13, n. 2, p. 290-293, 1998.

DRUCKER, D. J. Gut adaptation and the glucagon-like peptides. **Gut. Int. J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 50, p. 428-435, 2002.

DRUCKER, D. J. Minireview: The glucagon-like peptides. **Endocrinol.** v. 142, p. 521-527, 2001.

EHRMANN, D. A.; LILJENQUIS, D. R.; KASZA, K.; AZZIZ, R.; LEGRO, R. S.; GHAZZI, M. N.; PCOS/TROGLITAZONE STUDY GROUP. Prevalence and Predictors of the Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.9, n.1, p. 48-53, 2006.

EHRMANN, D. A.; Polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 352, p. 223-236, 2005.

FARIA, A. J.; KINOTE, A.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; ARAÚJO, T. M.; RAZOLLI, D. S.; DONEDA, D. L.; PASCHOAL, L. B.; SANTOS, C. L.; BERTOLINI, G. L.; VELLOSO, L. A.; BORDIN, S.; ANHE, G. F. Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic AKT and suppress hepatic gluconeogenesis in rats **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 305, n. 2, p. 230-242, 2013.

FISMAN, E. Z.; TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; ADLER, Y. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. **Herz.** v. 29, p. 290-298, 2004.

FUCHS, L. F. P.; GUIMARÃES, C. R.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, M. C. P.; SOARES-JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C. Ação da melatonina sobre a apoptose e fator de crescimento endotelial vascular no córtex da adrenal de ratas pinealectomizadas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, n. 8, p. 374-380, 2010.

GAMBINERI, A.; PATTON, L.; ALTIERI, P.; PAGOTTO, U.; PIZZI, C.; MANZOLI, L.; PASQUALI, R. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: Results from a long-term prospective study. **Diabetes.** v. 61, p. 2369-2374, 2012.

GANGULY, K.; SHARMA, A. V.; REITER, R. J.; SWARNAKAR, S. Melatonin promotes angiogenesis during protection and healing of indomethacin-induced

gastric ulcer: role of matrix metaloproteinase-2. **J. Pin. Res.** v. 49, n. 2, p. 130-140, 2010.

GANIE, M. A.; KHURANA, M. L.; EUNICE, M.; GULATI, M.; DWIVEDI, S. N.; AMMINI, A. C. Comparison of efficacy of spironolactone with metformin in the management of polycystic ovary syndrome: an open-labeled study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 89, p. 2756-2818, 2004.

GJEDDE, S.; CHRISTIANSEN, A.; PEDERSEN, S. B.; RUNGBY, J.; Survival following a metformin overdose of 63 g: a case report. **Pharmacol. Toxicol.** v. 93, n. 2, p. 98-99, 2003.

GUTIERREZ-GROBE, Y.; PONCIANO-RODRÍGUEZ, G.; RAMOS, M. H.; URIBE, M.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. **Ann. Hepatol.** v. 9, n. 4, p. 402-409, 2010.

HEANEY, D. MAJID, A.; JUNOR, B. Bicarbonate haemodialysis as a treatment of metformin overdose. **Nephrol. Dial. Transplant.** v. 12, n. 5, p. 1046-1047, 1997.

HEILIGENBERG, S. V. D.; DEPRES-BRUMMER, P.; BARBASON, H.; CLAUSTRAT, B.; REYNES, M.; LEVI, F. The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. **Life Sci.** v. 64, n. 26, p. 2523-2534, 1999.

HILDEBRANDT, A.; ALVES, M. A. C.; DORFMAN, R.; JASMIN, C. Influência da obesidade na síndrome do ovário policístico. **Rev. Bras. Obes. Nut. Emagrec.** v. 1, n. 5, p. 1-7, 2007.

HOMBURG, R. Polycystic ovary syndrome. **Best. Practic. Res. Clin. Obst. Gynaecol.** v. 22, n. 2, p. 261-274, 2008.

HUA, C. K. **Uso do metformin em mulheres obesas com síndrome dos ovários policísticos.** 73f. 2001. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

JIMÉNEZ-ORTEGA, V.; CANO, P.; CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: Effect of melatonin treatment. **Redox. Rep.** v. 14, n. 3, p.132-138, 2009.

JOCKERS, R.; MAURICE, P.; BOUTIN, J. A.; DELAGRANGE, P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? **Brit. J. Pharmacol.** v. 154, n. 6, p. 1182-1195, 2008.

JONES, K. L.; ARSLANIAN, S.; PETEROKOVA, V. A.; PARK, J. S.; TOMLINSON, M. J. Effect of metformin in pediatric patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** v. 25, n. 1, p. 89-94, 2002.

KADHIM, H. M.; ISMAIL, S. H.; HUSSEIN, K. I.; BAKIR, I. H.; SAHIB, A. S.; KHALAF, B. H.; ABDUL-REHMAN, H. S. Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. **J. Pineal Res.** v. 41, p. 189-193, 2006.

- KATSIKI, N.; HATZITOLIOS, A. I. Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.** v. 22, n. 6, p. 466-476, 2010.
- KORKMAZ, A.; TOPAL, T.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Role of melatonin in metabolic regulation. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v. 10, n. 4, p. 261-270, 2009.
- LADSON, G.; DODSON, W. C.; SWEET, S. D.; ARCHIBONG, A. E.; KUNSELMAN, A. R.; DEMERS, L. M.; WILLIAMS, N. I.; CONEY, P.; LEGRO, R. S. The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: A randomized double-blind study. **Fertil. Steril.** v. 95, n. 3, p. 1059-1066, 2011.
- LECRERC, I.; WOLTERSODOR, W. W.; SILVA XAVIER, G.; ROWE, R. L.; CROSS, S. E.; KORBUTT, G. S. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: Impact on glucose-stimulated insulin secretion. **Endocrinol. Metab.** v. 286, p. 1023-1031, 2004.
- LEGRO, R. S.; BARNHART, H. X.; SCHLAFF, W. D.; CARR, B. R.; DIAMOND, M. P.; CARSON, S. A.; STEINKAMPF, M. P.; COUTIFARIS, C.; MCGOVERN, P. G.; CATALDO, N. A.; GOSMAN, G. G.; NESTLER, J. E.; GIUDICE, L. C.; LEPPERT, P. C.; MYERS, E. R. Clomiphene, Metformin, or Both for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 356, p. 551-566, 2007.
- LEGRO, R. S.; KUNSELMAN, A. R.; DODSON W. C.; DUNAIF, A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: A prospective, controlled study in 254 affected women. **J. Clin. Endocrinol. metab.** v. 84, p. 165-169, 1999.
- LEON-BLANCO, M. M.; GUERRERO, J. M.; REITER, R. J.; CALVO, J. R.; POZO, D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both *in vivo* and *in vitro*. **J. Pineal Res.** v. 35, n. 3, p. 204-211, 2003.
- LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M. F.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J. A.; CARVALHO, C. R. O.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.** v. 275, 934-941, 1998.
- LISSONI, P.; BARNI, S.; BRIVIO, F.; ROSSINI, F.; FUMAGALLI, L.; ARDIZZOIA, A.; TANCINI, G. A biological study on the efficacy of low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin in the treatment of cancer-related thrombocytopenia. **Oncology.** v. 52, n. 5, p.360-362, 1995.
- LISSONI, P.; TANCINI, G.; PAOLOROSSO, F.; MANDALA, M.; ARDIZZOIA, A.; MALUGANI, F.; GIANI, L.; BARNI, S. Chemoneuroendocrine therapy of metastatic breast cancer with persistent thrombocytopenia with weekly low-dose epirubicin plus melatonin: A phase II study. **J. Pineal Res.** v. 26, n. 3, p. 169-173, 1999.
- MARCONDES, J. A. M.; BARCELLOS, C. R. G.; ROCHA, M. P. Síndrome dos ovários policísticos/Uma visão geral. In: VILAR, L. **Endocrinologia clínica.** Ed. 5, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 584-94.

MAHAMED, R. R.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C.; SOARES-JUNIOR, J. M. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. **Fertil. Steril.** v. 95, p. 1507-1509, 2011.

MAK, W.; DOKRAS, A. Polycystic ovarian syndrome and the risk of cardiovascular disease and thrombosis. **Semin. Thromb. Hemost.** v. 35, n. 7, p. 613-620, 2009.

MAN'CHEVA, T. A.; DEMIDOV, D. V.; PLOTNIKOVA, N. A.; KHARITONOVA, T. V.; PASHKEVICH, I. V.; ANISIMOV, V. N. Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrene in female mice. **Bull. Exp. Biol. Med. Oncology** v. 151, n. 3, p. 363-365, 2011.

MANNUCCI, E.; OGNIBENE, A.; CREMASCO, F.; BARDINI, G.; MENCUCC, A.;PIERAZZVOLI, E.; CIANI, S.; MESSERI, G.; ROTELLA, C. M.; Effects of metformin on glucagon-like peptides 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetics subjects. **Diab. Care.** v. 24, p. 489-494, 2001.

MANSFIELD, R.; GALEA, R.; BRINCAT, M.; HOLE, D.; MASON, H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. **Fertil. Steril.** v.79, p.956-562, 2003.

MEDEIROS, J. P.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO NETO, J. Ultrastructural analysis of pinealectomy and lack of light influence over collagen in the endometrium of rats. **Int. J. Morphol.** v. 21, n. 3, p. 231-235, 2003.

MELO, A. S.; MACEDO, C. S. V.; ROMANO, L. G. M.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Mulheres com síndrome dos ovários policísticos apresentam maior frequência de síndrome metabólica independentemente do índice de massa corpóreo. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 34, n. 1, p. 4-10, 2012.

MELO, A. S.; VIEIRA, C. S.; BARBIERI, M. A.; ROSA-E-SILVA, A. C.; SILVA, A. A.; CARDOSO, V. C.; REIS, R. M. FERRIANI, R. A.; SILVA-DE-SÁ, M. F.; BETTIOL, H. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. **Hum. Reprod.** v. 25, n. 8, p. 2124-2131, 2010.

MILLER, R. A.; BIRNBAUM, M. J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. **J. Clin. Invest.** v. 120, n. 7, p. 2267-2270, 2010.

MISRA, P.; CHAKRABARTI, R. The role of AMP Kinase in diabets. **Indian Med. Res.** v. 125, n. 3, p. 389-398, 2007.

MORAES, L. A. M., MACIEL, G. A. R.; SILVA DE SÁ, M. F.; MACHADO, L. V.; MARINHO, R. M.; BARACAT, E. C. **Síndrome dos Ovários Policísticos.** Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina p. 347-356, 2002.

MORIN-PAPUNEN, L. C.; VAUHKONEM, I.; KOIVUNEN, R. M.; RUOKONEM, A.; MARTIKAINEN, H. K.; TAPANAINEN, J. S. Endocrine and metabolic effects of metformin versus ethinyl estradiol-cyproterone acetate in obese women with

polycystic ovary syndrome: A randomized study. **J. Clin. Endocrinol. metab.** v. 85, p. 3161-3168, 2000.

MOTTA, E. L. A.; DOMINGUES, T. S.; SOARES-JUNIOR, J. M. Use of insulin sensitizers in the treatment of infertility in patients with polycystic ovary syndrome (POS). **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**; v. 34, n. 3, p. 99-101, 2012.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; KASHIDA, S.; TAKAYAMA, H.; YAMAGATA, Y.; KARUBE, A.; SUGINO, N.; KATO, H. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **J. Pineal Res.** v. 30, n. 1, p. 29-33, 2001.

NIES, A. T.; HOFMANN, U.; RESCH, C.; SCHAEFFELER, E.; RIUS, M.; SCHWAB, M. Proton Pump Inhibitors Inhibit Metformin Uptake by Organic Cation Transporters (OCTs). **PLoS ONE** v. 6, n. 7, p. 1-11, 2011.

OLIVEIRA, S. M. M.; SILVA, F. C. A.; VILAÇA JUNIOR, P. E. A.; SILVA, W. E.; FRANÇA, D. F.; SILVA-JÚNIOR, A. V.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C. Aspectos morfológicos do fígado de fetos de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) submetidos à iluminação constante. **Biol.** v. 68, p. 248-252, 2006.

PALOMBA, S.; FALBO, A.; LA SALA G. B. Effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome treated with gonadotrophins for in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection cycles: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Int. J. Obstet. Gynaecol.** v.120, n.3, p. 267-276, 2013.

PINHEIRO, S. A.; CLAPAUCH, R. Importância da Dosagem da 17OH-Progesterona na Síndrome dos Ovários Policísticos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 45, n. 4, p.361-368, 2001.

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.

QASIM, F. K.; MAULOOD, I. M. Effects of melatonin ,metformin and their combination on some lipid profiles and serum electrolytes in sucrose treated male albino rats. **J. Duhok Univ.** v. 12, n. 1, p. 129-137, 2009.

RASO, G. M.; ESPOSITO, E.; IACONO, A.; PACILIO, M.; CUZZOCREA, S.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; MELI, R. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. **Eur. J. Pharmacol.** v. 604, p. 125-131, 2009.

REHM, J. L.; CONNOR, E. L.; REEDER, S. B. Non-alcoholic fatty liver disease in an adolescent with polycystic ovary syndrome. **J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.** v. 24, p. 25-26, 2011.

REIS, R. M.; SILVA A. C. J. S.; NAVARRO P. A. A. S.; SÁ, M. F. S.; FERRIANI, R. A. **Síndrome dos Ovarios Policísticos.** In: FERRIANI R.A. Protocolos de Conduta em Infertilidade Conjugal – Setor de Reprodução Humana do

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP – 1ª edição. São Paulo. Conexão Brasil, 2004, p. 27-48.

REITER, R. J. The mammalian pineal gland: Structure and function. **Am. J. Anat.** v. 162, n. 4, p. 287-313, 1981.

REITER, R.J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: A multitasking molecule. **Prog. Brain Res.** v. 181, p. 127-151, 2010.

RESENDE, L. O. T.; REIS, R. M.; FERRIANI, R. A.; VIREQUE, A. A.; SANTANA L. F.; SILVA, A. C. J. S. R.; MARTINS, W. P. Concentração dos hormônios esteroides no fluido folicular de folículos ovarianos maduros e imaturos de pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas à fertilização in vitro. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, n.9, p. 447-453, 2010.

RODRIGUES, J. K.; DIB, L. A.; FERRIANI, R. A.; JORDÃO-JUNIOR, A. A.; NAVARRO, P. A. A, S. Marcadores séricos de estresse oxidativo e resultados dos procedimentos de reprodução assistida em pacientes inférteis com síndrome dos ovários policísticos e controles. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, n. 3, p. 118-125, 2010.

RODRÍGUEZ, M. I.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; LÓPEZ, A.; GARCÍA, J. A.; ORTIZ, F.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. **J. Pineal Res.** v. 42, n. 3, p. 272-279, 2007.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling inflammation: impact on healthspan and lifespan *J. Mol. Med.* v. 89, p.667- 676, 2011.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J.; MEDIAVILLA, M. D.; TUCKER, H. A. Influence of melatonin on mammary growth: *In vivo* and *in vitro* studies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.194, n. 2, p. 103-107, 1990.

SEKHON, L. H. GUPTA, S.; KIM, Y. AGARWAL, A. Female Infertility and Antioxidants. **Curr. WOM. Health. Rev.** v. 6, n. 2, p.84-95, 2010.

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. 331-338, 2000.

SIEBERT, T. I.; KRUGER, T. F.; STEYN, D. W.; NOSARKA, S. Is the addition of metformin efficacious in the treatment of clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome? A structured literature review. **Fertil. Steril.** v. 86, n. 5, p.1432-1437, 2006.

SOARES, G. M.; VIEIRA, C. S.;MARTINS, P. W.; REIS, R. M.; SÁ, M. F.; FERRIANI, R. A.; Metabolic and cardiovascular impact of oral contraceptives in polycystic ovary syndrome. **Int. J. Clin. Pract.** v. 63, n. 1, p. 160-169, 2009.

SOARES-JUNIOR, J. M.; BARACAT, E. C. The use of combined oral contraceptives in the polycystic ovary syndrome. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, n. 11, p. 523-524, 2010.

- SOARES-JUNIOR, J. M.; HOLANDA, F. S.; BARACAT E. C. Melatonin and puberty: what is the evidence? **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 30, n.10, p. 483-485, 2008.
- SOUSA NETO, J. A.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonin and cancer - A review of the literature. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 51, n.1, p. 49-58, 2005.
- SPINEDI, E.; MARIANI, V.; BULFON, M.; COLOMBANI-VIDAL, M.; SCAGLIA, H. Analysis of the hypothalamic-pituitary-ovary axis in the neonatally-androgenized female rat. **J. Endocrinol. Invest.** v. 13, p. 481-488, 1990.
- STEIN, I. F.; LEVENTHAL, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 29, n. 2, p. 181-191, 1935.
- TAMURA, H.; Nakamura, H.; Korkmaz, A.; Manchester, L. C.; Tan, D.-X.; Sugino, N.; Reiter, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil. Steril.** v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.
- TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J. Pineal Res.** v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.
- TEIXEIRA, A. A. C.; 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.
- TEIXEIRA, A. A. C.; SIMÕES, M. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SOARES JUNIOR, J. M. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **Int. J. Morphol.** v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.
- THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Hum. Reprod.** v.19, n.1, p. 41-47, 2004.
- VANKY, E.; ZAHLSEN, K.; SPIGSET, O.; CARLSEN, S. M. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.** v. 83, p. 1575-1578, 2005.
- VASSILATO, E.; LAFOYIANNI, S.; VRYONIDOU, A.; IOANNIDIS, D.; KOSMA, L.; KATSOULIS, K.; PAPAVALASSILIOU, E.; TZAVARA, I. Increased androgen bioavailability is associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod.** v. 25, n. 1, p. 212-220, 2010.
- VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatol.** v. 49, n. 1, p. 306-317, 2009.
- YARAK, S.; BAGATIN, E.; HASSUN, K. M.; PARADA, M. O. A. B.; TALARICO-FILHO, S.; Hiperandrogenismo e pele: Síndrome do ovário policístico e resistência periférica a insulina. **An. Bras. Dermatol.** v. 80, n. 4, p. 395-410, 2005.

XU, A.; VANHOUTTE, P. M. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** v.302, p. H1231-H1240, 2012.

ZHDANOVA, I. V.; WURTMAN, R. J. Efficiency of melatonin as a sleep-promoting agent. **J. Biol. Rhythms** v. 12, p. 644-650, 1997.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, .; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J. Clin. Invest.** v. 108, n. 8, p.1167-1174, 2001.

ZOU, M. H.; KIRKPATRICK, S. S.; DAVIS, B. J.; NELSON, W. G.; SCHLATTNER, U.; NEUMANN, D.; BROWNLEE, M.; FREEMAN, M. B.; GOLDMAN, M. H. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic C drug metformin *in vivo*. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 43940-43951, 2004.

## CAPÍTULO II

Artigo submetido à Revista Plos One

Melatonina associada ou não ao cloridrato de metformina assegura a implantação em ratas albinas após tratamento para policistose ovariana

Metformina/melatonina na implantação

Ana J. J. M. Lemos<sup>1</sup>; Álvaro A. C. Teixeira<sup>1</sup>; Fabiano S. Costa<sup>2</sup>; Christina A. Peixoto<sup>3</sup>; Solange B. Silva<sup>1</sup>; Eduardo P. D. Silva<sup>1</sup>; Cintia G. M. Ferreira<sup>1</sup>; Rayana L. Luna<sup>3</sup>; Valéria Wanderley-Teixeira<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil.*

<sup>2</sup> *Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil.*

<sup>3</sup> *Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz – Recife, Brazil.*

\*Autor para correspondencia. UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

*Endereço de e-mail:* [valeria@dmfa.ufrpe.br](mailto:valeria@dmfa.ufrpe.br) (V. Wanderley-Teixeira)

## **Resumo**

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da combinação do cloridrato de metformina e melatonina no tratamento da síndrome dos ovários policísticos (SOP) e sua ação na melhoria da viabilidade da fertilidade em ratas.

**Materiais e Métodos:** Ratas foram induzidas à SOP pela iluminação constante, e posteriormente tratadas com cloridrato de metformina (50mg/100g), melatonina (200µg/100g) ou a associação destes fármacos durante 10 dias. Foi realizado estudo histopatológico, histoquímico e métodos quantitativos dos sítios de implantação, análise ultrassonográfica, peso e histologia dos ovários. No plasma, foram identificados os níveis de estradiol e progesterona das ratas, bem como o acompanhamento gestacional.

**Resultados:** Os tratamentos farmacológicos reduziram o tempo de cópula, aumentaram os níveis plasmáticos de progesterona, número e o peso dos filhotes e reduziram os níveis plasmáticos de estrógeno e teor de fibras colágenas no útero.

**Conclusões:** A associação do cloridrato de metformina com melatonina proporcionaram os melhores resultados em comparação aos demais tratamentos chegando a igualar-se aos resultados dos animais do grupo controle nos parâmetros analisados, de forma a regular o sistema reprodutor, resultando na melhoria da viabilidade da implantação, redução do tempo necessário para a prenhez, melhorando a interação blastocisto-endométrio e desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: Síndrome dos ovários policísticos, Cloridrato de metformina; melatonina; reprodução; estradiol; progesterona.

## **Introdução**

Mulheres em idade reprodutiva têm prevalência em torno de 10% para a presença da síndrome dos ovários policísticos (SOP), este distúrbio, ainda controverso, possui quadro clínico bastante heterogêneo, caracterizado principalmente por amenorreia, hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia e presença pelo exame ultrassonográfico de 10 ou mais cistos foliculares subcapsulares, caracterizando esta síndrome como uma das principais causas de infertilidade feminina [1-3]. Um dos modelos experimentais utilizados em pesquisas para a indução à SOP em ratas é a iluminação constante [4-6].

O tratamento da SOP varia de acordo com os sintomas apresentados pelas pacientes e ocorre principalmente pela administração de antiandrogênicos, hipoglicemiantes como o cloridrato de metformina, com associação ou não a hormônios contraceptivos, já em casos clínicos do distúrbio em pacientes que desejam tratar a infertilidade, o cloridrato de metformina é a droga mais utilizada e considerada mais segura em comparação com os demais tratamentos [7,8].

Alguns autores têm associado à patogênese de doenças que causam a infertilidade, como a SOP, endometrioses e outras doenças do sistema reprodutor feminino, ao estresse oxidativo [9]. Por esta razão, pesquisas têm sugerido a utilização de antioxidantes como a melatonina, pela sua comprovação experimental de eficiência no aumento da taxa de fertilização e redução dos níveis de colesterol circulatório, entre outros benefícios [10,11].

A literatura relata que a melatonina é um hormônio que tem como principal função informar sobre os ciclos sazonais ao organismo, controlar as ciclicidades e funções reprodutivas, além de ser um excelente agente antioxidante de largo espectro. A melatonina é produzida pela glândula pineal e seus níveis durante a gestação tendem a

umentar, comprovando sua importância na fisiologia gestacional [10,12,13]. Trabalhos recentes propõem a associação do cloridrato de metformina com a melatonina no tratamento de diversas patologias, levando à redução do crescimento do tumor de Ehrlich e aumento do período de latência do adenocarcinoma mamário *in vivo* em ratos transgênicos; além de obter bons resultados no tratamento de carcinomas de pele reduzindo os tumores em número e tamanho, onde a terapia combinada mostrou melhores resultados quanto aos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em comparação com as monoterapias destas drogas em ratas [14-16]. No entanto, não há relatos na literatura sobre a associação do cloridrato de metformina e melatonina para o tratamento da polícistose ovariana e sua viabilidade na melhoria da implantação. Assim, propôs-se testar a hipótese de que a melatonina pode melhorar o desempenho do fármaco cloridrato de metformina em modelos experimentais induzidos a ovários policísticos, por meio da iluminação constante, melhorando a viabilidade concepitiva. Dessa forma, analisou-se o tempo de acasalamento, os ovários, sítios de implantação, níveis plasmáticos de estradiol e progesterona, bem como o período gestacional para identificação morfológica de possíveis malformações fetais, aferição de peso e quantificação dos filhotes.

## **Materiais e Métodos**

### *Instalação do Bioensaio*

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 50 ratas albinas *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando em torno de 200±30g, procedentes do Biotério do mesmo Departamento.

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 estabeleceram 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 coletados esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram separadas, ao acaso, em cinco grupos constituídos por 10 fêmeas cada, sendo cinco para fins de análise histológica dos sítios de implantação e ovários; níveis plasmáticos de estradiol e progesterona ao sétimo dia de gestação e as demais ratas para acompanhamento gestacional e identificação morfológica de possíveis malformações fetais, aferição de peso e quantificação dos filhotes. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, sob número de protocolo 23081.009130/2010.

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

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

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

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

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

### *Indução à Síndrome dos Ovários Policísticos*

Para indução da SOP, as ratas dos grupos II, III, IV e V foram submetidas a estímulo luminoso constante, que foi alcançado utilizando-se uma caixa de madeira com área 0,5m<sup>3</sup>, com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 500lux. Estas lâmpadas permaneceram acesas ininterruptamente por um período de 100 dias, tempo suficiente para o desenvolvimento das características clínicas da SOP [17-19]. A confirmação da SOP foi realizada mediante observações em ultrassonografias.

### *Ultrassonografia*

As análises ultrassonográficas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. As imagens foram capturadas em duplo cego antes e após tratamento das ratas, através da utilização da máquina de ultrassom da marca ESAOTE/ Modelo MyLab™ 30 GOLD com transdutor linear de frequência 10MHz. Para tanto, as ratas foram anestesiadas com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular e imobilização manual. O abdômen da rata foi umedecido com álcool 70%, em seguida, identificou-se o tamanho dos ovários tomando-se como referência a posição caudal aos rins e a hipocogêneidade do ovário.

### *Tratamento com Cloridrato de Metformina*

O cloridrato de metformina foi administrado após a indução à SOP, via gavagem, na dosagem de 50mg/100g de peso corporal do animal, diluído em 0,5mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al. [20], durante dez dias consecutivos.

### *Tratamento com Melatonina*

A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada após a indução à SOP, na dose de 200 µg/100g de peso corporal do animal, por meio de injeções subcutâneas no início da noite (18:00). A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02mL) e diluída em 0,2mL de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) nas ratas do grupo III e do grupo V, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima et al. [17] durante dez dias consecutivos.

### *Acasalamento dos animais e confirmação de copula*

Após 100 dias de experimento e respectivos tratamentos, as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas, diariamente, no início da noite (18:00h). Na manhã (06:00h) do dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozoides nos esfregaços, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional. Para a coleta dos esfregaços vaginais, foram utilizadas hastes munidas, nas extremidades, com chumaços de algodão umedecidos em solução salina. Logo após a coleta do material, as células foram transferidas para lâminas histológicas, através de movimentos rotatórios da haste. Essas lâminas foram imediatamente mergulhadas em uma solução de álcool-éter, em partes iguais, e a seguir, foram coradas pelo método Shorr-Harris.

### *Coleta de sangue para dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol e progesterona*

As ratas foram imobilizadas em caixas de madeira e o sangue foi coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) ao sétimo dia de gestação. Após centrifugação refrigerada, os plasmas foram acondicionados em microtubos de 1,5mL e congelados a -20°C até o momento das dosagens [17,21,22]. Os níveis plasmáticos do estradiol e progesterona foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de KIT's comerciais (ADI 900-100 lot n.:05121109) e (ADI 900-011 lot n.: 10191116B), respectivamente, ambos da marca Enzo LifeSciencePRO. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata.

### *Histologia e morfometria das fibras colágenas uterinas*

Ao sétimo dia gestacional as fêmeas de todos os grupos foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular. Foram coletados os cornos uterinos contendo os sítios de implantação e os ovários. Os ovários foram pesados em balança analítica e os sítios de implantação quantificados com auxílio de uma lupa. Em seguida todas as amostras foram mergulhadas imediatamente em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente os materiais foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.) e os sítios de implantação corados pelo sírius-red e contracorado pelo fast-green (RG). Em consequente as lâminas foram analisadas em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50 para análise histopatológica. Para quantificação das alterações em pixels do material corado pelo RG

foi utilizado o Gimp2.6 software (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) e os resultados contabilizados foram submetidos ao teste estatístico.

#### *Monitoramento da cópula*

As ratas foram monitoradas para determinação do tempo de acasalamento. Quando o acasalamento foi confirmado, as ratas foram acompanhadas e pesadas diariamente até o 21º dia de gestação, ou seja, até o nascimento dos filhotes, para identificar possíveis abortos ou perda de peso, além de quantificação dos filhotes, aferição do peso com auxílio da balança analítica e análise macroscópica dos neonatos quanto à presença de malformação visível na cabeça, tronco ou membros.

#### *Análise estatística*

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a um intervalo de 95% de significância.

## **Resultados**

### *Ovários*

A análise estatística das dimensões ovarianas nas ultrassonografias mostrou aumento significativo nas fêmeas de todos os grupos que foram induzidas a SOP. Entretanto, verificaram-se após tratamento redução significativa destas dimensões nas ratas tratadas com melatonina, cloridrato de metformina e associação desses fármacos (Figuras 1 e 2) (Tabela 1).

### *Acompanhamento do peso das ratas durante o tratamento e gestação*

Estatisticamente não houve diferença significativa entre as ratas quanto à aferição do peso durante o tratamento, porém, durante a gestação, as ratas do grupo SOP + Placebo apresentaram menor ganho de peso, diferindo dos grupos controle e SOP + Mel (Tabela 1).

### *Análise do peso dos ovários*

Os tratamentos com os fármacos melatonina e associação deste com cloridrato de metformina promoveram nas ratas menores pesos dos ovários em relação aos ovários das ratas do grupo SOP + Placebo, porém nenhum dos tratamentos apresentou valores similares aos observados nas ratas do grupo controle (Tabela 1).

### *Tempo de cópula, análise da fertilidade das matrizes e avaliação da prole*

O número de dias necessários para confirmação da cópula (TC) foi significativamente maior no grupo SOP + Placebo. Além disso, apenas 30% das fêmeas deste grupo viabilizaram a cópula. Por sua vez a reposição com melatonina não induziu diferenças significativa em relação aos grupos controle e grupo SOP + Placebo. Por outro lado, os tratamentos com cloridrato de metformina e a associação dos fármacos reduziram significativamente o tempo de acasalamento (Tabela 1). O grupo SOP + Placebo apresentou redução estatisticamente significativa do número de sítios de implantação e de filhotes a termo (Tabela 1). Não foram observados vestígios de reabsorção nos cornos uterinos ao sétimo dia de gestação em todos os grupos experimentais. Do mesmo modo, não houve natimortos ou identificação morfológica de

malformações na prole, porém foi observado menor peso dos filhotes no grupo SOP + Placebo (Tabela 1).

#### *Níveis de estradiol e progesterona*

As dosagens de estradiol no plasma das ratas que foram induzidas a SOP e receberam apenas placebo durante os dias de tratamento, foram estatisticamente maiores que os valores observados nos demais grupos experimentais. Em relação ao hormônio progesterona, os grupos SOP + Mel, SOP + Met e SOP + Mel + Met apresentaram as maiores médias em relação aos grupos controle e SOP + Placebo, sendo mais expressiva neste último grupo (Tabela 1).

#### *Análise histológica e histoquímica*

Os sítios de implantação das ratas de todos os grupos experimentais apresentaram-se bem preservados, totalmente inseridos na parede do útero (Figura 3A). Histologicamente esses sítios mostraram-se constituídos por trofoblastos, alguns com atividade mitótica, citotrofoblastos poliplóides e rica vascularização (Figura 3A). Os ovários das ratas do grupo controle revelaram presença de corpos lúteos característicos, com células luteínicas bem preservadas, além da presença de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3B). Entretanto nas ratas do grupo SOP + Placebo, muitos folículos mostraram-se atresícos, com presença discreta de corpos lúteos (Figuras 3C a 3F). Os grupos experimentais que receberam tratamento com cloridrato de metformina ou associação dos fármacos apresentaram características histológicas semelhantes ao grupo controle.

Em relação à presença de fibras colágenas no útero das ratas do grupo induzido a SOP e tratado apenas com placebo mostrou maior intensidade pelo corante picro-sírius em relação aos demais grupos. Entretanto, a associação de cloridrato de metformina e melatonina apresentou maior redução da marcação para colágeno, porém não diferindo estatisticamente do grupo controle (Figura 4).

## **Discussão**

As ratas induzidas a SOP + Placebo apresentaram menor ganho de peso durante a gestação, este resultado complementa-se a redução do número de sítio de implantação verificada nas ratas deste mesmo grupo, tendo como consequência reduzido número de filhotes, já que quanto maior o número de implantações, maior o ganho de peso. Além disso, neste grupo foi observado pela análise histoquímica aumento no teor de fibras colágenas nos cornos uterinos, o que pode ter dificultado a interação endométrio-blastocisto. Por outro lado, as ratas que receberam tratamentos com os fármacos, associados ou não, apresentaram número de sítios de implantação e de filhotes, bem como peso dos filhotes semelhantes ao grupo controle. Entretanto, com relação ao teor de fibras colágenas apesar de os tratamentos farmacológicos terem reduzido os teores de fibras colágenas, somente o grupo com associação apresentou valores semelhantes ao controle.

Endocrinologicamente os valores plasmáticos de progesterona foram maiores nos grupos em que as ratas foram tratadas com os fármacos associados ou não, sendo mais expressivo na associação, sugerindo um efeito sinérgico destes sobre a liberação de progesterona. Este fato pode ter ocorrido possivelmente devido às funções da melatonina em proteger as células da granulosa, as quais são precursoras do corpo lúteo

produtor de progesterona, quando administrada via oral 100µg/100g peso por 60 dias em ratas [23]. Além de ter efeito antioxidante nos folículos em humanos em experimento de incubação celular e regularem os receptores de progesterona na concentração de 100mg/mL [24]. Da mesma forma, a metformina administrada na dose de 500mg/dia durante 35 dias promoveu aumento plasmático da progesterona em 90% das mulheres submetidas ao tratamento da SOP, as quais voltaram a ovular rapidamente [25,26]. Em cultura de células foi demonstrado que o cloridrato de metformina promove o restabelecimento dos receptores de progesterona e melhoria de seus marcadores genéticos [27]. Desta maneira, é justificada a ocorrência de valores aumentados de progesterona quando associados o cloridrato de metformina à melatonina comprovando sinergismo de seus efeitos.

Os níveis de estrógeno nas ratas do grupo SOP + Placebo apresentaram-se elevados. Isto ocorreu provavelmente porque a reação fisiológica em indivíduos com essa síndrome possui irregularidades na produção desse hormônio, além disso, o não tratamento da síndrome pode levar a conversão de androgênios a hormônios estrógenos, podendo ocasionar em alguns casos, câncer endometrial pelo excesso de estrógeno, bem como proporcionar o aumento do estresse oxidativo e consequente aumento na ativação de citocinas no organismo e fibromas no útero [28, 29]. Este aumento hormonal justifica também o aumento no teor de fibras colágenas no útero das ratas dos grupos SOP + Placebo, pois segundo Batista et al. [30], as células responsáveis pela síntese das fibras colágenas, os fibroblastos, são estrógeno dependentes, e aumentam sua síntese em situações de elevados níveis estrogênicos. Desta forma, a recuperação dos níveis plasmáticos de estrógenos, a valores similares ao controle, nas fêmeas tratadas com os fármacos associados ou não, promoveu redução significativa no teor dessas fibras,

principalmente no grupo SOP + Mel + Met. Além disso, o restabelecimento dos níveis estrogênicos a valores semelhantes ao controle no grupo SOP + Mel + Met proporcionou a redução do período necessário para prenhez quando comparado ao grupo SOP + Placebo que apresentaram um período mais longo. Isto pode ser explicado devido ao fato de que quando ratas são submetidas à iluminação constante para indução da SOP, apresentam quebra da ciclicidade estral, estabelecendo um quadro de estro permanente com elevados níveis de estrógeno, necessitando de um período maior para a retomada da ciclicidade após interrupção do estímulo luminoso [19].

O tratamento com os fármacos, associados ou não, levaram a uma redução nas dimensões ovarianas e também à redução do peso dos ovários, apesar de não terem alcançado valores semelhantes ao grupo sem SOP. Apesar disso, dentre os tratamentos, apenas as ratas que receberam cloridrato de metformina permaneceram com as médias do peso semelhante ao peso do ovário das ratas do grupo induzido à SOP que recebeu apenas placebo. Provavelmente esses achados estão relacionados à atuação de forma indireta do cloridrato de metformina nas células ovarianas. Pois, a melatonina é conhecida por atuar diretamente neste tecido através de seus receptores, além de estar envolvida na regulação do eixo hipotalâmico inibindo a liberação de hormônios como o folículo estimulante. A melatonina possui efeitos anti-inflamatórios, antitóxicos, contra radicais livres e reduz citocinas, intensificando a proteção e auxiliando na redução dos cistos da síndrome [17,31]. Outra função da melatonina é regular o hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) através de seus receptores MT1 e MT2 que são membros dos receptores acoplados a proteína G 7-transmembranase nas células granulosas luteínicas, atuando na inibição da expressão dos receptores de GnRH e promovendo a preservação do corpo lúteo, consequente aumento da produção de progesterona e redução dos cistos

foliculares [32,33]. Já a cinética do cloridrato de metformina, tem característica de atuar nas células secretoras da teca ovariana através da ativação da enzima AMPK (Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase), enzima que atua nos ovários promovendo a inibição da atividade da CYP17 (enzima 17- $\alpha$  hidroxilase-17,20-liase), resultando na diminuição da conversão de andrógenos, estabilizando a produção de hormônios esteroides, além de promover o aumento de produção de progesterona [34-36]. Assim, observou-se melhoria mais significativa do grupo com SOP + Mel bem como do grupo tratado com a associação dos fármacos, mostrando que a associação destas drogas melhora o estado fisiológico hormonal das ratas, quando comparadas às ratas do grupo que recebeu apenas cloridrato de metformina.

Concluiu-se que a combinação farmacológica proposta é viável pela retomada da ciclicidade, redução dos níveis plasmáticos de estrógeno a níveis normais, levando a redução no teor de fibras colágenas no endométrio e promovendo aumento significativo de progesterona, resultando na viabilidade da implantação, redução do tempo de cópula, melhoria da interação blastocisto-endométrio proporcionando melhor desenvolvimento fetal.

## Referências

1. Jakubowicz D, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE (2002) Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87:524-529.
2. Yarak S, Bagatin E, Hassun KM, Parada MOAB, Talarico-Filho S (2005) Hiperandrogenismo e pele: Síndrome do ovário policístico e resistência periférica a insulina. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80:395-410.
3. Gambineri A, Patton L, Altieri P, Pagotto U, Pizzi C, Manzoli L (2012) Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: Results from a long-term prospective study. *Diabetes* 61:2369-2374.
4. Singh KB (2005) Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: An update. *Fertility and Sterility* 84:1228-34.
5. Singh KB (2008) Rat models of polycystic ovary syndrome. *Sourcebook of Models for Biomedical Research* 5:405-10.
6. Shi D, Vine DF (2012) Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility* 98:185-93.
7. Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H (2003) Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertility and Sterility* 79:956-962.
8. Ganie MA, Khurana ML, Eunice M, Gulati M, Dwivedi SN, Ammini AC (2004) Comparison of efficacy of spironolactone with metformin in the management of polycystic ovary syndrome: an open-labeled study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:2756-2818.
9. Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, Agarwal A (2010) Female Infertility and Antioxidants.

Current Women's Health 6:84-95.

10. Teixeira AAC, Simões MJ, Evêncio-Neto J, Wanderley-Teixeira V (2002) Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. *Revista Chilena de Anatomia* 20:145-149.

11. Tamura H, Nakamura H, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ (2009) Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility* 1:328-343.

12. Anisimov VN, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Tyndyk ML, Yurova MN (2010) Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. *Cell Cycle* 9:188-197.

13. Berger J (2008) A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. *Pathology and Biology* 56:286-291.

14. Anisimov VN (2003) Effects of exogenous melatonin-A Review. *Toxicology and Pathology* 31:589-603.

15. Vilar L, Canadas V, Arruda MJ, Arahata C, Agra R, Pontes L (2010) Comparison of metformin, gliclazide MR and rosiglitazone in monotherapy and in combination for type 2 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 54:311-318.

16. Man'cheva TA, Demidov DV, Plotnikova NA, Kharitonova TV, Pashkevich IV, Anisimov VN (2011) Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis, and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrene in female mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 151:339-342.

17. Prata-Lima MF, Baracat EC, Simões MJ (2004) 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* 37:987-995.

18. Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley-Teixeira V, Soares-Junior JM (2004) Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *International Journal of Morphology* 22:189-194.
19. Salvetti NR, Canal AM, Gimeno EJ, Ortega HH (2004) Polycystic Ovarian Syndrome: Temporal characterization of the induction and reversion process in an experimental model. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41:389-395.
20. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di-Girolamo G, Gonzalez C (2006) The mechanisms involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Molecular Human Reproduction* 12:475-481.
21. Elias JAZ, Delfino VDA, Barbosa DS, Fabris BA, Matsuo T (2008) Efeito do Ramipril e da Sinvastatina sobre o estresse oxidativo de ratos diabéticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 52 1131-1138.
22. Vilaça-Junior PEA, Soares AF, Wanderley-Teixeira V, Araújo ACC, Teixeira AAC (2012) Efeito da administração pré-natal da dexametasona em ratas sobre os perfis glicídicos e hematológicos materno e da prole. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64:606-614.
23. Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, et al. (2011). Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *Journal of Pineal Research* 51:207-213.
24. Chuffa LGA, Seiva FRF, Fávoro WJ, Teixeira GR, Amorim JPA, Mendes LO, et al. (2009) Melatonin reduces LH, 17beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. *Reproduction Biology and Endocrinology* 9:1-9.

25. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R (1998) Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine* 338:1876-1880.
26. Meenakumari KJ, Agarwal S, Krishna A, Pandey LK (2004) Effects of metformin treatment on luteal phase progesterone concentration in polycystic ovary syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37:1637-1644.
27. Xie Y, Wang Y, Yu L, Hu Q, Li L, Zang Y, Liao Q (2011) Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 126:113-120.
28. Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S (1994). Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: Relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 79:1355-1360.
29. Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA (2001) Allelic variants of aromatase and the androgen and estrogen receptors: Toward a multigenic model of prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research* 7:3092-3096.
30. Batista CPA, Medeiros PL, Teixeira AAC; Wanderley-Teixeira V (2009) Análises histoquímica e morfométrica de lesões endometrióticas induzidas em ratas e tratadas com dexametasona. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine* 45:147-153.
31. Gonçalves AL, Ribeiro RT, Peres MFP (2012) Melatonin in headache disorders. *Headache Medicine* 3:61-69.

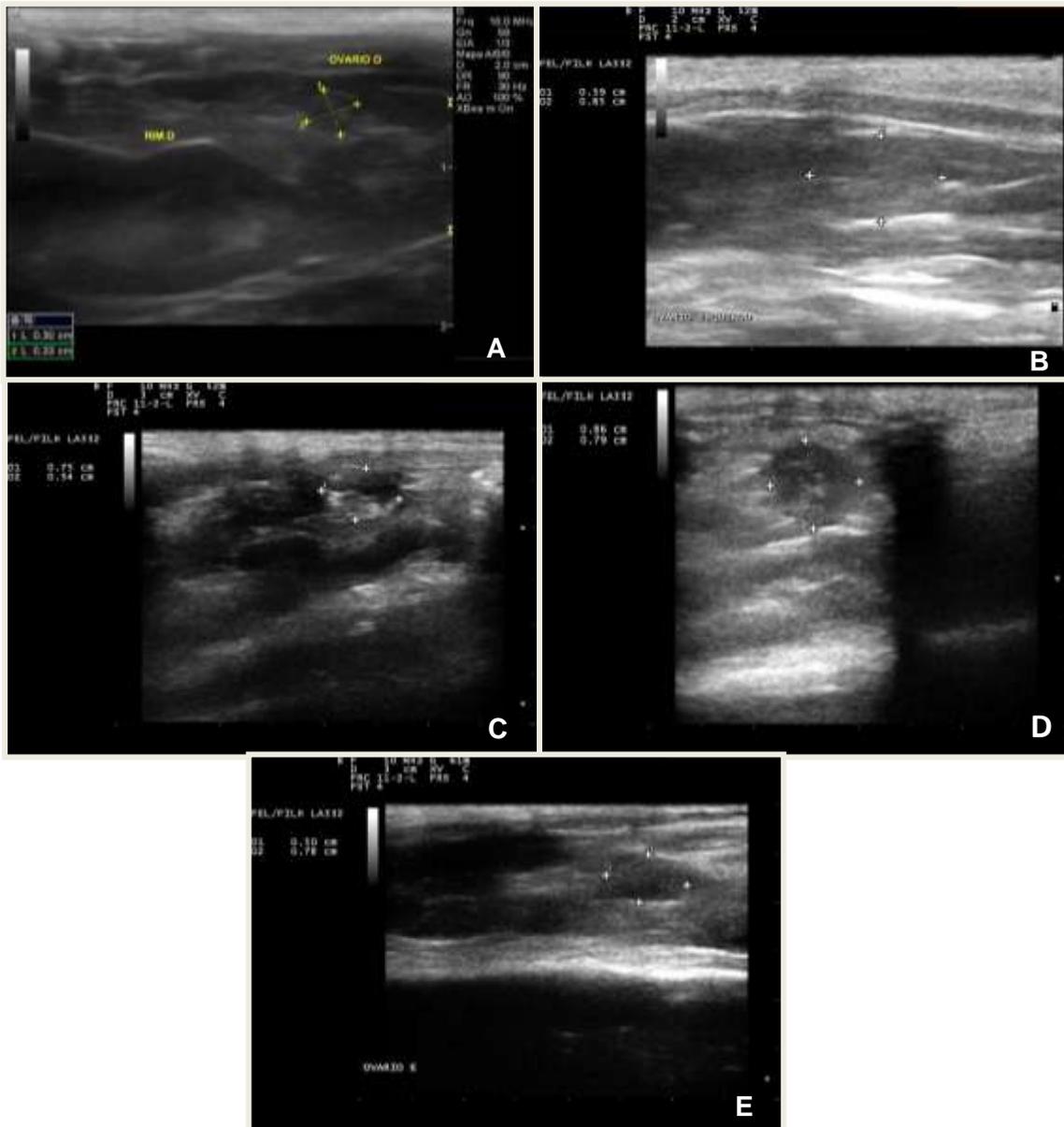
32. Woo MMM, Tai C, Kang SK, Nathwani S, Pang SF, Leung CK (2010) Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:4789-4797.
33. Metallinou C, Asimakopoulos B, Schröer A, Nikolettos N (2007) Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reproduction Science* 14:737-749.
34. Attia GR, Rainey WE, Carr BR (2001) Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertility and Sterility* 76:517-524.
35. Diamanti-Kandaraki E, Economou F, Palimeri S, Christakou C (2010) Metformin in polycystic ovary syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1205:192-198.
36. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN (2010) Metformin: An old medication of new fashion: Evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology* 162:193-212.

**Tabela 1:** <sup>1</sup>Médias dos dados experimentais das ratas submetidas ao modelo experimental de síndrome dos ovários policísticos.

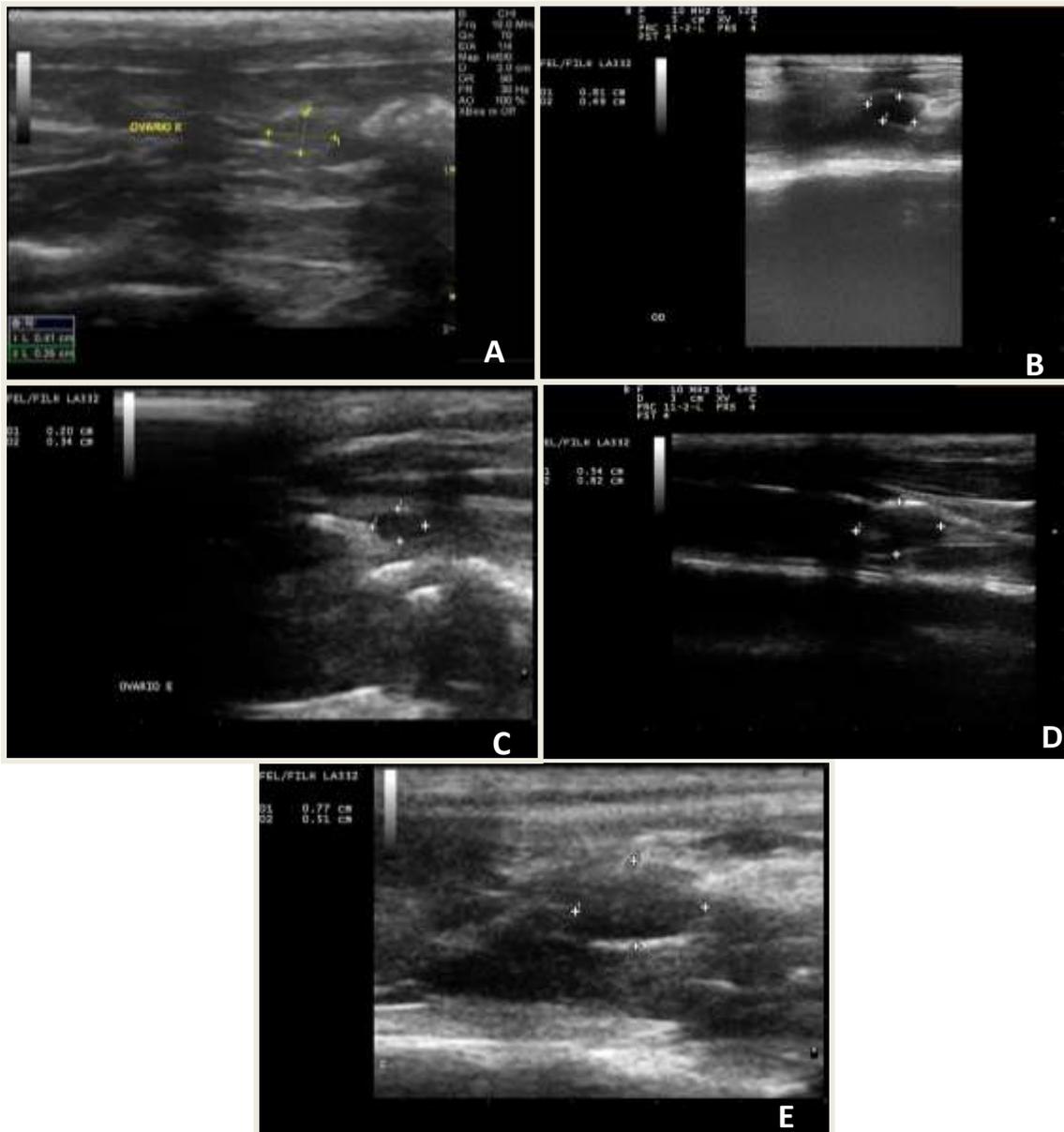
Medida do diâmetro do ovário por ultrassonografia após indução da SOP (USa), medida do diâmetro do ovário após o tratamento (USd), peso das ratas durante o tratamento (PT), número de dias necessários para confirmação da cópula (TC), peso das ratas durante a gestação (PG), Ganho de peso durante a gestação (Gp), Número de sítios de implantação (SI), peso dos ovários (PO), níveis plasmáticos de estradiol (E) e progesterona (Prog) ao sétimo dia de prenhez, número de filhotes (Nº de filhotes) e peso dos filhotes (peso filhotes).

<b>Grupos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>F<sup>p</sup></b>
<b>USa(cm<sup>2</sup>)</b>	0,08±0,01a	0,46±0,10b	0,57±0,12b	0,65±0,17b	0,52±0,13b	12,53 <sup>0,001</sup>
<b>USd(cm<sup>2</sup>)</b>	0,11±0,02a	0,36±0,04b	0,24±0,05a	0,26±0,19a	0,27±0,86a	22,94 <sup>0,001</sup>
<b>PT(g)</b>	228,80±22,12a	240,76±17,67a	229,80±17,56a	226,86±12,65a	226,86±12,65a	0,4075 <sup>0,8011</sup>
<b>PG(g)</b>	245,88±14,16a	255,17±20,21a	242,91±15,75a	237,22±27,74a	244,37±24,75a	0,4724 <sup>0,7554</sup>
<b>TC(dias)</b>	2,8±2,49a	11,4±3,84b	7,8±1,09ab	3,2±2,58a	3,8±3,83a	7,901 <sup>0,0005</sup>
<b>Gp(g)</b>	122,6±19,56a	62,8±15,75b	110,8±20,43a	98,6±25,33ab	98,2±21,56ab	3,9368 <sup>0,0162</sup>
<b>SI</b>	10,0±0,77a	5,6±1,03b	8,4±1,51a	8,0±1,22a	10,2±1,64a	2,9947 <sup>0,0449</sup>
<b>PO (g)</b>	0,05±0,014a	0,13±0,023b	0,09±0,006c	0,09±0,020bc	0,10±0,026c	9,787 <sup>0,0001</sup>
<b>E (pg/mL)</b>	469,76±21,19a	565,08±29,91b	509,75±21,20a	472,24±18,91a	487,85±17,11a	15,752 <sup>0,0001</sup>
<b>Prog.(pg/mL)</b>	536,14±6,42a	448,93±2,67b	563,40±5,06c	564,24±2,74c	581,23±9,32d	22,511 <sup>0,0329</sup>
<b>Nº de filhotes</b>	10,8±0,44a	2,6±3,57b	10,4±1,94a	9,2±0,44a	9,8±1,30a	15.1711 <sup>0,001</sup>
<b>Peso filhotes(g)</b>	6,96±1,05a	5,70±0,65b	6,49±0,74a	6,44±0,74a	6,66±1,12a	5,532 <sup>0,001</sup>

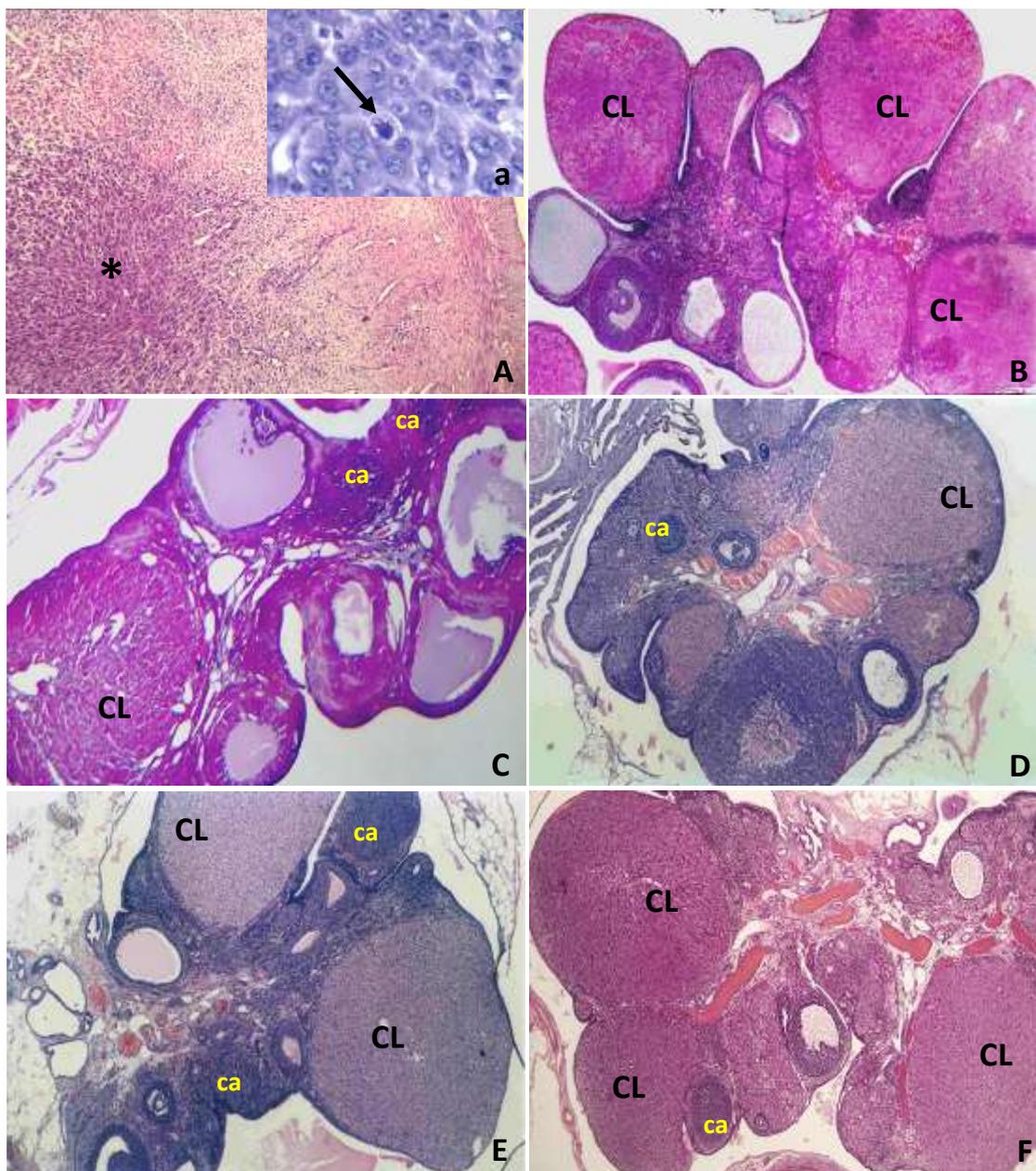
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra nos parâmetros analisados não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05)



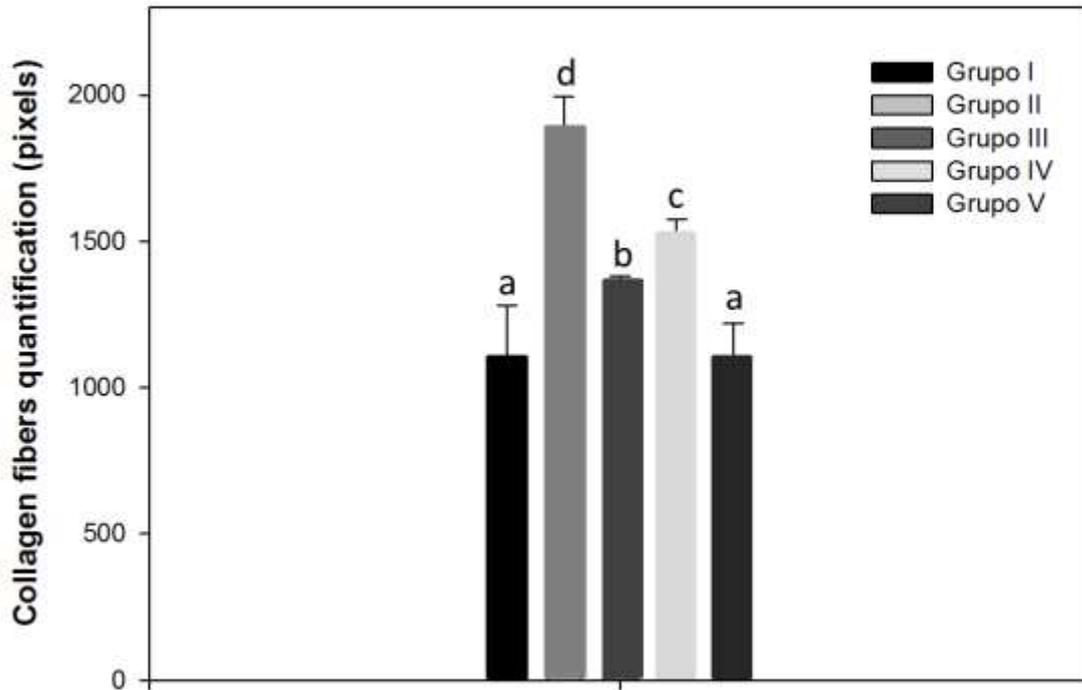
**Figura 1:** Imagens ultrassonográficas das dimensões dos ovários realizadas antes do tratamento dos grupos experimentais. (A) Grupo I: 0,30 x 0,33cm. (B) Grupo II: 0,59 x 0,85. (C) Grupo III: 0,54 x 0,75cm. (D) Grupo IV: 0,79 x 0,86cm. (E) Grupo V: 0,50 x 0,78cm).



**Figura 2:** Imagens ultrassonográficas das dimensões dos ovários realizadas após o tratamento dos grupos experimentais. (A) Grupo I: 0,26 x 0,41cm. (B) Grupo II: 0,49 x 0,81. (C) Grupo III: 0,20 x 0,34cm. (D) Grupo IV: 0,54 x 0,82cm. (E) Grupo V: 0,51 x 0,77cm).



**Figura 3:** (A) Sítio de implantação (\*) de ratas do grupo controle. H.E.  $\pm$  107X. Em detalhe trofoblasto em mitose (seta). H.E.  $\pm$  428X. (B) Ovário de rata do grupo controle com vários corpos lúteos (CL). H.E.  $\pm$  107X. (C) Ovário de rata do grupo SOP + Placebo, presença de corpos atrésicos (ca) mais evidentes, menor identificação de corpos lúteos. H.E.  $\pm$  107X. (D) Ovário de rata do grupo SOP + Mel. H.E.  $\pm$  107X. (E) Ovário de rata do grupo SOP + Met. H.E.  $\pm$  107X, e (F) Ovário de rata do grupo SOP + Mel + Met, observar presença de vários corpos lúteos. H.E.  $\pm$  107X.



**Figura 4:** Quantificação de colágeno nos sítios de implantação, A) Grupo I, (controle) não induzido à SOP, observar baixos valores de fibras colágenas. B) Grupo II induzido à SOP + placebo, apresentando maiores valores de fibras colágenas. C) Grupo III induzido à SOP + melatonina, e D) Grupo IV induzido à SOP + met. Verificar que os grupos III e IV mostraram redução dos valores de fibras colágenas quando comparados ao grupo II. E) Grupo V, induzido à SOP + Mel + Met, notar níveis semelhantes de fibras colágenas em relação ao grupo controle. (Barras sob letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P > 0,05$ )).

### CAPÍTULO III

Artigo submetido à revista Reproductive toxicology

Efeito da associação do cloridrato de metformina e melatonina sobre estresse oxidativo, antes e durante a gestação e repercussão na bioquímica e histopatologia hepática após tratamento para síndrome dos ovários policísticos em ratas

Ana Janaina Jeanine M. Lemos<sup>a</sup>; Christina A. Peixoto<sup>c</sup>; Álvaro Aguiar C. Teixeira<sup>a</sup>; Rayana Leal A. Luna<sup>b</sup>; Sura Wanessa S. Rocha<sup>b</sup>; Hilda Michelly P. Santos<sup>a</sup> Anne Gabrielle V. Oliveira<sup>b</sup>; Amanda Karolina S. Silva<sup>b</sup>; Ana Karolina S. Nunes<sup>b</sup>; Valéria Wanderley-Teixeira<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil*

<sup>b</sup> *Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz Recife, Brasil.*

\*Corresponding Author. UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

*E-mail address: [valeria@dmfa.ufrpe.br](mailto:valeria@dmfa.ufrpe.br) (V. Wanderley-Teixeira)*

## RESUMO

Recentemente tem-se observado que mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) apresentam grande prevalência de alterações no fígado como doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, fibrose, alterações enzimáticas e aumento do estresse oxidativo, elevando a preocupação dos médicos. O cloridrato de metformina é considerado a melhor opção terapêutica em pacientes inférteis e durante a gestação por não ser teratogênico, não levar a hipoglicemia e reduzir riscos cardiovasculares e de hipercolesterolemia. Por sua vez, a melatonina tem sido reportada pelos seus efeitos reguladores cíclicos/sazonais do sistema reprodutor, além de sua ação antioxidante e hepática protetora. Assim, avaliou-se o efeito da associação do cloridrato de metformina e melatonina sobre estresse oxidativo, alterações bioquímicas e histopatologia hepática em ratas induzidas a SOP, pela iluminação constante. Os resultados revelaram que as ratas induzidas a SOP, apresentaram processos característicos de inflamação hepática a níveis plasmáticos e teciduais. Entretanto, os tratamentos com cloridrato de metformina e melatonina reduziram esses efeitos, porém a associação dos fármacos mostrou-se mais eficiente na redução dos níveis plasmáticos da enzima hepática alanina transaminase, do óxido nítrico e da glutatona total, levando a resultados significativamente semelhantes aos animais do grupo controle, também foram observadas semelhanças quanto ao conteúdo hepático de polissacarídeos, e aos de citocinas pró-inflamatórias. Assim, o presente estudo mostrou que o tratamento com associação dos fármacos atua de forma mais eficaz contra a toxicidade hepática produzida pela SOP experimental, favorecendo uma normalização dos parâmetros bioquímicos, e durante a gestação, a redução do estresse oxidativo quando comparada às monoterapias destas drogas. Entretanto a

importância clínica e fisiológica de tal associação exige mais esclarecimentos, principalmente sobre possíveis efeitos colaterais na prole.

Palavras-chave: Cloridrato de metformina, Melatonina, Síndrome dos ovários policísticos, fígado, estresse oxidativo, rata, imunohistoquímica.

## **1. Introdução**

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma desordem endócrina ginecológica que leva a alterações como anormalidades menstruais, androgenismo e infertilidade, de comum ocorrência em mulheres na idade reprodutiva. Recentemente tem-se observado que mulheres com essa síndrome apresentam grande prevalência de alterações no fígado como doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, fibrose e alterações enzimáticas, aumentando a preocupação dos médicos quanto às patologias hepáticas presentes nestas pacientes. Desta forma, ao diagnosticar a SOP, sugere-se que sejam realizados testes diagnósticos a nível hepático, independente de presença de obesidade ou sobrepeso nas pacientes [1-3].

As causas destas co-morbidades que afetam a função hepática e reprodutiva não estão definidas, mas existem sugestões de interferência pelos androgênios, pela resistência a insulina e pela interferência da peroxidação lipídica, neste último caso, envolvendo o aumento do estresse oxidativo, o qual vem ganhando atenção cada vez maior devido ao estilo de vida das mulheres modernas na atualidade [3-6]. Por este motivo diversas pesquisas têm utilizado antioxidantes como a melatonina para tratar ou suplementar a farmacocinética, pois, várias pesquisas têm associado o estresse oxidativo à patogênese de doenças do sistema reprodutor feminino que causam a infertilidade, endometriose e SOP [7-9].

Um dos modelos experimentais utilizados em pesquisas é a indução da SOP em ratas através da iluminação constante [10-12]. Este modelo induz às características dessa síndrome após um período aproximado de 90 dias ou 13 semanas de submissão à luz ininterrupta, ocasionando quadros de estro constante, aumento do número e

diâmetro dos cistos ovarianos, espessamento da túnica albugínea, escassos folículos primários e folículos em crescimento e numerosos folículos atresícos em ratas [13,14].

A aplicação da luz constante leva a deficiência de produção de melatonina pela glândula pineal, danos do sistema reprodutor e aumento do estresse oxidativo. Em ratos submetidos à luz constante verificou-se que a peroxidação lipídica foi aumentada e que a reposição pela administração de melatonina causou diminuição da peroxidação lipídica nos tecidos estudados, em especial no fígado e no cérebro. No fígado, a melatonina reduziu os níveis de expressão da iNOS em ratos com disfunção metabólica [15] e inibiu a ativação do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) e estresse oxidativo em modelo de injúria hepática em ratos [16,17]. Além disso, a aplicação de melatonina resultou numa maior atividade da enzima redutora glutaciona peroxidase (GSH-Px), que tem efeito antioxidante [9,18].

Em casos de mulheres com SOP que desejam tratar a infertilidade visando uma gravidez, a droga mais utilizada e que apresenta maior segurança e sem riscos teratogênicos é o cloridrato de metformina [19,20], apesar de artigos revelarem que seus efeitos podem resultar em elevação nos níveis de piruvato, lactato e redução dos níveis de ATP intracelular [20,21], outros artigos afirmam efeito benéfico a nível hepático reduzindo, por exemplo, os índices de TNF- $\alpha$ , além disso, o número de trabalhos publicados com pacientes gestantes tratadas com cloridrato de metformina para SOP é escasso [19,20,22]. Estudos recentes têm analisado a associação do cloridrato de metformina com melatonina em tratamentos oncológicos de inibição de câncer de pele e inibição de peroxidação lipídica [23,24] e na redução do crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos machos [25]. Porém, não há estudos quanto aos efeitos do tratamento associativo do cloridrato de metformina e melatonina sobre o fígado e

estresse oxidativo em ratas prenhes em modelos experimentais de indução a SOP. Assim, diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da associação do cloridrato de metformina e melatonina sobre estresse oxidativo, antes e durante a gestação, e analisar bioquimicamente e histopatologicamente o fígado após tratamento para SOP em ratas.

## **2. Material e métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fiocruz) e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### *2.1 Instalação do experimento e utilização de Animais*

Foram utilizadas 75 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, virgens, pesando  $200 \pm 30$ g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de  $22 \pm 1$  °C e iluminação artificial que estabeleceram 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, as ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram distribuídas em cinco grupos. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 23081.009130/2010.

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

*Grupo II - ratas induzidas a policistose ovariana e acasaladas em seguida;*

*Grupo III - ratas induzidas a policistose ovariana, tratadas com melatonina e acasaladas em seguida;*

*Grupo IV - ratas induzidas a policistose ovariana, tratadas com cloridrato de metformina e acasaladas em seguida;*

*Grupo V - ratas induzidas a policistose ovariana, tratadas com cloridrato de metformina e melatonina e acasaladas em seguida.*

## *2.2 Modelo de indução à Síndrome dos ovários policísticos*

Para induzir a SOP, as ratas dos grupos II, III, IV e V foram submetidas ao estímulo luminoso constante, que foi alcançado utilizando-se uma caixa de madeira com área 0,5m<sup>3</sup>, com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 500lux. Estas lâmpadas permaneceram acesas ininterruptamente por um período de 100 dias, tempo suficiente para o desenvolvimento de ovários policísticos [10-14].

## *2.3 Tratamento com Cloridrato de Metformina*

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem na dosagem de 50mg/100g diluído em 0,05mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al. (2006) [26], durante dez dias consecutivos nas ratas dos grupos IV e V.

#### *2.4 Tratamento com Melatonina*

O tratamento com melatonina foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima et al. (2008) [14] nas ratas dos grupos III e V. A melatonina foi proveniente da Sigma, *St. Louis, MO, USA* e administrada na dose de 200µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal por meio de injeções subcutâneas no início da noite (18:00). A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02mL) e diluída em 0,9% NaCl.

#### *2.5 Acasalamento dos animais e diagnóstico da prenhez*

Após respectivos tratamentos, 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 (06:00h) do dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro à presença de espermatozoides nos esfregaços, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional. Para a coleta dos esfregaços vaginais, foram utilizadas hastes munidas, nas extremidades, com chumaços de algodão umedecido em solução salina. Logo após a coleta do material, as células foram transferidas para lâminas histológicas, através de movimentos rotatórios da haste. Essas lâminas foram imediatamente mergulhadas em uma solução de álcool-éter, em partes iguais, e a seguir, foram coradas pelo método Shorr-Harris.

## *2.6 Coleta das amostras de sangue*

As amostras para análise de óxido nítrico e glutathiona total foram coletadas antes do início dos tratamentos, após o término dos tratamentos e no 7º, 14º e 21º dias de gestação, correspondendo ao terço inicial, médio e final da gestação, respectivamente. Para análise bioquímica as amostras foram coletadas após tratamentos com os fármacos. Para isso as ratas foram imobilizadas em caixas de madeira e o sangue foi coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G). Após centrifugação refrigerada, o plasma foi acondicionado em microtubos, sempre em duplicata, e congelado a -20°C até o momento das dosagens [27,28].

## *2.7 Análise plasmática de glutathiona total*

O plasma foi diluído com a utilização de ácido metafosfórico a 5%, centrifugado em centrífuga resfriada com rotação de 12000 x g durante 12 minutos e o sobrenadante foi acondicionado em freezer -80°C até o momento da quantificação utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através do protocolo disponibilizado pelo KIT comercial (Enzo- *life Science* Catalog # ADI-900-160). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata sendo cada placa, utilizando a absorbância de 405nm de acordo com as recomendações do kit.

## *2.8 Análise plasmática de óxido nítrico*

A dosagem de óxido nítrico (NO) no plasma das ratas foi determinada pela concentração de íons nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), utilizando o reagente de Griess [29]. Para isto, 50

$\mu\text{L}$  de plasma por animal foi adicionado a  $100\mu\text{L}$  de sulfanilamida (1%) em ácido fosfórico (5%), sendo utilizadas cinco repetições por tratamento. As concentrações de  $\text{ON}_2^-$  foram obtidas após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente da mistura de  $50\mu\text{L}$  de cada amostra (plasma/sulfanilamida) e  $50\mu\text{L}$  de NEED (N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) a 0,1% [30]. Absorbância foi lida usando uma leitora de microplacas ELx800TM (Biotek Instruments Inc.) em 562 nm utilizando o programa Gen5 ELISA (Biotek®). A curva padrão foi realizada com concentrações crescentes de nitrito de sódio. A quantidade de nitrito nas amostras foi correlacionada com valores de absorbância obtidos a partir da curva padrão.

### 2.9 Análises plasmáticas bioquímicas

As dosagens bioquímicas foram realizadas por meio de kit's da Roche (*Roche, Mannheim, Germany*), após os tratamentos para análise de aspartato transaminase (AST) - (Cat. No. 10 170 666 103), alanina transaminase (ALT) - (Cat. No. 10 170 674 103), colesterol total (CT) - (Cat. No. 10 287 410 255), lipoproteína de alta densidade (HDL) - (Cat. No. 10 287 410 177), triglicérides totais (TG) - (Cat. No. 10 287 410 178) e fosfatase alcalina (FA) - (Cat. No. 12 172 933 122), sendo determinados fotometricamente pelo analisador automático Cobas Integra 400. A análise de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), foram determinadas pela equação de Friedewald:  $\text{LDL C} = [\text{CT}] - [\text{HDL C}] - [\text{TG}/5]$ , onde C = colesterol e TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL ou VLDL-colesterol (VLDL C), ou diretamente mensurado no plasma [31].

## 2.10 Histopatologia, histoquímica e imunohistoquímica

Ao final do experimento (21<sup>o</sup> dia de prenhez) as fêmeas de todos os grupos foram anestesiadas com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular para remoção do fígado. Em seguida as ratas foram eutanasiadas por meio do aprofundamento anestésico. O fígado coletado foi fixado em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente o órgão foi processado para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.) para análise de rotina histopatológica e pelo Ácido periódico de Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos. A análise da expressão da proteína óxido nítrico sintase induzida (1:100; iNOS; Abcam-ab3523), interleucina-1 beta (1:100; Il-1 $\beta$ ; GeneWay-18-732-292194) e do Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (1:200; TNF-  $\alpha$ ; Abcam-ab6671) foi feita através do bloqueio da peroxidase endógena e exposição dos sítios antigênicos (“steam heat incubation”) para imunohistoquímica. Após a incubação com o anticorpo primário, a revelação foi realizada utilizando-se kit comercial Dako (K0690, Dako Diagnósticos S. A., Barcelona). Em sequência as lâminas foram analisadas em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50 e quantificadas as alterações em pixels das imagens utilizando-se o software de imagem Gimp2.6 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms). Os resultados contabilizados foram submetidos ao teste estatístico para produção de um gráfico comparativo entre os grupos através do Programa GraphPad Prism.

Para quantificação de lipídeos por Oil-Red-O, fragmentos retirados da mesma região anatômica hepática de todas as ratas de cada grupo foram fixados utilizando-se

formaldeído a 4% com tampão fosfato 0,1M por duas horas e logo após as amostras foram tratadas com solução de sacarose nas concentrações de 15 e 30% por 24 horas cada, respectivamente, sob resfriamento com N-hexano antes de ser congelada em nitrogênio líquido e acondicionado em freezer -80°C. Em seguida o material foi cortado em criostato RM 2035 (Reichert S, Leica), e submetido ao procedimento para coloração específica Oil-Red-O durante 15 minutos.

### *2.10 Análises estatísticas*

Os dados obtidos das dosagens dos níveis de óxido nítrico, glutathiona total e demais dosagens plasmáticas foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, e os dados referentes ao Oil-Red-O, iNOS, TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  e polissacarídeos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Dunnett ou Tukey. Sendo considerados significantes os valores com probabilidade menor que 0,05, para construção de gráficos pelo software GraphPad Prism, version 5.

## **3. Resultados**

### *3.1 Estresse oxidativo*

As análises plasmáticas dos níveis de óxido nítrico (NO) revelaram que após 100 dias de exposição ao estímulo luminoso do modelo experimental para SOP, todas as

ratas apresentaram valores estatisticamente elevados deste radical em relação ao grupo controle. Porém, ao serem analisadas logo após os tratamentos, e nos períodos de 7 e 14 dias de gestação verificou-se que os níveis de óxido nítrico atingiram valores similares aos do grupo controle. Entretanto, no período de 21 dias de gestação apenas as ratas submetidas à associação dos fármacos diferiram estatisticamente das ratas induzidas a SOP sem tratamento (Tabela 1).

Os grupos que receberam tratamentos com cloridrato de metformina, melatonina, ou associação dos fármacos reduziram significativamente os níveis de glutathione total. Entretanto, a associação dos fármacos reduziram os níveis de glutathione total a ponto de assemelham-se ao grupo controle, logo após os tratamentos e ao 7º dia de gestação. A redução dos níveis de glutathione total nas ratas submetidas à SOP e tratadas com fármacos associados ou não, melhoraram os efeitos da SOP experimental, chegando a assemelhar-se a valores observados nas ratas do grupo controle ao 14º dia de prenhez. No 21º dia de gestação, o grupo SOP e o grupo SOP + Mel apresentaram níveis elevados de glutathione total quando comparados com o grupo controle. Por outro lado o grupo que recebeu associação do cloridrato de metformina e melatonina apresentou redução significativa dos níveis plasmáticos de glutathione total quando comparados ao grupo SOP, chegando a alcançar os níveis observados no grupo controle (Tabela 2).

### *3.2 Análises plasmáticas bioquímicas*

As análises plasmáticas mostraram que as ratas induzidas a SOP após tratamento apresentaram níveis de colesterol total (CT) e alanina transaminase (ALT) similares aos observados nas ratas do grupo controle, diferindo apenas das ratas induzidas a SOP sem

tratamento. Para os níveis triglicéridos (TG) as ratas tratadas com melatonina apresentaram os menores níveis diferindo estatisticamente dos encontrados nas ratas induzidas a SOP sem tratamento. Entretanto, para os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) os tratamentos com fármacos associados ou não promoveram nas ratas aumento significativo em relação aos observados nas ratas induzidas a SOP sem tratamento. Não houve diferenças significativas para os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina (FA) e glicose (Tabela 3).

### *3.3 Histopatologia, histoquímica e Imunohistoquímica*

A análise histopatológica do fígado das ratas do grupo controle mostrou cordões de hepatócitos bem preservados margeados por sinusóides (Fig. 1A), porém no fígado das ratas induzidas ao SOP, observaram-se degeneração vacuolar dos hepatócitos e hiperplasia difusa das células de Kupffer característicos de reação inflamatória (Fig. 1B). Nas ratas induzidas ao SOP e tratadas com melatonina, o parênquima hepático apresentou-se preservado, porém foi possível observar algumas áreas com colangite dos espaços porta com infiltrados leucocitários (Fig. 1C). Já nas ratas tratadas com cloridrato de metformina observou-se leve degeneração do tipo vacuolar, sem características inflamatórias (Fig. 1D), e nas ratas tratadas com cloridrato de metformina e melatonina, o fígado apresentou-se bem preservado e sem infiltrados leucocitários semelhante ao grupo controle (Fig. 1E).

A análise de lipídeos não revelou diferença entre os grupos experimentais para a coloração Oil-Red-O, indicando ausência de deposição patológica de lipídeos no fígado (Fig 1F).

À reação pelo Ácido Periódico de Schiff foi positiva em todos os fígados dos animais dos grupos experimentais. Quanto à quantificação verificou-se que os fígados das ratas induzidas a SOP e tratadas com a associação dos fármacos apresentou teor de polissacarídeos mais intensa e estatisticamente semelhante ao grupo controle. Contudo, o fígado das ratas do grupo induzida a SOP sem tratamento diferiu estatisticamente de todos os demais grupos, com menor média em relação aos grupos controle e tratado com a associação dos fármacos, e maior média em relação às ratas dos grupos tratadas com melatonina e cloridrato de metformina, que receberam os fármacos isoladamente, os quais foram semelhantes entre si estatisticamente (Fig. 2).

A imunohistoquímica para iNOS apresentou maior marcação nos fígados das ratas induzidas a SOP sem tratamento. A quantificação revelou que o iNOS nos fígados das ratas que receberam tratamentos com melatonina e cloridrato de metformina foi reduzido em relação aos fígados das ratas induzidas a SOP sem tratamento, mas somente os fígados das ratas induzidas a SOP e tratadas com a associação destes fármacos, apresentaram níveis semelhantes ao grupo controle (Fig. 3). Resultados semelhantes foram evidenciados para as dosagens de TNF- $\alpha$  (Fig. 4).

Com relação às análises imunohistoquímicas para IL-1 $\beta$  evidenciou-se que nos fígados das ratas induzidas a SOP sem tratamento houve maior marcação em relação aos demais grupos. Os tratamentos com cloridrato de metformina e melatonina reduziram de forma significativa a marcação para IL-1 $\beta$ . Entretanto o tratamento

associado dos fármacos apresentou redução da expressão de IL-1 $\beta$ , assemelhando-se inclusive ao grupo controle. (Fig. 5).

#### **4. Discussão**

Todas as ratas induzidas a SOP pela iluminação constante apresentaram níveis elevados de estresse oxidativo, isto corrobora com pesquisas recentes que relatam a associação da SOP com o aumento do estresse oxidativo em mulheres acometidas com a síndrome independente de seu peso corporal [32]. Porém, logo após os tratamentos farmacológicos com melatonina e/ou cloridrato de metformina observou-se que os índices de óxido nítrico ficaram similares aos das ratas do grupo controle e, aos poucos, durante a gestação, os índices de glutathiona total também reduziram. De acordo com Esteghamati et al. [33] o cloridrato de metformina é um excelente redutor de marcadores de estresse oxidativo em indivíduos diabéticos em relação a outras drogas, inclusive em comparação à modificação do estilo de vida relacionado a realização de exercícios físicos e hábitos alimentares. Da mesma forma, a melatonina possui efeito antioxidante o que foi identificado por diversos pesquisadores [34,35]. Ou seja, ambos os fármacos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, entretanto, a administração associada destes promoveu uma melhora do comportamento plasmático ao longo do experimento em comparação à administração isolada do cloridrato de metformina e melatonina em relação ao óxido nítrico.

As dosagens plasmáticas revelaram bioquimicamente que todos os tratamentos farmacológicos reduziram os índices de VLDL, CT, ALT, e aumentaram os índices de

HDL, enquanto que os níveis de Triglicerídeos foram reduzidos pelo tratamento com melatonina de forma mais eficiente que os demais tratamentos farmacológicos. Esta melhor atuação da melatonina provavelmente deve-se ao fato de que este hormônio atua em diversos órgãos através de seus receptores de forma direta, por exemplo, nos adipócitos restaura o conteúdo da proteína transportadora de glicose (GLUT-4) e diminuem a peroxidação lipídica, níveis de colesterol total, fosfolipídeos, ácidos graxos livres em animais em modelos experimentais de arterosclerose [36,37]. Já o cloridrato de metformina possui mecanismo de ação pouco conhecido, de forma indireta atua por ativação da enzima AMPK (Adenosina monofosfato ativado pela proteína quinase), a qual inibe a formação dos ácidos graxos e em longo prazo a expressão de genes lipogênicos (FAS, S14, L-PK e SREBP-1) e neoglicogênicos (PEPCK e glicose-6-fosfatase), podendo haver potencialização de seus efeitos em terapias combinadas [38,39]. Assim, podemos inferir que a melatonina parece atuar mais eficientemente no metabolismo de lipídeos de forma isolada em comparação ao cloridrato de metformina associada ou não.

Os indicadores histopatológicos de lesão identificados no parênquima hepático foram coerentes aos resultados imunohistoquímicos e bioquímicos, pois, os animais induzidos a SOP apresentaram degeneração e hiperplasia difusa de células de Kupffer, bem como alteração dos níveis plasmáticos de colesterol, triglicérides, alterações enzimáticas e de citocinas identificadas por imunomarcção para iNOS, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , todas estas características indicam processos tóxico-inflamatórios complementados pelos resultados plasmáticos de estresse oxidativo conforme dosagens de óxido nítrico e glutatona total neste trabalho. Estas respostas inflamatórias foram reduzidas pelos tratamentos em todos os níveis destes marcadores, melhorando as características de

resposta inflamatória de forma que as quantificações assemelharam-se ao grupo controle sempre quando os medicamentos propostos foram associados. Este fato ocorreu provavelmente porque a melatonina atua no tecido danificado devido sua capacidade antioxidante e inibidora de enzimas pró-oxidantes e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa e interleucina IL-1 $\beta$  e as enzimas pró-inflamatórias iNOS e COX-2 [40,41]. Já o cloridrato de metformina apresenta função farmacológica hepática envolvida na ativação da enzima AMPK, a qual atua por fosforilação na inibição da acetil CoA carboxilase (ACC-redutase) e 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGCoA), contribuindo para proteção e combate a danos hepáticos reduzindo processos degenerativos no tecido, e inibe o NF-kB o qual é promotor inflamatório, desta forma leva a atenuar processos inflamatórios[38, 42].

Quanto às dosagens de glicose no plasma, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas, porém na análise histoquímica específica para polissacarídeos, foi observado que as ratas submetidas à SOP e sem tratamento tiveram reservas estatisticamente menores de açúcares teciduais quando comparado aos grupos controle e tratado pela associação dos fármacos. Enquanto que nos fígados dos animais tratados com melatonina e cloridrato de metformina de forma isolado apresentaram as menores reservas de açúcar em relação aos demais grupos experimentais. Este comportamento peculiar plasmático e tissular é compreensivo, pois no plasma a estabilidade da concentração glicêmica é viável ao mecanismo fisiológico de regulação da homeostase de forma que a tendência é que o sangue mantenha-se a um nível pouco variável e com retomadas rápidas em prazo de horas a nível circulatório em casos de organismos não patológicos [43]. Quanto à redução da reserva tissular de açúcares do fígado das ratas submetida à SOP sem tratamento, este efeito pode estar associado ao metabolismo de

carboidratos em momentos de estresse oxidativo, pois segundo Kaya et al. [44] nestes casos, a atividade de neoglicogênese e disponibilização de glicose são comuns, diferente do que acontece em situações de repouso. Os animais que receberam melatonina e cloridrato de metformina isoladamente reduziram ainda mais os depósitos de açúcar tecidual, o que era esperado, visto que a melatonina atua dinamizando a utilização de açúcares no organismo e promove a disponibilização de glicose plasmática rapidamente após a sua administração, reduzindo desta forma a reserva hepática [45], porém aumentado a taxa de perfusão de glicose para manter a euglicemia, ou seja a taxa normal de glicose plasmática [46]. Já o cloridrato de metformina tem por função ativar a enzima AMPK nos hepatócitos e músculos esqueléticos, promovendo a disponibilização de energia e estimulando o metabolismo de transporte de glicose, diminuindo seus níveis no fígado [41]. Porém no fígado dos animais tratados pela associação dos fármacos, não houve redução das reservas de açúcares, apresentando-se de forma similar ao fígado dos animais do grupo controle sem indução a SOP. Essa melhora no comportamento de reservas de polissacarídeos, assemelhando-se ao grupo controle, pode estar associada à ausência de sinergismo entre os medicamentos no metabolismo de carboidratos, pois resultados apresentados por Seraphim et al. [36] indicam que com a associação da melatonina e cloridrato de metformina em ratos alimentados com altas doses de açúcar, não foi observado redução significativa da hiperglicemia, enquanto que os tratamentos individuais dos fármacos obtiveram melhores resultados, o que sugere haver efeito específico na associação do cloridrato de metformina com melatonina.

O modelo de indução à síndrome dos ovários policísticos é uma alternativa ao estudo de um conjunto complexo de alterações fisiológicas que de fato ocorre no cotidiano de mulheres com este distúrbio ainda sem causa patológica definida e que,

assim como ocorre com a síndrome metabólica, resistência a insulina e doença gordurosa hepática não alcoólica, leva ao aumento de estresse oxidativo dos pacientes clínicos com estas enfermidades [5,47-49]. O presente estudo mostrou que o tratamento com associação do cloridrato de metformina e melatonina atua de forma mais eficaz contra a toxicidade hepática produzida pela SOP induzida pela iluminação constante, favorecendo uma normalização de parâmetro bioquímicos durante a gestação quando comparada às monoterapias destas drogas. Entretanto a importância clínica e fisiológica de tal associação exige mais esclarecimentos, principalmente sobre possíveis efeitos colaterais na prole.

## Referências

- [1] Barfield E, Liu Y-H, Kessler M, Pawelczak M, David R, Shah B. The prevalence of abnormal liver enzymes and metabolic syndrome in obese adolescent females with polycystic ovary syndrome. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 2009;22:318-22.
- [2] Vuppalanchi R, Chalasani N. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;49:306-17.
- [3] Vassilatou E, Lafoyianni S, Vryonidou A, Ioannidis D, Kosma L, Katsoulis K, Papavassiliou E, Tzavara I. Increased androgen bioavailability is associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2010;25:212-20.
- [4] Cerda C, Pérez-Ayuso RM, Riquelme A, Soza A, Villaseca P, Sir-Petermann T, et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertility & Sterility* 2008;89:1299-604.
- [5] Cussons AJ, Watts GF, Mori TA, Stuckey BGA. Omega-3 fatty acid supplementation decreases liver fat content in polycystic ovary syndrome: A randomized controlled trial employing proton magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:3842-8.
- [6] Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, Agarwal A. Female Infertility and Antioxidants.

Current Women's Health Review 2010;6:84-95.

- [7] Teixeira AAC, Simões MJ, Evêncio-Neto J Wanderley-Teixeira V. Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. *Revista Chilena de Anatomia* 2002;20:145-9.
- [8] Mahamed RR, Maganhin CC, Simões RS, Simões MJ, Baracat EC, Soares-Jr. JM. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertility & Sterility* 2011;95:1507-9.
- [9] Baydaş G, Erçel E, Canatan H, Dönder E, Akyol A. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochemical Function* 2001;19:37-41.
- [10] Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: An update. *Fertility and Sterility* 2005;84:1228-34.
- [11] Sing KB. Rat models of polycystic ovary syndrome. *Sourcebook of Models for Biomedical Research* 2008; 5:405-10.
- [12] Shi D, Vine DF. Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility* 2012;98:185-93.

- [13] Salvetti NR, Canal AM, Gimeno EJ, Ortega HH. Polycystic Ovarian Syndrome: Temporal characterization of the induction and reversion process in an experimental model. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2004;41:389-95.
- [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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004;37:987-95.
- [15] Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB Journal* 1999;13:1537-46.
- [16] Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology and gastroenterology* 1996;43:898-905.
- [17] Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, et al. Melatonin inhibits nuclear factor kappa  $\beta$  activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *Journal of Hepatology* 2004;40:86-93.
- [18] Oliveira SMM, Silva FCA, Vilaça-Jr PEA, Silva WE, França DF, Silva-Júnior AV, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC. Aspectos morfológicos do fígado de fetos

de ratos (*Rattus norvegicus albinus*) submetidos à iluminação constante. *Biológico* 2006;68:248-52.

[19] Motta ELA, Domingues TS, Soares Jr JM. Use of insulin sensitizers in the treatment of infertility in patients with polycystic ovary syndrome (POS). *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2012;34:99-101.

[20] Checa MA, Requena A, Salvador C, Tur R, Callejo J, Espinós JJ, et al. Insulin-sensitizing agents: Use in pregnancy and as therapy in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* 2005;11:375-90.

[21] Silva FMS, Silva MHRA, Bracht A, Eller GJ, Constantin RP, Yamamoto NS. Effects of metformin on glucose metabolism of perfused rat livers. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010;340:283-289.

[22] Raso GM, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Cuzzocrea S, Canani RB, et al. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *European journal of pharmacology* 2009;604:125-31.

[23] Rodrigues JK, Dib LA, Ferriani RA, Jordão-Jr AA, Navarro PAAS. Serum markers of oxidative stress and assisted reproduction procedures results in infertile patients with polycystic ovary syndrome and controls. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2010;32:118-25.

- [24] Man'cheva TA, Demidov DV, Plotnikova NA, Kharitonova TV, Pashkevich IV, Anisimov VN. Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis, and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrenein female mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2011;151:339-42.
- [25] Anisimov VN, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Tyndyk ML, Yurova MN, 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* 2010;9:188-97.
- [26] Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di-Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The mechanisms involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Molecular Human Reproduction* 2006;12:475-81.
- [27] Elias JAZ, Delfino VDA, Barbosa DS, Fabris BA, Matsuo T. Efeito do Ramipril e da Sinvastatina sobre o estresse oxidativo de ratos diabéticos. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 2008;52:1131-8.
- [28] Vilaça-Jr PEA, Soares AF, Wanderley-Teixeira V, Araújo ACC, Teixeira AAC. Efeito da administração pré-natal da dexametasona em ratas sobre os perfis glicídicos e hematológicos materno e da prole. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2012;64:606-14.

- [29] Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 1981;78:7764-8.
- [30] Faraldo AC, Sá-Nunes A, Del BEA, Faccioli LH, Lello E. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide-Biological Chemical* 2005;13:240-6.
- [31] Shinde S, Chivate N, Kulkarni P, Naikwade N. Hypolipidemic activity of psidium guajava linn leaves extracts in hyperlipidemic rats *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2013;5:70-72.
- [32] Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction update* 2013;19:268-88.
- [33] Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, Nakhjavani M. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* 2013;32:179-85.
- [34] Bhatti GK, Sidhu IPS, Bhatti JS. Protective effect of melatonin against malathion induced alterations in antioxidant defense system and morphology of erythrocytes in wistar rats. *Journal of Basic & Applied Sciences* 2013;9:438-46.

- [35] Navarro-Alarcon M, Ruiz-Ojeda FJ, Blanca-Herrera RM, Agil A. Antioxidant activity of melatonin in diabetes in relation to the regulation and levels of plasma Cu, Zn, Fe, Mn, and Se in Zucker diabetic fatty rats. *Nutrition* 2013;29:785-9.
- [36] Seraphim PM, Sumida DH, Nishide FT, Lima FB, Cipolla-Neto J, Machado UF. A Glândula pineal e o metabolismo de carboidratos *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 2000;44: 331-8.
- [37] Danilenko KV, Ragino YI. Melatonin and its use in atherosclerosis and dyslipidemia. *ChronoPhysiology and Therapy* 2013;3:15-22.
- [38] Misra P, Chakrabarti R. The role of AMP Kinase in diabets. *Indian Medicine Research*. 2007;125:389-398.
- [39] Santomauro Júnior AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP. Metformina e AMPK: Um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 2008;52:120-5.
- [40] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Kaski JC, Reiter RJ, Jimenez-Sosa AA. Unicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of Melatonin as an adjunct in patients with acute myocardial infarction undergoing primary angioplasty: the melatonin adjunct in the acute myocardial infarction treated with angioplasty (MARIA) trial: Study design and rationale. *Contemporary Clinical Trials* 2007;28:532-9.

- [41] Kim JB, Jung JY, Ahn JC, Rhee CK, Hwang HJ. Antioxidant and anti-apoptotic effect of melatonin on the vestibular hair cells of rat utricles. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2009;2:6-12.
- [42] Huang N-L, Chiang S-H, Chiang C-H, Liang Y-J, Chen Y-J, Lai L-P. Metformin inhibits TNF- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B kinase phosphorylation, I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *International Journal of Cardiology* 2009;134:169-175.
- [43] Szablewski L. Glucose Homeostasis–Mechanism and Defects, Diabetes. Damages and Treatments, 2011;12:228-56.
- [44] Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;23:241-4.
- [45] Poon AM, Choy EH, Panq SF. Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes. *Biological Signals and receptors* 2001;10:367-79.
- [46] Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin resistant mice. *Endocrinology* 2009;150:5311-17.

- [47] Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clinical Endocrinology* 2002;57:609-13.
- [48] Carmina E. Need for liver evaluation in polycystic ovary syndrome. *Journal of Hepatology* 2007;47:313-5.
- [49] Baranova A, Tran TP, Birerdinc A, Younossi ZM. Systematic review: Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2011;33:801-14.

**Tabela 1. <sup>1</sup>Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos níveis de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$  de  $\text{ON}^{2-}/\mu\text{L}$  de plasma) plasmáticos nas ratas durante o experimento.**

<b>Grupos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
Antes do Tratamento	16,93 $\pm$ 7,34a	31,65 $\pm$ 5,69b	29,70 $\pm$ 6,34b	28,17 $\pm$ 3,94b	33,83 $\pm$ 3,76b
Depois do Tratamento	13,19 $\pm$ 1,50a	18,58 $\pm$ 0,91b	14,37 $\pm$ 1,38a	13,32 $\pm$ 0,69a	14,92 $\pm$ 3,14a
7 Dias de Prenhez	12,96 $\pm$ 1,26a	17,92 $\pm$ 1,21b	11,32 $\pm$ 2,04a	12,42 $\pm$ 3,30a	13,48 $\pm$ 2,09a
14 Dias de Prenhez	13,40 $\pm$ 1,73a	19,40 $\pm$ 2,70b	10,91 $\pm$ 2,11a	13,09 $\pm$ 3,19a	13,43 $\pm$ 3,37a
21 Dias de Prenhez	7,62 $\pm$ 0,59ab	12,40 $\pm$ 4,75b	8,31 $\pm$ 2,76ab	7,29 $\pm$ 2,89ab	6,83 $\pm$ 0,86a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2. <sup>1</sup>Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos níveis de Glutathiona total (pMoles/ 200 $\mu\text{L}$ ) plasmático nas ratas durante o experimento.**

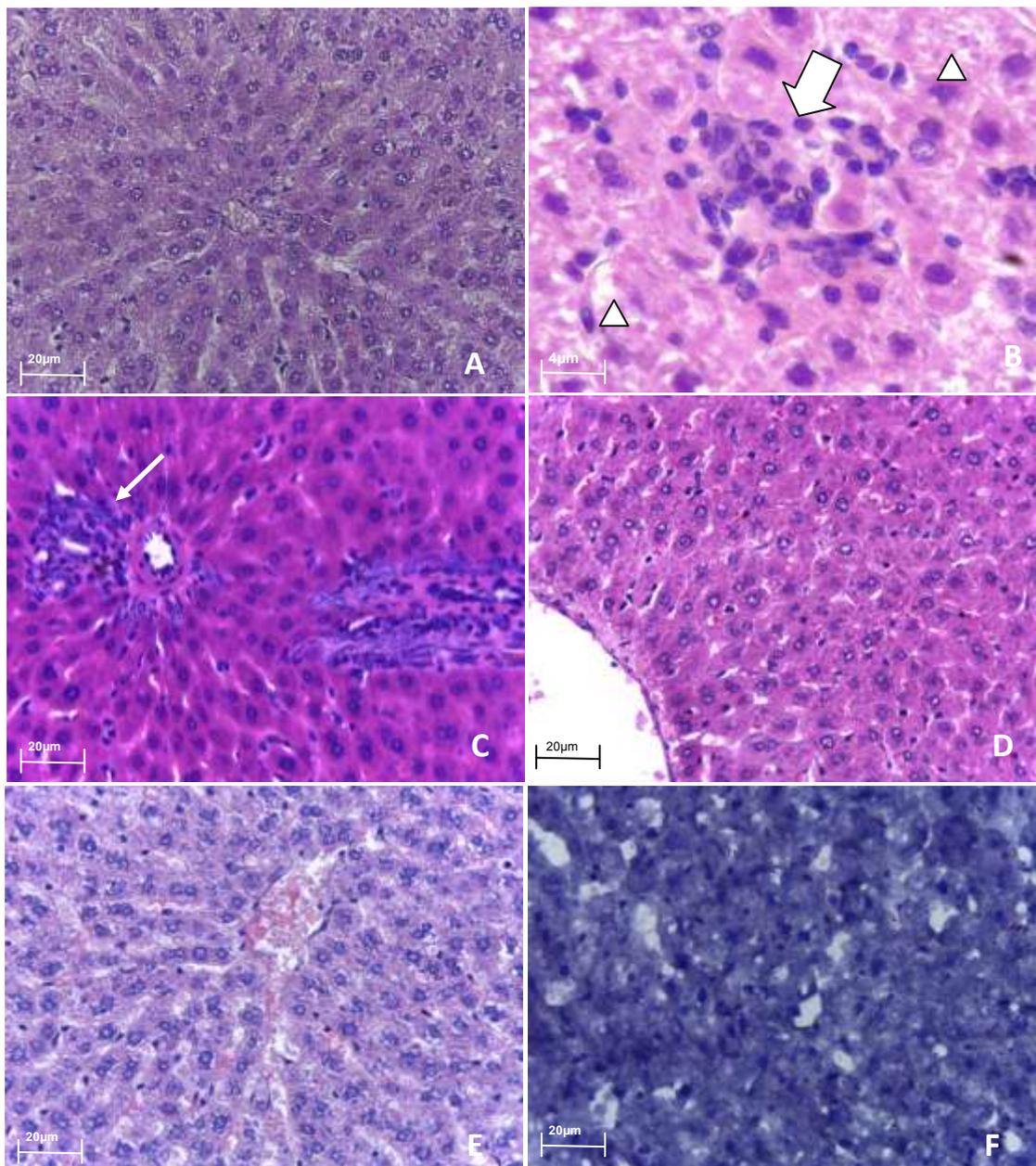
<b>Grupos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
Antes do Tratamento	5,46 $\pm$ 0,83a	22,61 $\pm$ 2,11b	22,25 $\pm$ 1,95b	21,25 $\pm$ 2,77b	21,66 $\pm$ 3,58b
Depois do Tratamento	3,27 $\pm$ 1,24a	21,27 $\pm$ 1,86b	8,09 $\pm$ 5,77a	7,97 $\pm$ 5,45a	5,36 $\pm$ 5,44a
7 Dias de Prenhez	3,04 $\pm$ 0,64a	21,01 $\pm$ 2,37b	9,11 $\pm$ 0,70d	6,21 $\pm$ 1,22c	3,73 $\pm$ 1,23a
14 Dias de Prenhez	4,82 $\pm$ 0,63a	20,01 $\pm$ 3,7b	5,18 $\pm$ 0,65a	6,47 $\pm$ 0,92a	4,08 $\pm$ 1,04a
21 Dias de Prenhez	2,94 $\pm$ 0,45a	5,68 $\pm$ 1,38b	5,26 $\pm$ 1,31b	3,88 $\pm$ 1,16ab	2,02 $\pm$ 0,83a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

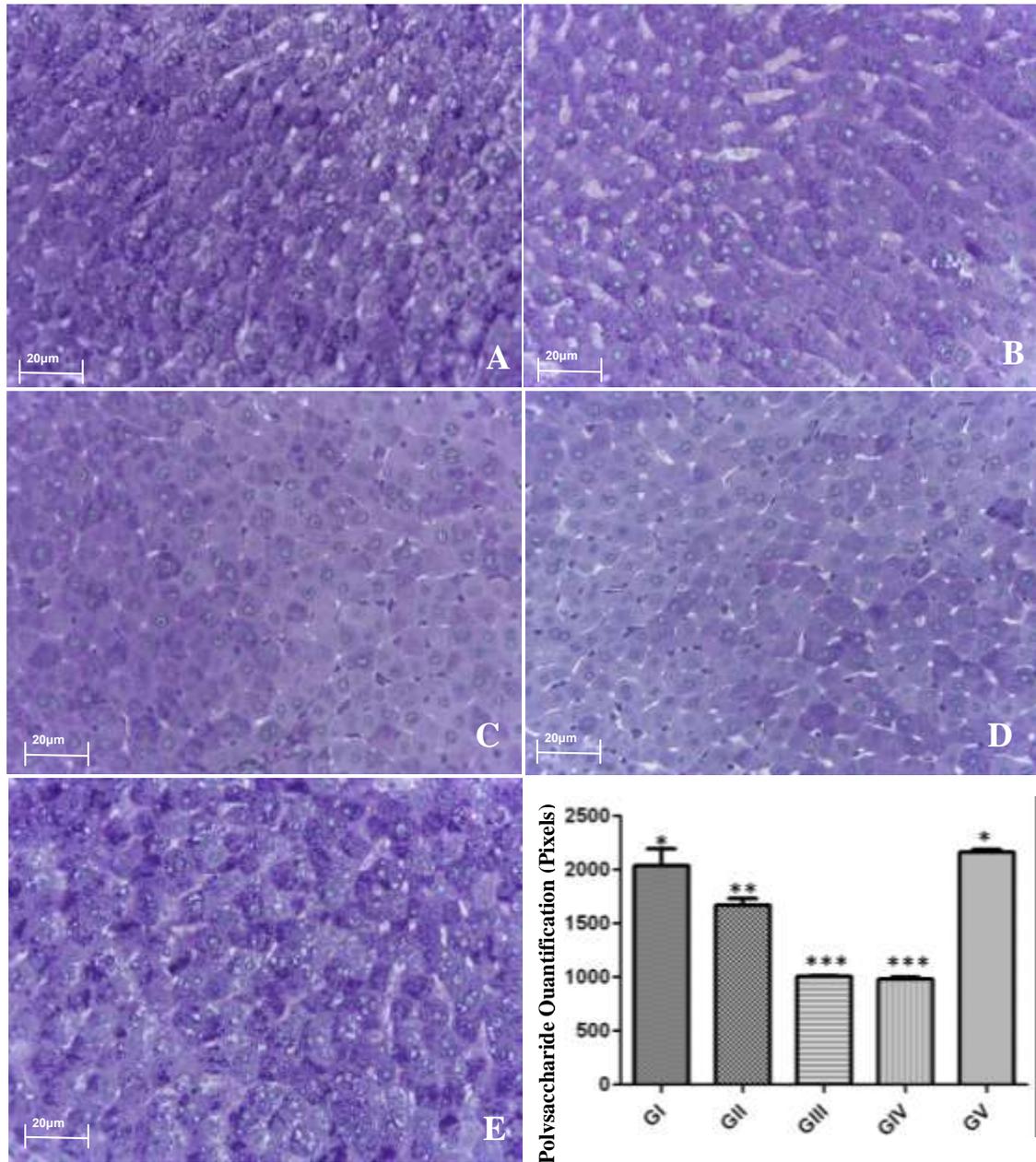
**Tabela 3. <sup>1</sup>Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos níveis plasmáticos de Colesterol total (CT), Lipoproteína de alta densidade (HDL); Lipoproteína de baixa densidade (LDL); Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); Triglicerídeos (Trigl); Alanina transaminase (ALT); Aspartato transaminase (AST); Fosfatase alcalina (FA) e Glicose em ratos dos grupos experimentais após o tratamento.**

<b>Grupos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	49,42 $\pm$ 13,25a	85,72 $\pm$ 6,6,10b	48,24 $\pm$ 10,39a	58,36 $\pm$ 13,84a	52,40 $\pm$ 12,95a
<b>HDL (mg/dL)</b>	10,24 $\pm$ 4,48a	3,74 $\pm$ 2,52b	8,82 $\pm$ 1,74a	20,40 $\pm$ 11,18a	9,24 $\pm$ 3,10a
<b>LDL (mg/dL)</b>	30,62 $\pm$ 16,95a	42,28 $\pm$ 13,59a	36,16 $\pm$ 8,41a	23,86 $\pm$ 7,19a	33,32 $\pm$ 9,57a
<b>VLDL (mg/dL)</b>	11,28 $\pm$ 2,21a	26,92 $\pm$ 10,16b	7,96 $\pm$ 3,62a	14,14 $\pm$ 8,38a	13,48 $\pm$ 6,94a
<b>Trigl. (mg/dL)</b>	56,00 $\pm$ 9,77a	134,40 $\pm$ 11,94b	40,20 $\pm$ 17,75a	70,80 $\pm$ 22,78ab	67,56 $\pm$ 12,49ab
<b>AST (IU /L<sup>-1</sup>)</b>	84,40 $\pm$ 28,55a	85,92 $\pm$ 11,98a	96,18 $\pm$ 14,48a	102,64 $\pm$ 15,04a	83,00 $\pm$ 6,03a
<b>ALT (IU/L)</b>	46,42 $\pm$ 10,53a	70,66 $\pm$ 18,88b	44,08 $\pm$ 5,94a	49,40 $\pm$ 4,09a	48,90 $\pm$ 3,36a
<b>FA (IU/L)</b>	0,46 $\pm$ 0,60a	1,54 $\pm$ 0,49a	0,96 $\pm$ 0,85a	0,36 $\pm$ 0,80a	0,44 $\pm$ 0,53a
<b>Glicose (mg/dL)</b>	142,24 $\pm$ 10,16a	126,16 $\pm$ 7,98a	125,22 $\pm$ 10,93a	120,18 $\pm$ 3,66a	134,16 $\pm$ 13,45a

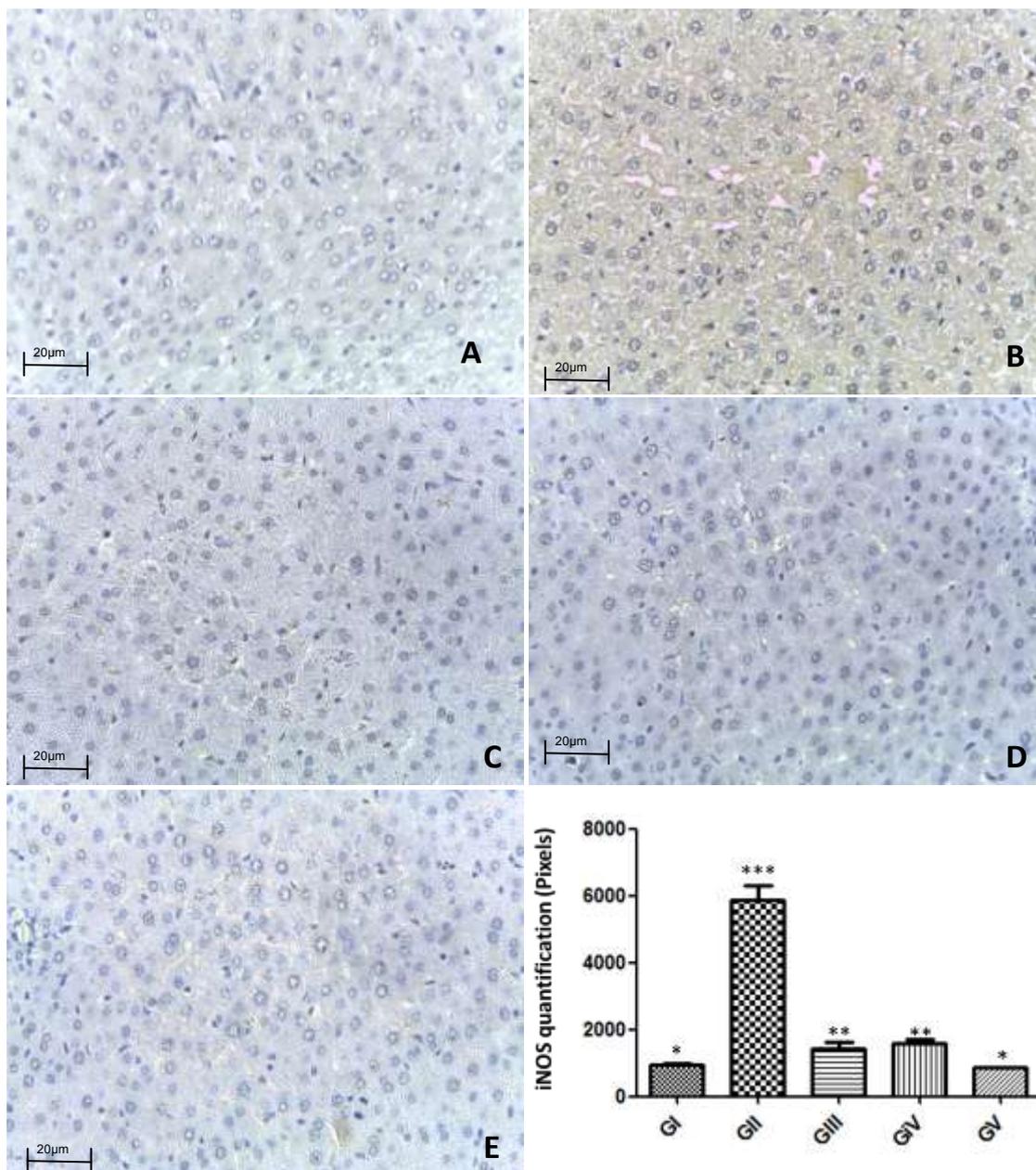
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).



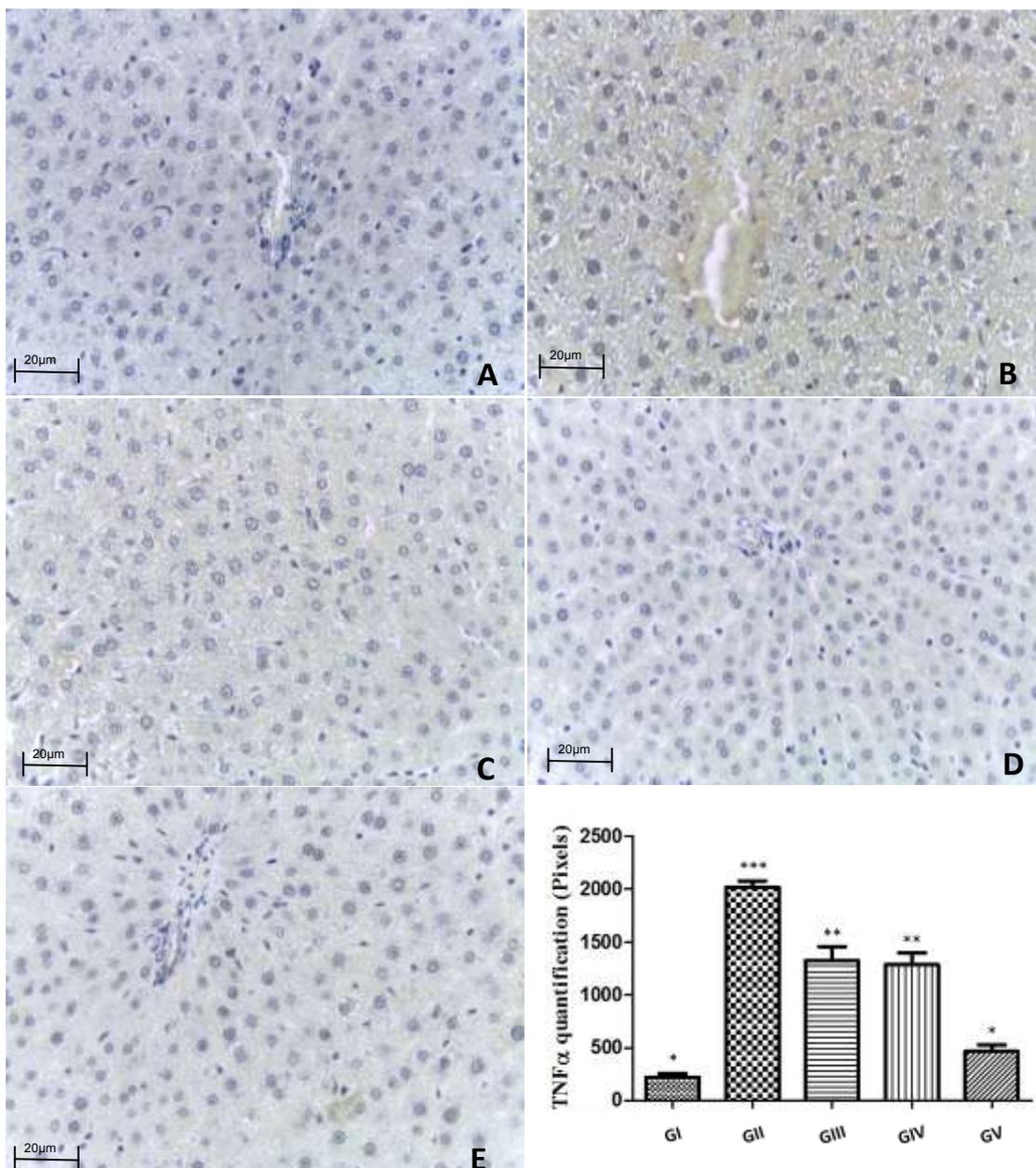
**Figura 1:** Histopatologia do fígado-coloração (HE) [A-E]; e (Oil-Red-O) [F]. (A) Hepatócitos bem preservados - grupo controle. (B) Observar hiperplasia difusa das células de kupfer (seta larga) e degeneração vacuolar dos hepatócitos (pontas de seta) - grupo II. (C) Colangite do espaço porta (seta) - grupo III-Induzido a SOP e tratado com melatonina. (D) Fígado sem características inflamatórias- grupo IV-Induzido a SOP e tratado com cloridrato de metformina. (E) Hepatócitos preservados - grupo V-Induzido a SOP e tratado com associação dos fármacos. (F) Observar marcação negativa para acúmulo de lipídeos no tecido hepático, grupo II.



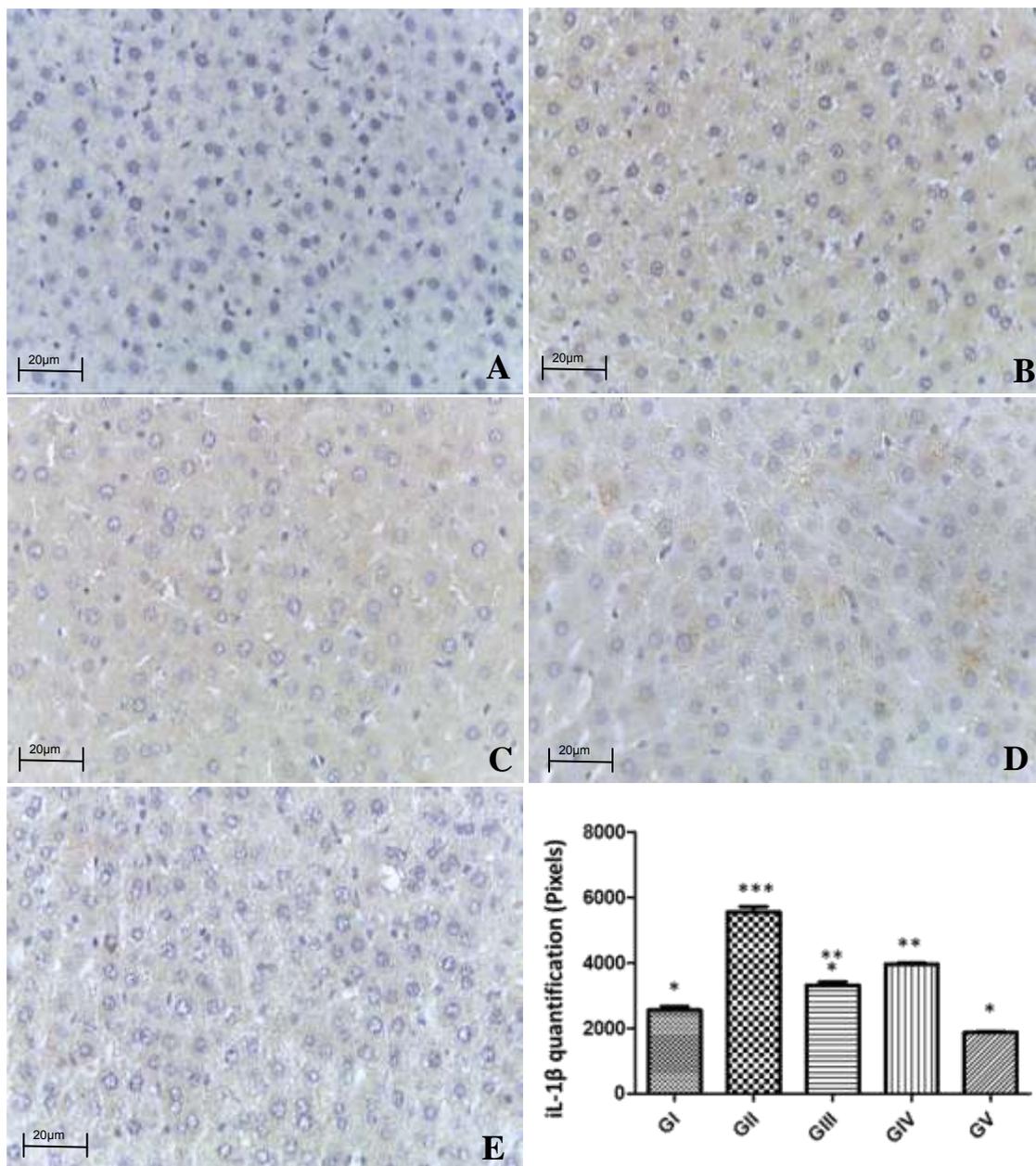
**Figura 2:** Histoquímica do fígado das ratas dos grupos experimentais- Coloração P.A.S. (A) Grupo I- controle, observar marcação forte; (B) Grupo II- induzido a SOP sem tratamento, observar marcação forte; (C) Grupo III- induzido a SOP e tratado com melatonina, observar marcação leve; (D) Grupo IV- induzido a SOP e tratado com cloridrato de metformina, observar marcação leve; (E) Grupo V- induzido a SOP e tratado com melatonina e cloridrato de metformina, observar marcação forte; (F) Quantificação de grânulos de polissacarídeos (GGPS) em Pixels. Grupos com quantidade de asteriscos semelhantes não diferem estatisticamente ( $P < 0,0350$ ).



**Figura 3:** Imunohistoquímica para enzima óxido nítrico sintase induzido (iNOS) (A) Grupo I- Controle, observar levíssima marcação específica; (B) Grupo II- induzido a SOP sem tratamento, observar marcação específica para iNOS; (C e D) Grupos III e IV- induzidos a SOP e tratados com melatonina e cloridrato de metformina, respectivamente com leve marcação específica; (E) Grupo V- induzido a SOP e tratado com associação farmacológica, observar marcação semelhante ao grupo controle; (F) quantidade de iNOS em Pixels. Grupos com quantidade de asteriscos semelhantes não diferem estatisticamente. ( $P < 0,0350$ ).



**Figura 4:** Imunohistoquímica para Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). (A) Grupo I- grupo controle. (B) Grupo II- induzido a SOP sem tratamento com maior marcação quando comparados aos demais grupos; (C e D) Grupos III e VI- induzidos a SOP e tratado com melatonina e cloridrato de metformina, respectivamente, observar redução da reação imunohistoquímica, em relação ao grupo induzido a SOP sem tratamento; (E) Grupo V- induzido a SOP e tratado com associação farmacológica, observar reação próxima ao grupo controle; (F) quantidade de TNF- $\alpha$  em Pixels. Grupos com quantidade de asteriscos semelhantes não diferem estatisticamente. ( $P < 0,0350$ ).



**Figura 5:** Imunohistoquímica para citocina IL-1 $\beta$ . (A) Grupo I- controle; (B) Grupo II- induzido a SOP sem tratamento, observar maior marcação em relação ao grupo I- controle, grupo III- tratado com melatonina e grupo V- tratado com a associação dos fármacos; (C) induzido a SOP e tratado com melatonina; (D) Grupo IV- Tratado com cloridrato de metformina- Observar marcação moderada; (E) Grupo V- Tratado com associação dos fármacos; (F) quantidade de IL-1 $\beta$  em Pixels. Grupos com quantidade de asteriscos semelhantes não diferem estatisticamente. ( $P < 0,0350$ ).

## **Normas: Guia para autores da Plos One**

### **For Authors**

#### **PLOS ONE Manuscript Guidelines**

##### **1.Format Requirements**

##### **2.Guidelines for Standard Sections**

###### **Title**

###### **Authors and Affiliations**

###### **Abstract**

###### **Introduction**

###### **Materials and Methods**

###### **Results, Discussion, and Conclusions**

###### **Acknowledgments**

###### **References**

###### **Tables**

###### **Figure Legends**

###### **Striking Images**

##### **3.Specific Reporting Guidelines**

###### **Human Subject Research**

###### **Clinical Trials**

###### **Animal Research**

###### **Observational and Field Studies**

###### **Cell Line Research**

###### **Systematic Review/Meta-Analysis**

###### **Paleontology and Archaeology Research**

###### **Software Papers**

###### **Database Papers**

**New Zoological Taxon**

**New Botanical Taxon**

**New Fungal Taxon**

**Qualitative Research**

## **1. Format Requirements**

**PLOS ONE does not consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:**

- Cover letter**
- Manuscript, including tables and figure legends**
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the Figure and Table Guidelines)**

**Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are not copyedited before publication.**

**Submissions that do not meet the PLOS ONE Publication Criterion for language standards may be rejected.**

### **Cover Letter**

**You should supply an approximately one page cover letter that:**

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature**
- Briefly relates your study to previously published work**

- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggests appropriate PLOS ONE Academic Editors to handle your manuscript (view a complete listing of our academic editors)
- Lists any recommended or opposed reviewers

Your cover letter should not include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See PLOS ONE Editorial Policy for more information regarding publication fees.

#### **Manuscript Organization**

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will not consider monographs.

All manuscripts should include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction and end with the sections of:
  - Acknowledgments
  - References
  - Figure Legends
  - Tables

**Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures here.**

**The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.**

**There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:**

- Materials and Methods**
- Results**
- Discussion**
- Conclusions (optional)**

**PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found below.**

**Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.**

**Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.**

**Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Only RTF and .doc files can be used during the production process.**

**LaTeX Submissions.** If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the PLOS ONE LaTeX template and BibTeX style sheet. Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our LaTeX guidelines for a list of what will be required.

**Submissions with equations.** If your manuscript is or will be in .docx format and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

If you have not yet composed your article, you can ensure that the equations in your .docx file remain editable in .doc by enabling "Compatibility Mode" before you begin. To do this, open a new document and save as Word 97-2003 (\*.doc). Several features of Word 2007/10 will now be inactive, including the built-in equation editing tool. You can insert equations in one of the two ways listed below.

If you have already composed your article as .docx and used its built-in equation editing tool, your equations will become images when the file is saved down to .doc. To resolve this problem, re-key your equations in one of the two following ways.

- 1. Use MathType to create the equation (recommended)**
- 2. Go to Insert > Object > Microsoft Equation 3.0 and create the equation**

If, when saving your final document, you see a message saying "Equations will be converted to images," your equations are no longer editable and PLoS will not be able to accept your file.

- 2. Guidelines for Standard Sections**

## **Title**

**Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.**

**The full title must be 150 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).**

## **Examples:**

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model**
- Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial**

**The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.**

## **Authors and Affiliations**

**All author names should be listed in the following order:**

- First names (or initials, if used),**
- Middle names (or initials, if used), and**
- Last names (surname, family name)**

**Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.**

**This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.**

**To qualify for authorship, a researcher should contribute to all of the following:**

- 1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data**
- 2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content**
- 3. Final approval of the version to be published**

**All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.**

**When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.**

**One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.**

**See the PLOS ONE Editorial Policy regarding authorship criteria for more information.**

## **Abstract**

**The abstract should:**

- Describe the main objective(s) of the study**
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail**
- Summarize the most important results and their significance**
- Not exceed 300 words**

**Abstracts should not include:**

- Citations**
- Abbreviations, if possible**

## **Introduction**

**The introduction should:**

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study**
- Define the problem addressed and why it is important**
- Include a brief review of the key literature**
- Note any relevant controversies or disagreements in the field**
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved**

## **Materials and Methods**

**This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.**

**We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. These are published online only, but are linked to the article and are fully searchable. Further information about formatting Supporting Information files, can be found here.**

**Methods sections of papers on research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.**

**Methods sections of papers with data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.**

**Methods sections of papers using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the Reporting Guidelines for cell line research for more information.**

**Methods sections of papers adding new taxon names to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.**

### **Results, Discussion, and Conclusions**

**These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.**

**Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.**

**PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the PLOS ONE Publication Criteria for more information.**

### **Acknowledgments**

**People who contributed to the work but do not fit the PLOS ONE authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.**

Funding sources should not be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

## References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Manuscripts that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as “unpublished data.”

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

Proper formatting of the references is crucial; some examples are shown below.

•Published papers. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

•Accepted, unpublished papers. Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.

•Electronic journal articles. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.

•Books. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.

•Book chapters Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

#### **Tables**

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information. Please ensure that table formatting conforms to our Guidelines for table preparation.

#### **Figure Legends**

Figures should not be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found here.

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

**Further information about figure legends can be found in the Figure Guidelines.**

### **Striking Images**

**Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.**

**Please keep in mind that PLOS's Creative Commons Attribution License applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in PLOS ONE are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.**



### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0890-6238

### DESCRIPTION

Drawing from a large number of disciplines, *Reproductive Toxicology* publishes timely, original research on the influence of chemical and physical agents on reproduction. Written by and for obstetricians, pediatricians, embryologists, teratologists, geneticists, toxicologists, andrologists, and others interested in detecting potential reproductive hazards, the journal is a forum for communication among researchers and practitioners. Articles focus on the application of *in vitro*, animal and clinical research to the practice of clinical medicine.

All aspects of reproduction are within the scope of *Reproductive Toxicology*, including the formation and maturation of male and female gametes, sexual function, the events surrounding the fusion of gametes and the development of the fertilized ovum, nourishment and transport of the conceptus within the genital tract, implantation, embryogenesis, intrauterine growth, placentation and placental function, parturition, lactation and neonatal survival. Adverse reproductive effects in males will be considered as significant as adverse effects occurring in females. To provide a balanced presentation of approaches, equal emphasis will be given to clinical and animal or *in vitro* work. Typical end points that will be studied by contributors include infertility, sexual dysfunction, spontaneous abortion, malformations, abnormal histogenesis, stillbirth, intrauterine growth retardation, prematurity, behavioral abnormalities, and perinatal mortality.

In addition to original research articles, *Reproductive Toxicology* also publishes interpretative review articles, editorials, letters, book reviews, and conference announcements. The first section of each issue of the journal is devoted to an in-depth, timely review of research on the effect of particular chemical or physical agents on reproduction. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before submitting such a review.

### AUDIENCE

Obstetricians, pediatricians, embryologists, geneticists.

### IMPACT FACTOR

2011: 3.226 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
Biomedical Database  
Current Contents/Life Sciences  
EMBASE  
EMbiology  
Elsevier BIOBASE  
Reproduction Research  
SCISEARCH  
Science Citation Index  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Thomas B. Knudsen, Ph.D.**, Birth Defects Center, Room 301, University of Louisville, 501 S. Preston Street, Louisville, KY 40202, USA, Fax: +1 919 541 1194, **Email:** [RTX@louisville.edu](mailto:RTX@louisville.edu)

### *Associate Editors*

**Claudia Kappen**, Developmental Biology, Pennington Biomedical Research Center/Louisiana State University System, 6400 Perkins Road, Baton Rouge, LA- 70808, USA

Peggy M. Pennington Cole Chair in Maternal Biology

**C. Lau**, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Research Triangle Park, NC, USA

**Dr. Aldert H. Piersma**, Lab. for Health Protection Research, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Antonie Van Leeuwenhoeklaan 9, 3721 MA Bilthoven, Netherlands

**Dr. W.S. Webster**, Dept. of Anatomy & Histology, School of Medical Science, University of Sydney, Anderson Stuart Building F13, Eastern Avenue, Sydney, NSW 2006, Australia

### *Founding Editor*

**Anthony R. Scialli, M.D.**, Director, Reproductive Toxicology Center, 2737 Devonshire Place NW, #120, Washington, D.C. 20008-3459, USA

### *Editorial Board*

**Graham Bailey**, Beerse, Belgium

**John Bannigan**, Belfield, Dublin, Ireland

**Stéphane Barbellion**, Vitry-sur-Seine cedex, France

**Steve Barton**, Edinburgh, UK

**Manon Beekhuijzen**, 's-Hertogenbosch, Netherlands

**Nigel A. Brown**, London, England, UK

**Graham Copping**, UK

**Simon Craige**, Lausanne, Switzerland

**Bengt Danielsson**, Lund, Sweden

**Makoto Ema**, Tokyo, Japan

**Elpida-Niki Emmanouil-Nikoloussi**, Thessaloniki, Greece

**Ali Faqi**, Mattawan, MI, USA

**Suzanne E. Fenton**, Research Triangle Park, NC, USA

**Jodi A. Flaws**, Urbana, IL, USA

**Janee Gelineau-van Waes**, Omaha, NE, USA

**Julia M. Gohlke**, Birmingham, AL, USA

**Nina Hallmark**, Machelen, Belgium

**Ulla Hass**, Søborg, Denmark

**Mary Hixon**, Providence, RI, USA

**Wilma Kempinas**, Botucatu, São Paulo, Brazil

**Susan Maier**, Bethesda, MD, USA

**Susan L. Makris**, Washington, DC, USA

**Heinz Nau**, Hannover, Germany

**Asher Ornoy**, Jerusalem, Israel

**Deborah Perks**, Harrogate, North Yorkshire, England, UK

**M. Michele Pisano**, Louisville, KY, USA

**Luc De Schaepdrijver**, Beerse, Belgium

**Steffen Schneider**, Ludwigshafen, Germany

**Stefan Scholz**, Leipzig, Germany

**Dana Shuey**, Chadds Ford, PA, USA

**Michael K. Skinner**, Pullman, WA, USA  
**Mary Alice Smith**, Athens, GA, USA  
**J. Christopher States**, Louisville, KY, USA  
**Donald G. Stump**, Ashland, OH, USA  
**Mariska Tegelenbosch-Schouten**, Zeist, Netherlands  
**Rochelle W. Tyl**, Research Triangle Park, NC, USA  
**Tatjana Vergieva**, Sofia, Bulgaria  
**Tacey E.K. White**, Vienna, VA, USA  
**Louise Winn**, Kingston, ON, Canada  
**André Wolterbeek**, Zeist, Netherlands

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

Drawing from a large number of disciplines, *Reproductive Toxicology* publishes timely, original research on the influence of chemical and physical agents on reproduction. Written by and for obstetricians, pediatricians, embryologists, teratologists, geneticists, toxicologists, andrologists, and others interested in detecting potential reproductive hazards, the journal is a forum for communication among researchers and practitioners. Articles focus on the application of in vitro, animal and clinical research to the practice of clinical medicine.

All aspects of reproduction are within the scope of *Reproductive Toxicology*, including the formation and maturation of male and female gametes, sexual function, the events surrounding the fusion of gametes and the development of the fertilized ovum, nourishment and transport of the conceptus within the genital tract, implantation, embryogenesis, intrauterine growth, placentation and placental function, parturition, lactation and neonatal survival. Adverse reproductive effects in males will be considered as significant as adverse effects occurring in females. To provide a balanced presentation of approaches, equal emphasis will be given to clinical and animal or in vitro work. Typical end points that will be studied by contributors include infertility, sexual dysfunction, spontaneous abortion, malformations, abnormal histogenesis, stillbirth, intrauterine growth retardation, prematurity, behavioral abnormalities, and perinatal mortality.

#### *Types of paper*

In addition to original research articles, *Reproductive Toxicology* also publishes interpretative review articles, editorials, letters, book reviews, and conference announcements. The first section of each issue of the journal is devoted to an in-depth, timely review of research on the effect of particular chemical or physical agents on reproduction. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before submitting such a review.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

*Acknowledgements.* All sources of funding supporting the work are to be declared. Authors are to disclose all financial relationships with any persons or organizations that could be perceived to bias the work described in the manuscript. These acknowledgements should be placed after the text and before the references, under the heading "Acknowledgements". In submitting the article for consideration for publication, the author(s) attest that all potential conflicts of interest have been disclosed and addressed in the manuscript.

#### *Changes to authorship*

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### *US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy:*

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

## **PREPARATION**

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

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

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

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

#### *Introduction*

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

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

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

### *Conclusions*

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

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should contain no more than 150 words.**

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

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

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

#### *Formats*

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

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

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### **Please do not:**

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

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g.,

ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

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

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

##### *Reference style*

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

##### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>