

Análise imunoistoquímica e histomorfométrica do endométrio de ratas em estro permanente tratadas com melatonina, metformina e citrato de clomifeno

Immunohistochemical and histomorphometric analysis of the endometrium of rats in permanent estrus treated with melatonin, metformin and clomiphene citrate

Análisis inmunohistoquímico e histomorfométrico del endometrio de ratas en celo permanente tratadas con melatonina, metformina y citrato de clomifeno

Recebido: 05/05/2022 | Revisado: 14/05/2022 | Aceito: 19/05/2022 | Publicado: 24/05/2022

Leandro Sabará de Mattos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3041-7344>
Universidade Nove de Julho, Brasil
E-mail: leomattos1984@gmail.com

Leonardo Augusto Lombardi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9735-8804>
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: Leonardo.lombardi@uftm.edu.br

Marcio Luis Alves Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1259-2202>
Universidade Cruzeiro do Sul, Brasil
E-mail: mouramarciomoura@gmail.com

Ana Paula Espindula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9282-4482>
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
E-mail: ana.espindula@uftm.edu.br

Ricardo Santos Simões

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7207-4856>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: mjsimoes_43@hotmail.com

Rinaldo Florencio-Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2956-6230>
Universidade Federal do São Paulo, Brasil
E-mail: rinaldohisto.cell@gmail.com

Paulo Celso Franco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-1492>
Universidade Federal do São Paulo, Brasil
E-mail: paulinho.morf@yahoo.com.br

Gisela Rodrigues da Silva Sasso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6583-1329>
Universidade Federal do São Paulo, Brasil
E-mail: gisela.morf@gmail.com

Manuel de Jesus Simões

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2770-8618>
Universidade Federal do São Paulo, Brasil
E-mail: manuel.morf@epm.br

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos da melatonina, metformina e citrato de clomifeno no endométrio de ratas modelo de síndrome dos ovários policísticos. **Métodos:** Setenta e oito ratas foram divididas em 13 grupos e dois experimentos (prevenção e tratamento). Após as exposições todos os animais foram anestesiados e tiveram retirados os cornos uterinos e submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina e imunoistoquímica (Ki-67 e Vegf). Os dados obtidos foram submetidos ao teste t de Student ($p < 0,05$). **Resultados/Conclusão:** A melatonina, a metformina e o citrato de clomifeno não promovem efeitos proliferativos e angiogênicos no endométrio de ratas em estro permanente, porém, a melatonina tem efeito trófico mais significativo no estroma endometrial, o que não interferiu na sua espessura, enquanto que a metformina apresentou efeito trófico mais significante no epitélio glandular do endométrio, portanto, estes efeitos são semelhantes tanto antes quanto após a indução de SOP por exposição à luz contínua.

Palavras-chave: Endométrio; Estro permanente; Ensino em Saúde; Melatonina; Metformina; Citrato de clomifeno; Ratas.

Abstract

Objective: To evaluate the effects of melatonin, metformin and clomiphene citrate on the endometrium of polycystic ovary syndrome model rats. **Methods:** Seventy-eight rats were divided into 13 groups and two experiments (prevention and treatment). After exposure, all animals were anesthetized and the uterine horns were removed and submitted to hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry (Ki-67 and Vegf). The data obtained were submitted to Student's t test ($p < 0.05$). **Results/Conclusion:** Melatonin, metformin and clomiphene citrate do not promote proliferative and angiogenic effects on the endometrium of rats in permanent estrus, however, melatonin has a more significant trophic effect on the endometrial stroma, which did not interfere with its thickness, while that metformin had a more significant trophic effect on endometrial glandular epithelium, therefore, these effects are similar both before and after PCOS induction by continuous light exposure.

Keywords: Endometrium; Permanent estrus; Health teaching; Melatonin; Metformin; Clomiphene citrate; Rats.

Resumen

Objetivo: Evaluar los efectos de la melatonina, metformina y citrato de clomifeno en el endometrio de ratas modelo con síndrome de ovario poliquístico. **Métodos:** Setenta y ocho ratas se dividieron en 13 grupos y dos experimentos (prevención y tratamiento). Después de la exposición, todos los animales fueron anestesiados y los cuernos uterinos fueron removidos y sometidos a tinción con hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica (Ki-67 y Vegf). Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de la t de Student ($p < 0,05$). **Resultados/Conclusión:** La melatonina, la metformina y el citrato de clomifeno no promueven efectos proliferativos y angiogénicos sobre el endometrio de ratas en celo permanente, sin embargo, la melatonina tiene un efecto trófico más significativo sobre el estroma endometrial, que no interfiere con su espesor, mientras que la metformina tuvo un efecto trófico más significativo sobre el epitelio glandular endometrial, por lo tanto, estos efectos son similares tanto antes como después de la inducción del SOP por exposición continua a la luz.

Palabras clave: Endometrio; Estro permanente; Enseñanza en salud; Melatonina; Metformina; Citrato de clomifeno; Ratas.

1. Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos, também conhecida pela sigla SOP, é um distúrbio endócrino que provoca alteração dos níveis hormonais, levando à formação de cistos nos ovários que fazem com que eles aumentem de tamanhos. É a alteração hormonal mais comum em mulheres na idade fértil. Modelos experimentais de indução a SOP em animais foram desenvolvidos; entre eles, a exposição de ratas à luz contínua (Salveti et al., 2009). Nessas condições, as ratas entram em estado de estro permanente, ocorrendo ausência de ovulação com a presença de cistos ovarianos, assim como um aumento dos androgênios circulantes e da resistência insulínica (Sara et al., 2012).

Alguns autores fazem referência a presença de grande número de células intersticiais nesses ovários (Lombardi et al., 2012). Em ratas normais ou em estro permanente é referido que os androgênios provêm da interação das células tecais e intersticiais (T-I) (Soares et al., 2003 e Ortega et al., 2012).

A ocorrência de ovulação espontânea em mulheres espaniomenorreicas com SOP não necessariamente leva a um aumento na receptividade endometrial, principalmente em programas de fertilização (Quezada et al., 2006). Por outro lado, o tratamento da infertilidade com agentes indutores da ovulação como o citrato de clomifeno tem resultados desapontadores com baixa taxa de gravidez (Savaris et al., 2011). Este fato é talvez melhor ilustrado na fertilização *in vitro* (FIV), quando também as taxas de sucesso encontradas continuam baixas, apesar da excelente qualidade dos embriões transferidos. Isso sugere que a anovulação não é a única causa da infertilidade (Donaghay & Lessey, 2007), levando a crer que a receptividade endometrial poderia ter um papel crucial no estabelecimento e desenvolvimento da gravidez em mulheres com SOP. De fato, dados emergentes sugerem que a receptividade endometrial também contribui para a infertilidade (Donaghay & Lessey, 2007; Salamonsen et al., 2009; Cakmak & Taylor, 2011).

A SOP é a endocrinopatia mais comum presente nos consultórios dos ginecologistas. No passado, representava apenas um problema estético e de irregularidade menstrual. Atualmente, está intimamente ligada à resistência insulínica, que pode acometer gravemente a saúde dessas mulheres, com repercussões metabólicas e cardiovasculares. As conclusões são obtidas em grande parte de estudos retrospectivos e ainda não são definitivas. (Tan et al., 2016). A melatonina é uma indolamina (um

neurotransmissor inicialmente identificado por seus efeitos cardiovasculares) produzida pela glândula pineal (Commentz e Helmke, 1995). Contudo, pouco se sabe sobre ação anti-apoptótica da melatonina no endométrio (Ferreira et al., 2016). A metformina é um agente hipoglicemiante oral, derivado da guanidina, utilizado no controle de Diabetes do tipo 2, em especial por pessoas obesas (Mathur et al., 2008). Embora uma série de estudos *in vitro* tenham demonstrado os efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e antimetastáticos da metformina em vários tipos de células cancerígenas, incluindo células de câncer de tipo I e tipo 3, seus mecanismos celulares e moleculares de ação anticâncer no endométrio de mulheres com SOP ainda não foi totalmente elucidada (Franciosi et al., 2013). O citrato de clomifeno e os sensibilizadores de insulina podem ser utilizados isoladamente ou combinados para induzir a ovulação (Legro et al., 2007).

Nesta perspectiva, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da melatonina, metformina e citrato de clomifeno no endométrio de ratas em estro permanente induzido por iluminação contínua.

2. Metodologia

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) sob protocolo 5216/14. O estudo consiste em uma pesquisa observacional, transversal, quantitativa e longitudinal (Pereira et al., 2018).

Animais

Foi realizado estudo experimental prospectivo utilizando 78 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultas (três meses de idade), virgens, pesando aproximadamente 250g, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da UNIFESP/EPM.

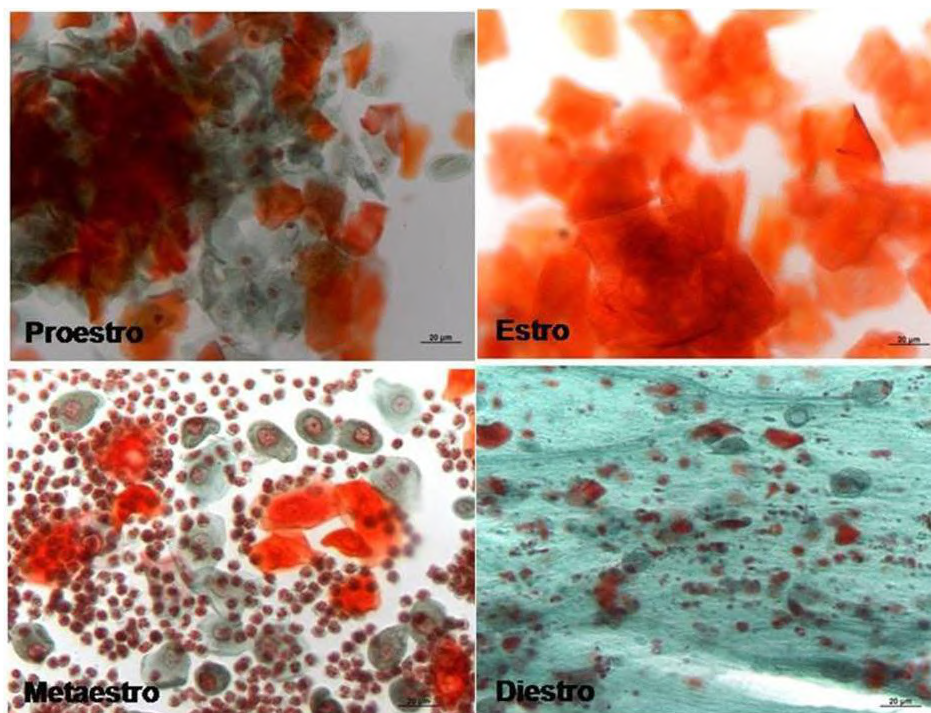
Os animais foram transportados para o Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP-EPM, onde ficaram confinados em gaiolas plásticas com tampa de metal gradeada, medindo 45 x 35 x 15 cm de comprimento, largura e altura, respectivamente, e iluminação artificial obtida utilizando-se uma caixa de madeira, bem dimensionada e ventilada, contendo lâmpadas (Phillips, modelo luz dia, 40 W), as quais forneceram cerca de 400 Lux na região ocupada pelos animais (Teixeira et al., 2004), sendo o foto período claro de 10 horas intercalado com escuro de 14 horas (Pertsov, 2006), considerando o período de luz das 8 horas às 18 horas, até o final do experimento. As ratas foram alimentadas com ração padrão (Labina-Purina, São Paulo, Brasil) e água "*ad libitum*", na temperatura ambiente de 22°C.

Determinação da fase do ciclo estral

Após um período de adaptação de sete dias ao novo ambiente, todos os animais foram submetidos à coleta diária de secreção vaginal (às 08h00min), durante 21 dias consecutivos, visando avaliação da função ovariana.

Para a confecção do exame colpocitológico, procedeu-se inicialmente à imobilização do animal, e em seguida, com um *swab* de algodão flexível (Cotonettes®) embebida em soro fisiológico, o qual foi introduzido no orifício vaginal e por manobra delicada de rotação colheu-se o conteúdo vaginal. Esse material foi distribuído em lâminas histológicas previamente higienizadas, as quais foram mergulhadas em seguida, para fixação, em uma solução álcool-éter (1:1). Após 15 minutos, o material foi corado pelo método de Shorr-Harris (Shorr, 1941), sendo posteriormente analisados ao microscópio de luz. As quatro fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) foram identificadas (Camano & Giuffrda, 1970) (Figura 1). O resultado dos exames permitiu a observação das sequências dos ciclos estrais regulares, mostrando atividade normal das gônadas. Assim, somente as ratas com ciclos estrais regulares, conseqüentemente, ratas que apresentaram atividade estrogênica regular, foram incluídas neste estudo (Montes e Luque, 1988).

Figura 1 – Fotomicrografias de colpocitológicas de ratas adultas nas várias fases do ciclo estral.



No proestro podemos identificar a presença de células acidófilas e cianófilas; no estro células acidófilas anucleadas; no metaestro concentração de leucócitos, células acidófilas e basófilas, e no diestro a presença de muco, leucócitos e algumas células acidófilas e basófilas. Shorr-Harris. Fonte: Autores.

Indução do estro permanente pela iluminação contínua

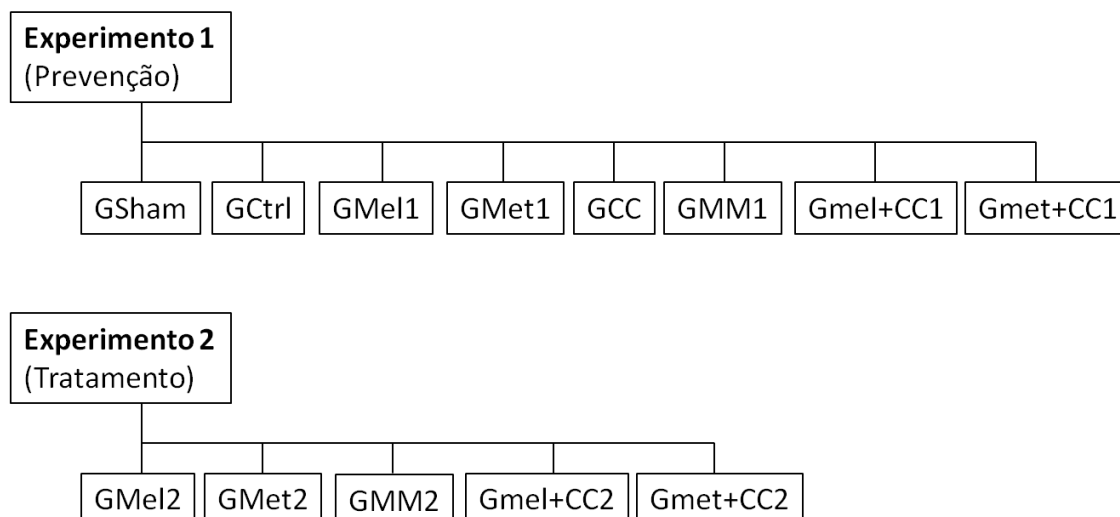
Para induzir as ratas ao estado de estro permanente (modelo animal com ovários policísticos), os animais foram alocados em caixas de madeira, mantidas em biotério sob iluminação artificial contínua por meio de lâmpadas (Philips, modelo luz dia, 40 W) que fornecem cerca de 400 Lux na região ocupada pelas ratas durante um período de 60 dias consecutivos. Já os animais do Sham permaneceram sob as mesmas condições normais de biotério, no entanto, com período de luz das 07h00min às 19h00min horas.

Após o período de 60 dias, foram realizados novamente exames colpocitológicos por um período de sete dias, com o objetivo de analisar as fases do ciclo estral. Para tanto, com o auxílio de hastes de algodão, embebidas em soro fisiológico, foram colhidas amostras do epitélio vaginal que foram mergulhadas em solução de álcool-éter e posteriormente coradas pelo método de Shorr-Harris. Dessa forma, dos animais pertencentes aos grupos do experimento I (prevenção) foram utilizadas somente as ratas que estavam ciclando regularmente. Já os animais pertencentes aos grupos do experimento II previamente submetidos à luz contínua foram utilizados os que se apresentavam ao final do experimento ciclos estrais. Todos os animais foram eutanasiados na fase de estro.

Grupos experimentais

Após o período de adaptação e avaliação do ciclo estral, as ratas foram divididas ao acaso em 13 grupos, contendo cada um, seis animais. Os grupos foram divididos em dois experimentos. Experimento I (Prevenção) e Experimento II (Tratamento) (Figura 2). As doses administradas e as vias de administração dos fármacos estão representadas na Tabela 1.

Figura 2 – Representação esquemática dos grupos estudados.



Fonte: Autores.

Experimento I (Prevenção) e experimento II (Tratamento). GSham – Grupo de ratas na fase de estro fisiológico normal; GCtrl – Grupo de ratas em estro permanente expostas a iluminação contínua por 60 dias (modelo experimental de SOP); GMel 1 - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo diariamente melatonina por um período de 60 dias; GMetf 1 - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo diariamente metformina por um período de 60 dias; GCC - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo citrato de clomifeno nos últimos 5 dias de exposição; GMM 1 - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo diariamente Melatonina e metformina por um período de 60 dias; GMel+CC 1 - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo diariamente melatonina por um período de 60 dias e citrato de clomifeno nos últimos 5 dias de exposição; GMetf+CC 1 - Grupo de ratas expostas a iluminação contínua recebendo diariamente metformina por um período de 60 dias e citrato de clomifeno nos últimos 5 dias de exposição. GMel 2 – Grupo de ratas em estro permanente que permaneceram expostas a iluminação contínua recebendo diariamente melatonina por um período de 60 dias. GMetf 2 - Grupo de ratas em estro permanente que permaneceram expostas a iluminação contínua recebendo diariamente metformina por um período de 60 dias; GMM 2 - Grupo de ratas em estro permanente que permaneceram expostas a iluminação contínua recebendo diariamente melatonina e metformina por um período de 60 dias; GMel+CC 2 - Grupo de ratas em estro permanente que permaneceram expostas a iluminação contínua recebendo diariamente melatonina por um período de 60 dias e citrato de clomifeno nos últimos 5 dias de exposição; GMetf+CC 2 - Grupo de ratas em estro permanente que permaneceram expostas a iluminação contínua recebendo diariamente metformina por um período de 60 dias e citrato de clomifeno nos últimos 5 dias de exposição.

Tabela 1 – Representação dos fármacos, doses e vias de administração.

Fármaco	Dose	Via de administração
Melatonina	0,4 mg diluída em 500ml de água (10µg/noite/animal)	Via oral (água de beber)
Metformina	12,5 mg diluída em 1ml de água	Gavagem
Citrato de Clomifeno	16 mg/Kg	Injeção intraperitoneal

Fonte: Autores.

Experimento I - (Prevenção)

O Experimento I foi composto por ratas que receberam melatonina, metformina ou citrato de clomifeno durante todo o período de 60 dias de exposição à iluminação contínua, sendo considerado grupo de prevenção.

Experimento II - (Tratamento)

Foi constituído por animais em estro permanente induzidos pela iluminação contínua que, após a exposição à luz, receberam melatonina, metformina e citrato de clomifeno como forma de tratamento. Vale destacar que os animais deste segundo experimento, permaneceram expostos a iluminação contínua durante todo o tempo de tratamento, totalizando uma exposição de 120 dias (60 dias de exposição para indução ao estado de estro permanente e 60 dias de exposição recebendo tratamento).

Retirada dos cornos uterinos

Após o período de exposição e tratamento os animais foram anestesiados com 15 mg/kg de xilazina (Rompun®, SP, Brasil) associados a 30 mg/kg de ketamina (Ketalar®, SP, Brasil) via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a tricotomia na região torácica e abdominal seguida de incisão longitudinal na linha mediana. Após a abertura do gradil costal foi realizado procedimento de perfusão transcardíaca para melhor fixação do material. Inicialmente foi perfundido 800ml de solução salina (0,9%) seguida de 800ml de solução paraformaldeído a 4% (tampão-fosfato 10 mM, pH 7,4). Após a perfusão, os cornos uterinos foram retirados e mergulhados em paraformaldeído a 4% (tampão-fosfato 10 mM, pH 7,4) por 24 horas e posterior processamento histológico de inclusão em parafina.

Ao final da retirada dos cornos uterinos, os animais foram sacrificados pelo aprofundamento do plano anestésico e descartados segundo as normas vigentes da comissão de descartes de resíduos da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

Processamento histológico

Os cornos uterinos de cada animal foram fixados em paraformaldeído a 4% (tampão fosfato) por 24 horas e depois desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 60 °C, segundo a metodologia preconizada por Michalany (1998). A inclusão foi realizada de tal maneira que pode ser observado nas lâminas histológicas, cortes transversais da região medial dos cornos uterinos. Em sequência, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot, ajustado para 4 µm com distância entre os cortes de 50µm de acordo com o preconizado por Regan et al. (2005).

Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Três lâminas de cada animal foram então submetidas ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (HE), para posterior análise morfológica e histomorfométrica; outros cortes foram submetidos aos métodos imunohistoquímicos e Picro Sirius Red, descritos a seguir.

Na análise morfológica foi utilizado microscópio de luz, da marca Carl Zeiss, com objetivas variando de 2,5 a 100X para caracterização de cada corte histológico.

Análise morfológica e histomorfométrica

A histomorfometria foi realizada com auxílio de um sistema de captura de imagens AxionVision (Carl Zeiss). Este sistema consiste em um microscópio de luz Axiolab Standart 20 (Carl Zeiss), acoplado a uma câmera de vídeo de alta resolução (AxionCam Carl Zeiss, Jena, Alemanha), que transmite as imagens a um computador contendo programa de análise de imagens (Axion Vision 4.6 REL) (Rossi et al., 2006).

Com o microscópio em objetiva de 40x, oito campos foram capturados em sentido horário de superior para inferior, sendo avaliados os seguintes parâmetros: 1 – Espessura do endométrio (mm); 2 – Número de glândulas uterinas (nº/ área em μm^2); 3 – Número de eosinófilos (nº/ área em μm^2).

A média do número de glândulas uterinas, e de eosinófilos foram determinadas pela contagem total de cada seção transversal do corno uterino. As medidas de espessura do endométrio foram realizadas pelo programa Imagelab-Softium (São Paulo, Brasil).

Avaliação das fibras colágenas em microscópio de polarização

Para análise das fibras colágenas birrefringentes no endométrio das ratas, cortes dos cornos uterinos foram submetidos à técnica de Picro-Sírius. Para tanto, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool. Em seguida foram lavados em água corrente por 5 minutos, passados rapidamente em água destilada, e corados pelo Picro-Sírius (solução de Sírius Red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado) por 30 minutos. Após, os cortes foram lavados em solução de HCl 0,01N por 2 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados e diafanizados pelo xilol e as lâminas foram montadas com *Entellan*. Em seguida, os cortes foram analisados com os filtros de polarização acoplados ao microscópio de Zeiss (modelo LAB-A1 – AxioCam Icc 5), onde foram realizadas análises semi-quantitativa do colágeno birrefringente presente no estroma endometrial. Foram utilizados três cortes/animal, com intervalo mínimo de 50 μm . Em cada corte, foram mensuradas três áreas de aproximadamente 0,09mm², totalizando 0,27 mm² por corte. A porcentagem de fibras colágenas birrefringente foi estimada utilizando o programa ImageJ® (NIH). Foi padronizado um tamanho de imagem, sendo este 480x4080 pixels, portanto, 1.958.400 pixels no total. A imagem foi carregada no programa e convertida para 8bits com canal de cores de 256 cores. A partir do comando “*Colour Threshoud*” foram isolados canais de cores (matizes) específicos (verde, amarelo, laranja e vermelho. Foi utilizado sobre essa imagem o comando “*Analyse Particles*”, convertendo as cores em pixels. Fibras colágenas com birrefringência esverdeada correspondem a menos pixels convertidos, ao passo que fibras colágenas com birrefringência avermelhada correspondem a mais pixels convertidos. Desse modo foi possível obter o valor absoluto de pixels de cada imagem. A partir desse valor foi determinada a frequência de pixels correspondentes as cores da imagem em relação ao número total de pixels, obtendo assim um valor em porcentagem. O valor obtido representa a porcentagem de pixels de uma determinada cor que existe na imagem.

Análise imunoistoquímica

Os cortes coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção de Ki-67 e Vegf-A. Para tanto, após a desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 5% por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena e posteriormente lavados em água corrente. Para recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0) aquecido em panela a vapor, durante 40 minutos a temperatura de 90-94 °C. Após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram incubados com leite desnatado a 5% diluído em PBS (fosfato de sódio 0,05M + cloreto de sódio 0,2M – pH 7,2) e em seguida, incubados com os anticorpos primários anti-Ki67 e anti-Vegf-A (Spring – São Paulo - Brasil), em câmara úmida a 4°C, por aproximadamente 16 horas.

Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e então incubados no anticorpo secundário (Biotinylated Link Universal - Kit Dako LSAB+ System-HRP, Dako North America, Inc.-USA); durante 1 hora; após as lavagens dos cortes, a reação foi revelada em solução contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB), Dako North America, Inc.-USA); os cortes foram então contracorados com hematoxilina e montados em *Entellan*® (Merck). Como controle negativo da reação, os cortes foram submetidos às mesmas etapas, excetuando-se a etapa de incubação com anticorpos primários; nesta etapa, os cortes foram incubados com soro não imunizado.

Em cada corte e sob objetiva de 40x, oito campos de regiões do endométrio foram capturados aleatoriamente. Nestes campos foi quantificado o número de células com núcleos positivos ao Ki-67. Já a reação imunoistoquímica para o Vegf-A foi avaliada pela intensidade da imunomarcagem, sendo 0 para ausente, 1 para fraco, 2 para média, 3 para forte e 4 para muito forte.

Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados pelo teste de ANOVA complementado pelo teste de Tukey e pelo teste *t* de *Student* não pareado. Para tal utilizou-se o software “Graph Pad 5 Prisma”. Fixou-se em 5% ($p \leq 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

3. Resultados

Experimento I - (Prevenção)

Análise morfológica e histomorfométrica

Na análise morfológica notou-se que o endométrio de todos os grupos se mostrou semelhante, apresentando epitélio superficial cilíndrico simples e estroma celularizado, com a presença de fibroblastos característicos; glândulas endometriais, células com núcleo bilobulado e citoplasma eosinofílico (presumivelmente eosinófilos) e perfis de vasos sanguíneos também foram observadas em todos os grupos.

A análise histomorfométrica mostrou que a espessura do endométrio não diferiu entre os grupos. Entretanto, o número de glândulas endometriais foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos grupos Metf+CC1 e MM1, em comparação aos outros grupos. Já o número de eosinófilos se mostrou significativamente maior ($P < 0,05$) nos grupos MM1, Mel, Mel+CC1 e Mel1, quando comparados aos outros grupos (Tabela 2).

A análise dos cortes corados com Picro Sirius ao microscópio de luz polarizada identificou no grupo Mel1 menor porcentagem de fibras colágenas birrefringentes, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao GCtrl (Tabela 2).

Tabela 2 – Representação quantitativa das médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos tratamentos realizados nos grupos estudados no experimento I.

Experimento I (Prevenção)				
	Endométrio (μm^2)	Glândulas (Nº / área)	Eosinófilos (Nº / área)	Colágeno (% / mm^2)
GCtrl	541,9 \pm 115,1	0,79 \pm 0,51	1,37 \pm 0,04	6,37 \pm 0,47
GSham	545,3 \pm 36,98	1,52 \pm 0,36	1,09 \pm 0,14	5,58 \pm 0,92
GMel 1	467,4 \pm 108,1	1,00 \pm 0,52	2,42 \pm 0,01*	3,83 \pm 1,17**
GMetf 1	566,1 \pm 65,44	1,35 \pm 0,17	1,94 \pm 0,59	4,48 \pm 0,23
GCC	426,9 \pm 91,39	0,87 \pm 0,37	1,72 \pm 0,44	5,85 \pm 1,62
GMM 1	503,6 \pm 128,9	2,05 \pm 0,40***	4,04 \pm 0,59***	4,43 \pm 1,03
GMel+CC 1	443,1 \pm 64,63	1,11 \pm 0,76	2,43 \pm 1,04*	5,22 \pm 1,59
GMetf+CC 1	468,6 \pm 60,22	2,50 \pm 0,07***	1,72 \pm 0,06	5,67 \pm 1,27

*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Autores.

Análise Imunoistoquímica

A reação imunoistoquímica para Ki-67 revelou células com núcleos imunomarcados em todos os grupos, sendo, no entanto, mais evidente no epitélio superficial e menos evidente no estroma endometrial. A quantificação mostrou maior número de células Ki-67 positivas nos grupos Ctrl e Sham, em comparação aos grupos tratados com os fármacos, sobretudo em comparação ao tratado com citrato de clomifeno isolado (GCC), ou combinado com melatonina (GMel+CC1) ou metformina (GMetf+CC1). (Tabela 3).

A reação imunoistoquímica para Vegf-A também mostrou maior imunopositividade nos grupos Ctrl e Sham, em comparação aos grupos tratados com os fármacos, sendo que o grupo que recebeu melatonina e metformina combinados (MM1) foi o que mostrou imunopositividade mais fraca (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão (M±DP) da detecção imunoistoquímica ao ki-67 e Vegf-A dos parâmetros obtidos nos endométrios das ratas tratadas no experimento I.

Experimento I (Prevenção)								
	GCtrl	GSham	GMel 1	GMetf 1	GCC	GMM 1	GMel+CC 1	GMetf+CC 1
Ki-67	7,53 ± 0,82	6,20 ± 0,41*	5,75 ± 0,63**	4,82 ± 1,00**	1,28 ± 0,33**	5,96 ± 0,48**	2,95 ± 0,24**	2,73 ± 0,34**
Vegf-A	2,21 ± 0,16	1,48 ± 0,07**	1,45 ± 0,28**	0,98 ± 0,17**	1,15 ± 0,18**	0,96 ± 0,17**	1,35 ± 0,10**	1,36 ± 0,15**

** $P < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Autores.

Experimento II - (Tratamento)

Análise morfológica e histomorfométrica

Assim como no experimento I a análise morfológica mostrou que o endométrio de todos os grupos se apresentaram semelhantes, exibindo epitélio superficial cilíndrico simples e estroma celularizado, além de fibroblastos característicos. Além disso, também foram observadas glândulas endometriais, células com núcleo bilobulado e citoplasma eosinofílico (presumivelmente eosinófilos) e perfis de vasos sanguíneos em todos os grupos.

A análise histomorfométrica mostrou que a espessura do endométrio não diferiu entre os grupos, (Tabela 4). Por outro lado, o número de glândulas endometriais foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos grupos Metf+CC2 e Sham, em comparação ao grupo controle (Tabela 4). Já o número de eosinófilos se mostrou significativamente maior ($P < 0,05$) nos grupos Mel2, Metf2, MM2 e Metf+CC2 (Tabela 4).

Assim como no experimento I, a análise dos cortes corados com Picro Sirius ao microscópio de polarização no experimento II revelou em todos os grupos, a presença de feixes de fibras colágenas com birrefringência esverdeada, amarelada e alaranjada. O padrão de birrefringência dessas fibras se mostrou semelhante em todos os grupos, exceto no grupo tratado com metformina (GMetf2), onde se observou predominância de fibras colágenas com birrefringência esverdeada. A quantificação da birrefringência total não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Representação quantitativa das médias e desvio padrão (M±DP) dos tratamentos realizados nos grupos estudados no experimento II.

Experimento II (Tratamento)				
	Endométrio (µm²)	Glândulas (Nº / área)	Eosinófilos (Nº / área)	Colágeno (% / mm²)
GCtrl	541,9 ± 115,1	0,79 ± 0,51	1,37 ± 0,04	6,37 ± 0,47
GSham	545,3 ± 36,98	1,52 ± 0,36*	1,09 ± 0,14	5,58 ± 0,92
GMel 2	640,0 ± 115,5	1,01 ± 0,34	2,93 ± 0,13***	7,53 ± 1,47
GMetf 2	632,7 ± 49,35	1,18 ± 0,09	1,83 ± 0,08	5,45 ± 0,19
GCC	426,9 ± 91,39	0,87 ± 0,37	1,72 ± 0,44	5,85 ± 1,62
GMM 2	471,0 ± 206,2	1,21 ± 0,43	1,62 ± 0,17	5,69 ± 0,53
GMel+CC 2	524,6 ± 75,91	1,05 ± 0,15	1,55 ± 0,54	6,54 ± 0,53
GMetf+CC 2	575,2 ± 21,85	2,34 ± 0,09***	1,62 ± 0,11	6,09 ± 0,22

****p* < 0,0001 e **p* < 0,05 em relação ao grupo controle. Fonte: Autores.

Análise Imunoistoquímica

Semelhante ao experimento I a reação imunoistoquímica para Ki-67 revelou células com núcleos imunomarcados em todos os grupos, sendo mais evidente no epitélio superficial e menos evidente no estroma endometrial. A análise quantitativa evidenciou maior número de células Ki-67 positivas nos grupos Ctrl e Sham, quando comparados aos grupos que receberam os fármacos, sobretudo no grupo tratado com citrato de clomifeno isolado (GCC), ou combinado com melatonina (GMel+CC2) ou metformina (GMetf+CC2) (Tabela 5).

A reação imunoistoquímica para Vegf-A evidenciou menor imunopositividade nos grupos tratados com os fármacos, em comparação ao GCtrl, onde o grupo que recebeu melatonina e metformina combinados (MM2) foi o que mostrou imunopositividade mais fraca (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão (M±DP) da detecção imunoistoquímica ao ki-67 e Vegf-A dos parâmetros obtidos nos úteros das ratas tratadas no experimento II.

Experimento II (Tratamento)								
	GCtrl	GSham	GMel 2	GMetf 2	GCC	GMM 2	GMel+CC 2	GMetf+CC 2
Ki-67	6,65 ± 0,98	5,30 ± 0,43*	4,08 ± 0,54**	4,17 ± 1,47**	1,30 ± 0,27**	4,28 ± 0,29**	2,74 ± 0,25**	2,47 ± 0,26**
Vegf-A	1,94 ± 0,15	1,20 ± 0,09**	1,20 ± 0,21**	1,03 ± 0,12**	0,86 ± 0,12**	0,85 ± 0,15**	1,16 ± 0,08**	1,06 ± 0,13**

***p* < 0,01 e **p* < 0,05 em relação ao grupo controle. Fonte: Autores.

Prevenção X Tratamento

Neste estudo, ficaram estabelecidas diferenças entre os experimentos (prevenção e tratamento), como vista a comparação entre as duas etapas referente aos dados morfológicos, morfométricos e imunoistoquímicos, expressos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Médias e desvios-padrão (M±DP) dos parâmetros histomorfológicos avaliados nos úteros de ratas comparando os experimentos I (prevenção) e II (tratamento).

Grupo	Estrutura	Exp. I (Prevenção)	Exp. II (Tratamento)
Melatonina	Endométrio	467,4 ± 108,1	640 ± 115,5
	Glândulas	1,00 ± 0,52	1,01 ± 0,34
	Eosinófilos	2,42 ± 0,01*	2,93 ± 0,13***
	Colágeno	3,83 ± 1,17**	7,53 ± 1,47
Metformina	Endométrio	566,1 ± 65,44	632,7 ± 49,35
	Glândulas	1,35 ± 0,17	1,18 ± 0,09
	Eosinófilos	1,94 ± 0,59	1,83 ± 0,08
	Colágeno	4,48 ± 0,23	5,45 ± 0,19
MM	Endométrio	503,6 ± 128,9	471,0 ± 206,2
	Glândulas	2,05 ± 0,40***	1,21 ± 0,43
	Eosinófilos	4,04 ± 0,59***	1,62 ± 0,17
	Colágeno	4,43 ± 1,03	5,69 ± 0,53
Melatonina + CC	Endométrio	443,1 ± 64,63	524,6 ± 75,91
	Glândulas	1,11 ± 0,76	1,05 ± 0,15
	Eosinófilos	2,43 ± 1,04*	1,55 ± 0,54
	Colágeno	5,22 ± 1,59	6,54 ± 0,53
Metformina + CC	Endométrio	468,6 ± 60,22	575,2 ± 21,85
	Glândulas	2,50 ± 0,07***	2,34 ± 0,09***
	Eosinófilos	1,72 ± 0,06	1,62 ± 0,11
	Colágeno	5,67 ± 1,27	6,09 ± 0,22

***P < 0,0001, **P < 0,01 *P < 0,05. Código: CC = citrato de clomifeno; MM = melatonina + metformina. Fonte: Autores.

Tabela 7 – Médias e desvios-padrão (M±DP) dos parâmetros imunoistoquímicos (Ki-67 e Vegf-A) avaliados nos úteros de ratas comparando os experimentos I (prevenção) e II (tratamento).

Grupo	Imunoistoquímica	Exp. I (Prevenção)	Exp. II (Tratamento)
Melatonina	Ki-67	5,75 ± 0,63**	4,08 ± 0,54**
	Vegf-A	1,45 ± 0,28**	1,20 ± 0,21**
Metformina	Ki-67	4,82 ± 1,00**	4,17 ± 1,47**
	Vegf-A	0,98 ± 0,17**	1,03 ± 0,12**
MM	Ki-67	5,96 ± 0,48**	4,28 ± 0,29**
	Vegf-A	0,96 ± 0,17**	0,85 ± 0,15**
Melatonina + CC	Ki-67	2,95 ± 0,24**	2,74 ± 0,25**
	Vegf-A	1,35 ± 0,10**	1,16 ± 0,08**
Metformina + CC	Ki-67	2,73 ± 0,34**	2,47 ± 0,26**
	Vegf-A	1,36 ± 0,15**	1,06 ± 0,13**

**P < 0,01, *P < 0,05. Código: CC = citrato de clomifeno; MM = melatonina + metformina. Fonte: Autores.

4. Discussão

A síndrome dos ovários policísticos ainda é considerada uma das enfermidades mais polêmicas na endocrinologia ginecológica, pois inclui um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos. A heterogeneidade dessa síndrome levou à criação de numerosas discussões e variados consensos para o seu diagnóstico. No entanto, sua fisiopatologia ainda não é completamente compreendida. Em extensa revisão da literatura, Prapas et al. (2009) relataram que numerosos fatores genéticos

estavam envolvidos na síndrome dos ovários policísticos. Encontraram uma ampla gama de alterações nos genes relacionados às várias vias de transdução de sinal, como na esteroidogênese, na ação de hormônios esteróides, na ação e regulação das gonadotrofinas, na ação e secreção da insulina, homeostase e inflamação crônica, mostrando ser uma doença com múltiplas complexidades e que pode exibir inúmeras variáveis.

Assim, para este estudo, foi desenvolvido o modelo experimental de luz contínua, o qual Kang et al., (2015) referem ser superior aos outros modelos para o estudo de ratas em estado de estro permanente, por este não ser um método invasivo, ocorrendo assim a ausência de ovulação. No entanto, acreditamos que este modelo possa representar apenas um dos fenótipos para este fenômeno.

Assim, para a obtenção do estado de estro permanente, tanto para prevenção como tratamento, baseamo-nos na metodologia de Lombardi et al. (2012) que submetem ratas a iluminação constante, 400 Lux, por um período de 60 dias consecutivos para a indução do estado de estro permanente, tendo relatado a presença de inúmeros cistos ovarianos, uma das características da anovulação (Lombardi et al., 2021).

Em nosso experimento observamos que todos os animais pertencentes aos experimentos I e/ou II e submetidos à luz contínua permaneceram em estro permanente. Assim a função endócrina dos ovários foi alterada pela luz contínua, o que resultou no desenvolvimento de ovários policísticos. Nossos resultados também mostraram que a administração prévia ou durante a indução do estro permanente das drogas não inibiu os animais de desenvolverem estro permanente. Deve ser ressaltado que não encontramos na literatura consultada trabalhos que avaliaram as combinações destes fármacos, em especial a melatonina com a metformina.

Nossos dados mostraram nos experimentos I (prevenção) e II (tratamento) que a administração isolada da melatonina não alterou a espessura endometrial assim como o número de glândulas. No entanto ocorreu aumento significativo do número de eosinófilos por área e diminuição do número de fibras colágenas. Quando em associação a metformina ou a clomifeno também observamos aumento no número de eosinófilos, assim como diminuição relativa, mas não significativa da percentagem de colágeno. As outras substâncias administradas, ou seja, o cloridrato de clomifeno e a metformina isoladas ou combinadas também não diminuíram a espessura do endométrio, o número de glândulas endometriais e de eosinófilos ou a percentagem de colágeno. Com relação aos eosinófilos, estes dados encontram apoio no trabalho de Francioci et al. (2013) que referem que os eosinófilos estão relacionados com a remodelação do estroma endometrial pois seus grânulos contêm collagenases que degradariam as fibras colágenas. Os eosinófilos são células marcadoras dos altos níveis de estrogênios ou androgênios de tal maneira que a administração de melatonina isolada ou associada a outros medicamentos não reverteu o estado de estro permanente.

Nossos dados mostraram que os endométrios, em ambos os experimentos dos grupos tratados com melatonina e metformina, mostraram efeitos tróficos tanto nos grupos de prevenção como no de tratamento de forma expressiva principalmente em relação a sua espessura. Para a quantidade de glândulas ficam expostos em destaque os resultados de combinações de Melatonina e Metformina, também para a combinação de Metformina e Citrato de clomifeno. Para o percentual de colágeno o grupo Citrato de clomifeno apresentou efeito trófico no experimento I, enquanto que a melatonina se destacou no experimento II. Em relação à quantidade de eosinófilos, a combinação Melatonina e Metformina se destacou no experimento I, enquanto que a melatonina se destacou no experimento II de forma isolada. Esses dados corroboram com trabalhos anteriores que mostraram que tanto a melatonina quanto a metformina poderiam determinar processos proliferativos no endométrio, tais como hiperplasia, mesmo com o pequeno número de casos (Unfer et al., 2004).

Estudo realizado por Smaniotto e Simões (1996), revelaram que o estroma de ratas em estro permanente, induzido pelo propionato de testosterona, é rico em fibroblastos e fibras colágenas e havendo diminuição da hidratação endometrial. Estes fatos podem dificultar muito a implantação endometrial e conseqüentemente o desenvolvimento da gravidez.

Vale ressaltar que os processos fisiológicos e comportamentais que exibem ritmicidade circadiana, são controlados por relógios endógenos presentes nos neurônios do núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e em algumas células de tecidos periféricos (Schibler e Sassone-Corsi, 2002). Estes relógios celulares são acionados por alterações moleculares, que alteram a expressão rítmica de genes com periodicidade de cerca de 20 horas (Reppert, Weaver, 2002). As moléculas que causam tais alterações consistem em compostos que interagem de forma positiva ou negativa na retroalimentação transcriptacional/translacional na qual heterodímeros ativadores da transcrição estão presentes promovendo a transcrição de genes (CTY1 e CRY2). Os neurônios do NSQ recebem informações diárias sobre luz e escuridão do ambiente através de uma via neuronal monossináptica originária de um subconjunto de células ganglionares sensíveis à luz presentes na retina (Berson, 2003). O NSQ, então, sincroniza a fisiologia do organismo, a mudanças diárias coordenando atividades tecido-específicas devido a oscilações neuronais e humorais.

Costuma-se dizer, que a melatonina é a molécula chave que controla o ciclo circadiano em animais e em humanos. Ela influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite, como por exemplo: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura do corpo diminui, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado. Além disso, é capaz de aumentar a mobilidade e a atividade das células de defesa, estimular a formação dos anticorpos e facilitar a defesa contra os microrganismos (Maganhin et al., 2008).

Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a metformina ativa a Adenosina Monofosfato Quinase (AMPK) (Musi et al., 2002), resultando na diminuição da produção de glicose e conseqüente aumento da oxidação de ácidos graxos nos hepatócitos, diminuição da esteatose hepática e aprimoramento da sensibilidade do fígado à insulina. O mecanismo pelo qual a metformina ativa a AMPK ainda não foi muito bem esclarecida, contudo, sabe-se que a fosforilação de treonina em AMPK é necessária para que a metformina exerça seus efeitos de redução do perfil lipídico (Elia et al., 2006).

Sabe-se que a insulina atua nas células do endométrio por hiperestimulação, podendo levar a formações de células neoplásicas ao ativar vias que promovem sobrevivência à apoptose e variações metabólicas. Isto pode favorecer metástases e progressão do tumor no tecido endometrial (Zhang et al., 2015).

Por sua vez, a metformina exerce propriedades anti-proliferativas sobre células tumorais em câncer de mama, ovário, próstata e endométrio. Esta observação se deu por conta de estudo realizados por Wu et al. (2012) que comprovaram a existência de diminuição de risco de óbitos por câncer em pacientes diabéticos tratados com metformina.

Em estudo realizado por Leanza et al. (2014), foi possível demonstrar que a combinação de metformina e citrato de clomifeno para indução da ovulação em mulheres com SOP é bem mais eficaz do que o uso de metformina isolada. Mas, estudo realizado por Moll (2008) mostrou que a adição de metformina ao clomifeno não aumentou a taxa de partos de bebês nascidos vivos.

Com relação à síndrome dos ovários policísticos, Tang et al. (2012) compararam o efeito do citrato de clomifeno com a metformina e observaram que em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m² o citrato de clomifeno mostrou-se mais eficiente para facilitar a gravidez, já em mulheres com IMC < 30 kg/m² a metformina apresentou melhores resultados. A combinação dos dois fármacos apresentou melhores resultados em relação a taxa de gravidez.

As vantagens do citrato de clomifeno sobre outros fármacos indutores da ovulação se dá pela baixa incidência de gravidez múltipla e da síndrome de hiperestimulação ovariana, assim como o baixo custo e ausência da necessidade de monitorização (Costello, 2004). Em um estudo realizado por Almeida et al. (2011), foi possível observar que apenas 7 gestações de um total de 220 ciclos intrauterinos em mulheres tratadas com citrato de clomifeno ficaram com espessura endometrial abaixo de 8 mm. Se levarmos em consideração que a espessura endometrial deva estar entre 8 e 15 mm, podemos dizer que o número de endométrios com espessura abaixo do considerado normal, foi baixa (Richter et al., 2007).

A ação antiestrogênica do citrato de clomifeno vem sendo usada desde 1962 e desde então tem se mostrado bastante efetiva no estímulo do desenvolvimento folicular ovariano. Porém, os benefícios clínicos desse medicamento são limitados exclusivamente às pacientes com anovulação pertencentes ao grupo II da Organização Mundial da Saúde (OMS), cuja fonte percussora de esteroides hormonais ovarianos é normal; são aquelas mulheres com hipogonadismo normogonadotrófico, onde a grande maioria dessas pacientes possui a síndrome dos ovários policísticos (SOP).

Deve ser mencionado que todas as drogas administradas, durante a indução do estro permanente (experimento I) ou no decorrer do estro permanente (experimento II) isoladas ou em associação, não bloquearam o estado de estro permanente.

A Ki-67 é considerado o marcador de proliferação celular de maior acurácia, sendo utilizado muitas vezes como fator prognóstico em tumores cuja evolução é de difícil previsão quando baseada somente em critérios histológicos (Scholzen e Gerdes, 2000). No entanto utilizamos este parâmetro para averiguar a proliferação celular no endométrio de ratas e pelos dados obtidos em nosso experimento notamos haver menor atividade mitótica nos animais tratados com citrato de clomifeno isolado ou associado a melatonina ou metformina tanto nos experimentos I quanto no experimento II. Este fato explicaria a espessura do endométrio ser menor, no entanto não significativa, nos grupos tratados com o citrato de clomifeno.

5. Conclusão

A melatonina, a metformina e o citrato de clomifeno não promovem efeitos proliferativos e angiogênicos no endométrio de ratas em estro permanente, porém, a melatonina tem efeito trófico mais significativo no estroma endometrial, não interferindo na sua espessura, enquanto que a metformina apresentou efeito trófico mais significativo no epitélio glandular do endométrio, portanto, estes efeitos são semelhantes tanto antes quanto após a indução de SOP por exposição à luz contínua. Sugerimos para futuras pesquisas outros modelos de indução de SOP avaliando as mesmas drogas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

- Almeida, J. P., Pinelo, S., Serra, H., Barbosa, A., Felgueira, E., Pires, I., et al. (2011). Controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination: an actual therapy?. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 33(11), 341-347.
- Berson, D. M. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*, 26(6), 314-320.
- Cakmak, H., & Taylor, H. S. (2011). Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update*, 17(2), 242-253.
- Camano, L., & Giuffrida, R. (1970). Cytological and histological modifications of the rat vaginal epithelium. *Matern Infanc (Sao Paulo)*, 29(2), 231-234.
- Commentz, J. C., & Helmke, K. (1995). Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. *Horm Res*, 44(6), 271-275.
- Costello, M. F. (2004). Systematic review of the treatment of ovulatory infertility with clomiphene citrate and intrauterine insemination. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 44(2), 93-102.
- Donaghay, M., & Lessey, B. A. (2007). Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med*, 25(6), 461-475.
- Elia, E., Sander, V., Luchetti, C. G., Solano, M. E., Di Girolamo, G., Gonzalez, C., et al. (2006). The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod*, 12(8), 475-481.

- Ferreira, C. S., Carvalho, K. C., Maganhin, C. C., Paiotti, A. P., Oshima, C. T., Simões, M. J., et al. (2016). Does melatonin influence the apoptosis in rat uterus of animals exposed to continuous light? *Apoptosis*, 21(2), 155-162.
- Franciosi, M., Lucisano, G., Lapice, E., Strippoli, G. F., Pellegrini, F., & Nicolucci, A. (2013). Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One*, 8(8), e71583.
- Kang, X., Jia, L., & Shen, X. (2015). Manifestation of Hyperandrogenism in the Continuous Light Exposure-Induced PCOS Rat Model. *Biomed Res Int*, 2015, 943694.
- Leanza, V., Coco, L., Grasso, F., Leanza, G., Zarbo, G., & Palumbo, M. (2014). Ovulation induction with clomiphene citrate and metformin in women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol*, 66(3), 299-301.
- Legro, R. S., Barnhart, H. X., Schlaff, W. D., Carr, B. R., Diamond, M. P., Carson, S. A., et al. (2007). Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 356(6), 551-566.
- Lombardi, L. A., Simões, R. S., Maganhin, C. C., da Silva, C. F., Maciel, G. A., Baracat, E. C., et al. (2012). [Morphology of the interstitial cells of rat polycystic ovaries: an experimental study]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 34(7), 323-328.
- Lombardi, L. A., Mattos, L. S., Moura, M. L. A., Espindula, A. P., Simões, R. S., Florencio-Silva, R., Simões, M. de J., Franco, P. C., Sasso, G. R. da S., & Soares-Jr, J. M. (2021). Histomorphometric and immunohistochemical changes in interstitial cells and ovarian follicles of rats treated with metformin during and after induction of permanent estrus. *Research, Society and Development*, 10(6), e5110615536. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15536>.
- Maganhin, C. C., Carbonel, A. A., Hatty, J. H., Fuchs, L. F., Oliveira-Júnior, I. S., Simões, M. e. J., et al. (2008). [Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 54(3), 267-271.
- Mahajan, D. K. (1988). Polycystic ovarian disease: animal models. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 17(4), 705-732.
- Mathur, R., Alexander, C. J., Yano, J., Trivax, B., & Azziz, R. (2008). Use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 199(6), 596-609.
- Michalany, J. (1998). Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Editora Michalany (3ª ed.). São Paulo.
- Moll, E., Korevaar, J. C., Bossuyt, P. M., & van der Veen, F. (2008). Does adding metformin to clomifene citrate lead to higher pregnancy rates in a subset of women with polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod*, 23(8), 1830-1834.
- Montes, G. S., & Luque, E. H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 133(3), 192-199.
- Musi, N., Hirshman, M. F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., et al. (2002). Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(7), 2074-2081.
- Ortega, I., Cress, A. B., Wong, D. H., Villanueva, J. A., Sokalska, A., Moeller, B. C., et al. (2012). Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*, 86(1), 1-9.
- Pereira, A.S., Shitsuka, D.M., Parreira, F.J 7 Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Pertsov, S. S. (2006). The behavior of rats in response to changes in the light regime and administration of melatonin. *Neurosci Behav Physiol*, 36(7), 767-772.
- Prapas, N., Karkanaki, A., Prapas, I., Kalogiannidis, I., Katsikis, I., & Panidis, D. (2009). Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia*, 13(4), 216-223.
- Quezada, S., Avellaira, C., Johnson, M. C., Gabler, F., Fuentes, A., & Vega, M. (2006). Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 85(4), 1017-1026.
- Regan, K. S., Cline, J. M., Creasy, D., Davis, B., Foley, G. L., Lanning, L., et al. (2005). STP position paper: ovarian follicular counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. *Toxicol Pathol*, 33(3), 409-412.
- Richter, K. S., Bugge, K. R., Bromer, J. G., & Levy, M. J. (2007). Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril*, 87(1), 53-59.
- Rossi, A.G., Soares, J.M. J.R., Motta, E.L., Simões, M.J., Oliveira-Filho, R.M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Antolin, L., Esteban, M.M., & Rodriguez, C. (2006). Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J*, 13 (12),1547-1556.
- Salamonsen, L. A., Nie, G., Hannan, N. J., & Dimitriadis, E. (2009). Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. *Reprod Fertil Dev*, 21(7), 923-934.
- Salveti, N. R., Panzani, C. G., Gimeno, E. J., Neme, L. G., Alfaro, N. S., & Ortega, H. H. (2009). An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 68.
- Savaris, R. F., Groll, J. M., Young, S. L., DeMayo, F. J., Jeong, J. W., Hamilton, A. E., et al. (2011). Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(6), 1737-1746.
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111(7), 919-922.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322.
- Shorr, E. (1941). A new technic for staining vaginal smears: iii, a single differential stain. *Science*, 94(2449), 545-546.

- Smaniotta, S., & Simões, M.J. (1996). Morphological aspects of the endometrial epithelium of persistent estrous rats under estrogenic action. *Braz J Morphol Sci*, 13(103).
- Soares, J. M., Simões, M. J., Oshima, C. T., Mora, O. A., De Lima, G. R., & Baracat, E. C. (2003). Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecol Endocrinol*, 17(2), 115-123.
- Sára, L., Nádasy, G., Antal, P., Szekeres, M., Monori-Kiss, A., Horváth, E. M., et al. (2012). Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - effects of parallel vitamin D3 treatment. *Acta Physiol Hung*, 99(3), 279-288.
- Tan, X., Li, S., Chang, Y., Fang, C., Liu, H., Zhang, X., et al. (2016). Effect of metformin treatment during pregnancy on women with PCOS: a systematic review and meta-analysis. *Clin Invest Med*, 39(4), E120-131.
- Tang, T., Lord, J. M., Norman, R. J., Yasmin, E., & Balen, A. H. (2012). Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*(5), CD003053.
- Teixeira, A.A.C., Simões, M.J., Wanderley-Teixeira, V., & Soares, J.R. J.M. (2004). Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *International Journal of Morphology*, 22(3), 189-194.
- Unfer, V., Casini, M. L., Costabile, L., Mignosa, M., Gerli, S., & Di Renzo, G. C. (2004). Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril*, 82(1), 145-148, quiz 265.
- Wu, B., Li, S., Sheng, L., Zhu, J., Gu, L., Shen, H., et al. (2012). Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol Rep*, 28(3), 903-908.
- Zhang, Y., Li, M. X., Wang, H., Zeng, Z., & Li, X. M. (2015). Metformin down-regulates endometrial carcinoma cell secretion of IGF-1 and expression of IGF-1R. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(1), 221-225.