

BIANCA RIBEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS
OVÁRIOS DE RATAS TRATADAS COM O ESTEROIDE DECANOATO
DE NANDROLONA ASSOCIADO À MELATONINA**

ASSIS

2017

BIANCA RIBEIRO DE SOUZA

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS
OVÁRIOS DE RATAS TRATADAS COM O ESTEROIDE DECANOATO
DE NANDROLONA ASSOCIADO À MELATONINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientadora: Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo

Coorientador: Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa.

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

S729a Souza, Bianca Ribeiro de
Análise histopatológica e imuno-histoquímica dos ovários de ratas tratadas com o esteroide decanoato de nandrolona associado à melatonina / Bianca Ribeiro de Souza. Assis, 2017. 134 f.: il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientadora: Dr^a Isabel Cristina Cherici Camargo
Co-orientador: Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

1. Melatonina. 2. Ovários. 3. Esteróides anabólicos. I. Título.

CDD 612.6

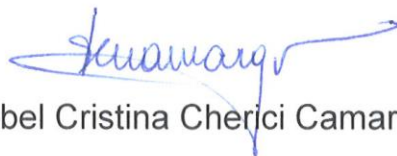
Bianca Ribeiro de Souza

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
DOS OVÁRIOS DE RATAS TRATADAS COM O ESTEROIDE
DECANOATO DE NANDROLONA ASSOCIADO À
MELATONINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em BIOCÊNCIAS (Área de Conhecimento: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA)

Data da Aprovação: 04/08/2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo - UNESP/ASSIS



Membros: Profa. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade - UNESP/ASSIS



Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto - UNOESTE/PRESIDENTE PRUDENTE

Dedicatória

Dedico esse trabalho às pessoas muito especiais e queridas por mim, sem as quais eu não conseguiria ter realizado essa caminhada: meus amados pais, João Alves e Rosimeire da Silva, meu fiel companheiro Jefferson Sasaki e minha estimada orientadora Prof^a Dra. Isabel C. C. Camargo.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e todas as bênçãos que Ele proporcionou a mim e a minha família.

Aos meus pais, João e Rosimeire, que todos os dias desde que nasci, dedicam-se, cuidam e zelam por mim. Obrigada, meus pais, vocês me deram a vida e uma vida com amor. Também aos meus irmãos, Mônica, Felipe e Tiago pelo companheirismo.

Ao Jefferson, meu companheiro, pelo apoio diário e pelo amor tão generoso e honesto.

A minha orientadora Dra. Isabel C. C. Camargo, por tantos ensinamentos passados desde a minha graduação, pelas oportunidades que me ofereceu e pelo apoio e compreensão, tudo isso estará sempre guardado em meu coração.

Ao meu coorientador Dr. Luiz Gustavo A. Chuffa pela oportunidade oferecida de estender os horizontes neste trabalho, pelos materiais cedidos de seu laboratório, pela orientação valiosa e por me dar a chance de prosseguir os estudos.

Ao Vinicius Simão, por todos os conhecimentos e técnicas que com tanta paciência me ensinou, pela parceria e toda ajuda no laboratório e principalmente pela generosidade e amizade sincera.

A todos os professores que aceitaram tão gentilmente compor as bancas de qualificação e defesa e oferecer suas contribuições a este trabalho: Dra. Telma G. C. S. Andrade, Dra. Lucinéia dos Santos, Dra. Edislane Barreiros de Souza, Dra. Ana Paula A. Favareto e Dr. Wellerson Rodrigo Scarano.

Ao Dr. João Tadeu R. Paes pelos ensinamentos preciosos durante a graduação e o mestrado e pelas receitas médicas necessárias para aquisição do esteroide sintético.

Às ratas utilizadas nesse estudo, a minha gratidão e respeito por suas vidas utilizadas para o avanço científico.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências e a todos os funcionários da UNESP Assis pela oportunidade e a disponibilidade.

“A felicidade só é real quando é compartilhada”

Christopher McCandless

SOUZA, Bianca Ribeiro. **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS OVÁRIOS DE RATAS TRATADAS COM O ESTEROIDE DECANOATO DE NANDROLONA ASSOCIADO À MELATONINA**. 2017. 133 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2017.

RESUMO

Os esteroides anabólicos androgênicos são prescritos para o tratamento de várias doenças, porém apresentam efeitos colaterais mesmo em dosagens terapêuticas. Entre eles, destaca-se o decanoato de nandrolona (DN), o qual age sobre receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ER α e ER β). Paralelamente, a melatonina (MLT) tem despertado a atenção na área da saúde devido às suas propriedades antioxidantes e profiláticas, com o intuito de reduzir ou suprimir os efeitos colaterais promovidos por fármacos. Então, o presente estudo teve por objetivo avaliar o ciclo estral, a estrutura histológica e a imunomarcagem para AR, ER α e ER β em ovários de ratas androgenizadas submetidas ao tratamento com MLT. Ratas Wistar (n = 8/grupo) receberam óleo mineral (Controle), DN (7,5 mg/kg; via subcutânea, 15 dias) e o tratamento com MLT (10 mg/kg; via intraperitoneal, 7 dias) isoladamente, previamente ou concomitantemente ao esteroide. O ciclo estral foi monitorado. Os ovários foram coletados e preparados para a avaliação do tecido. Nas ratas androgenizadas, a MLT recuperou o peso e o tecido ovariano, mas não restabeleceu o ciclo estral. O número e área dos corpos lúteos dos animais que receberam MLT, previamente ou concomitantemente ao DN, foram similares ao controle, e apenas o tratamento prévio restabeleceu a quantidade de folículos saudáveis e atresícos. Nos folículos, a MLT promoveu uma fraca expressão do ER α e ER β , e nos corpos lúteos inibiu a diminuição na expressão de ER β induzido pelo DN. O tratamento prévio com MLT atenuou o aumento na expressão do AR promovido pelo DN em folículos atresícos e corpos lúteos. Em conclusão, a MLT apresentou efeito benéfico nos ovários androgenizados através da recuperação da foliculogênese e da luteogênese. O tratamento prévio com melatonina foi mais eficaz em relação ao tratamento concomitante.

Palavras-chave: Melatonina. Ovários. Decanoato de nandrolona. AR. ER α . ER β .

SOUZA, Bianca Ribeiro. **Histopathological and immunohistochemistry analysis of ovaries of rats treated with nandrolone decanoate associated to melatonin.** 2017. 133 p. Dissertation (Master in Biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2017.

ABSTRACT

Androgenic anabolic steroids are prescribed as treatment to several diseases, however, they present side effects even in therapeutic dosages. Among them, we highlight the nandrolone decanoate (ND) which acts on androgen receptors (AR) and estrogen receptors (ER α e ER β). At the same time, melatonin (MLT) has raised attention in health area due to its antioxidant and prophylactic properties intending reduction or surpassing side effects caused by medicine. Thus, the present study aimed assess the estrous cycle, histological structure and AR, ER α and ER β immunolocalization in androgenized rats ovaries undergone treatment with MLT. Wistar rats (n= 8/group) received mineral oil (Control), ND (7,5 mg/kg; subcutaneously, 15 days) and treatment with MLT (10 mg/kg; intraperitoneally, 7 days) singly, previously or concomitantly to steroid. Estrous cycle was monitored. The ovaries were collected and prepared for tissue assessment. In androgenized rats, MLT recovered weight and ovarian tissue, but it did not reestablish the estrous cycle. The number and area of corpus luteum of animals which received MLT, previously or concomitantly to ND, were similar to control, and only previous treatment reestablished the quantity of healthy and atretic follicles. In follicles, MLT promoted a weak expression of the ER α and ER β , and in corpora lutea, it inhibited the decrease in the ER β expression induced by ND. Previous treatment with MLT mitigated the increase in AR expression promoted by ND in atretic follicles and corpora lutea. In conclusion, melatonin presented a beneficial effect on the androgenized ovaries through the recovery of the folliculogenesis and luteogenesis. The previous treatment was the most effective.

Keywords: Melatonin. Ovaries. Nandrolone Decanoate. AR. ER α . ER β .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Síntese de hormônios a partir do colesterol.....	16
Figura 2. Fórmula estrutural da molécula de testosterona.....	17
Figura 3. Estrutura química de estrogênios naturais e sintéticos.....	20
Figura 4. Atuação do estrógeno na pré-menopausa e pós-menopausa.....	22
Figura 5. Biossíntese da progesterona e estruturas químicas.....	23
Figura 6. Principais vias da esteroidogênese em humanos.....	25
Figura 7. Alterações cíclicas ocorrentes durante o ciclo menstrual.....	29
Figura 8. Variações cíclicas hormonais no ciclo reprodutivo humano e do rato.....	31
Figura 9. Citologia vaginal durante as fases do ciclo estral.....	33
Figura 10. Fotomicrografia de ovário.....	34
Figura 11. Folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação.....	38
Figura 12. Corte Histológico de ovário de rata em diestro.....	43
Figura 13. Esteroidogênese nas células ovarianas.....	45
Figura 14. Receptores nucleares típicos apresentam uma estrutura comum.....	48
Figura 15. Sítios de receptores de hormônios esteroides.....	50
Figura 16. Patologia ovariana em ratas ERKO.....	53
Figura 17. Patologia ovariana em ratas ARKO.....	57
Figura 18: Fórmula estrutural das moléculas de testosterona, decanoato de nandrolona e nandronolona.....	61

ARTIGO

Figura 1. Esquema cronológico dos tratamentos nos grupos experimentais.....	93
Figura 2. Número de dias em diestro e peso relativo dos ovários e útero.....	98
Figura 3. Fotomicrografias dos ovários das ratas nos grupos experimentais.....	100
Figura 4. Quantificação de folículos saudáveis e atrésicos.....	102
Figura 5. Localização imunohistoquímica do receptor AR nos ovários.....	106
Figura 6. Localização imunohistoquímica do receptor ER α nos ovários.....	107
Figura 7. Localização imunohistoquímica do receptor ER β nos ovários.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1 – função de ativação da transcrição 1

AF-2 – função de ativação da transcrição 2

AIDS – síndrome de imunodeficiência adquirida

ANOVA – análise de variância paramétrica

AR(s) – receptor androgênico

ARE – elemento de resposta aos andrógenos

ARKO – androgen receptor knockout

At – folículo atrésico (atretic follicle)

BMP – proteína morfogenética do osso (bone morphogenetic proteins)

BSA – albumina de soro bovino (bovine serum albumin)

C – Controle

°C – Celsius;

CL – corpo lúteo (corporea lutea)

cm – centímetros;

CO – Colorado;

CYP450 – citocromo P450 aromatase

DAB – cromógeno diaminobenzidina

DBD – domínio DNA-ligante

DHEA - deidroepiandrosterona

DHEAS – deidroepiandrosterona sulfatada

DHT – dihidrotestosterona

DN – decanoato de nandrolona

ND/MLT – grupo tratado com melatonina concomitante ao esteroide

E1- estrona

E2 – estradiol

E2-S – estrógeno sulfatado

EAA – esteroide(s) anabólico(s) androgênico(s)

ER(s) – receptor estrogênico (estrogen receptor)

ERKO – estrogen receptor knockout

ER- α – receptor estrogênico alfa (estrogen receptor alpha)

α -ERKO – estrogen receptor α knockout
ER- β – receptor estrogênico beta (estrogen receptor beta)
 β -ERKO – estrogen receptor β knockout
EST – enzima estrógeno sulfotransferase
et al. – entre outros (em latim)
F ou f – folículos ovarianos (ovarian follicles)
FC – cisto folicular (follicular cyst)
FSH – hormônio folículo estimulante
g – gramas (gram)
GDF – fator de crescimento e diferenciação (growth differentiation factor)
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
GR – receptor de glicocorticoides
HAM – hormônio anti-mulleriano
HDL – lipoproteínas de alta densidade (high density lipoprotein)
h – hora (s) (hours)
HCG – gonadotrofina coriônica humana (human chorionic gonadotropin)
HE – hematoxylin and eosin
HREs – elementos de resposta hormonal
HSP – proteína de choque térmico (heat shock protein)
kg – quilograma
IGF – fator de crescimento semelhante à insulina
i.p. – intraperitoneal
LBD – domínio de ligação do ligante
LDL – lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoprotein)
LH – hormônio luteinizante
LLC – grandes células luteais (large lutein cells)
M – medula do ovário
MLT – melatonina
MLT/ND – grupo tratado com melatonina previamente ao esteroide
MO – Missouri
MT1 e MT2 – receptores de melatonina
mg – miligrama
min – minutos
ml – mililitro

mm – milímetros

MRs – receptor de mineralocorticoides

n – número amostral (amostral number)

ND – nandrolone decanoate

p.c. – peso corpóreo

P4 - progesterona

PBS – solução salina tamponada com fosfato (phosphate-buffered saline)

PR(s) – receptor de progesterona (progesterone receptor)

PRA e PRB – receptores de progesterona

RXR – receptor retinoide X

s.c. – subcutânea (subcutaneous)

SLC – pequenas células luteais (small lutein cells)

SHBG – globulina ligadora do hormônio sexual

SOP – síndrome dos ovários policísticos

StAR – proteína reguladora aguda da esteoidogênese

T - Testosterona

TGF- β – fator de crescimento transformante beta

Tfm – mutação de feminilização testicular andrógeno-insensitiva

VGEF – fator de crescimento endotelial vascular

UNESP – Universidade Estadual Paulista

μ m – micrômetro (micrometer)

v – vasodilatação (vasodilatation)

WAT – tecido adiposo (white adipose tissue)

WT – tipo selvagem, saudável

4A – androstenediona

17 β -HSD - 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Hormônios esteroides sexuais e ação no organismo.....	14
1.1.1. Andrógenos.....	15
1.1.2. Estrógenos.....	18
1.1.3. Progestágenos.....	22
1.2. Ciclo Reprodutivo.....	26
1.2.1. Ciclo Estral.....	30
1.3. Histologia e Fisiologia ovariana.....	33
1.3.1. Foliculogênese.....	35
1.3.2. Ovulação.....	39
1.3.3. Formação e fisiologia do corpo lúteo.....	41
1.3.4. Esteroidogênese e regulação hormonal ovariana.....	43
1.4. Receptores esteroidais.....	47
1.4.1. Receptores estrogênicos.....	50
1.4.2. Receptores androgênicos.....	53
1.5. Esteroides anabólicos androgênicos (EAA).....	57
1.5.1. Efeitos colaterais dos EAA no organismo.....	61
1.5.2. Efeitos dos EAA na reprodução feminina.....	64
1.6. Melatonina.....	66
1.6.1. Melatonina e a reprodução feminina.....	69
II. HIPÓTESES.....	70
III. OBJETIVO.....	71
IV. REFERÊNCIAS.....	72
V. ARTIGO: Avaliação do ciclo estral e tecido ovariano de ratas androgenizadas tratadas com melatonina.....	87
VI. ANEXOS.....	123

I. INTRODUÇÃO

1.1. Hormônios esteroides sexuais: Aspectos gerais e ação no organismo

Hormônios são substâncias químicas secretadas por células endócrinas e transportadas pela corrente sanguínea até seus tecidos-alvo onde exercem uma determinada resposta fisiológica, tais como: aumentar ou diminuir a atividade celular, estimular a proliferação celular via mitose ou induzir a diferenciação celular (CUNHA et al., 2014). Quimicamente, os hormônios são subdivididos em aminas, proteínas e esteroides (ROCHA et al., 2014). Os hormônios esteroides (estrogênios, androgênios, progestágenos e corticoides) têm natureza lipídica, pois possuem um núcleo comum derivado da estrutura química do colesterol (GHISELLI; JARDIM, 2007; VIGO et al., 2011). A biossíntese dos esteroides é restrita a poucos tecidos, como o córtex das glândulas adrenais e as gônadas, os quais expressam formas distintas do complexo enzimático P-450, responsável pelo processamento da molécula de colesterol (ROCHA et al., 2007; LUCHI, 2015).

Os esteroides sexuais (andrógenos, estrógenos e progestágenos) atuam no desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias e na função reprodutiva através da interação com receptores intracelulares citosólicos em vertebrados (WOLFF et al., 2012; ROCHA et al., 2014). Devido ao caráter lipofílico, os esteroides sexuais atravessam com facilidade a membrana plasmática das células para que ocorra a ligação com os receptores, estabilizados por proteínas hsp90 que se desligam dos mesmos para a formação do complexo hormônio-receptor (SILVA et al., 2002). Dessa forma, ocorre uma ativação genética direta, onde o complexo liga-se a uma parte específica do DNA nuclear, denominada de

elementos de resposta ao hormônio (ERH) e promove transcrição ou inativação de determinados genes (CANALI; KRUEL, 2001).

1.1.1. Andrógenos

Os esteroides androgênicos referem-se aos hormônios sexuais masculinos, encontrados em menores quantidades nas mulheres, responsáveis pelo desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino, características sexuais secundárias no homem, estímulo da síntese proteica, desenvolvimento da musculatura esquelética, eritropoiese e densidade óssea, entre outras funções (LIMA; CARDOSO, 2011; WOLFF et al., 2012; BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013). A definição biológica de um androgênio vem do grego *andro* que significa homem e *gennan*, produzir, ou seja, a substância que promove o crescimento das gônadas masculinas (CUNHA et al., 2004). Esses hormônios são produzidos principalmente pelos testículos e ovários e, em menores proporções, pelo córtex das adrenais de ambos os sexos (ROCHA et al., 2007; FERNANDES, 2015).

Na espécie humana, existem quatro tipos de androgênios circulantes endógenos: testosterona, dihidrotestosterona (DHT), androstenediona, deidroepiandrosterona (DHEA) e seu derivado sulfatado (DHEAS) (CUNHA et al., 2004). Em alguns tecidos, a ação andrógena depende que a testosterona produzida nos testículos seja convertida pela enzima 5 α -redutase em seu metabólito ativo (DHT), um andrógeno muito potente e com maior afinidade pelo receptor androgênico (Figura 1). Já a deidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona, com efeito androgênico mais fraco, são sintetizadas principalmente nas adrenais e convertidos em testosterona no fígado (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013; ROCHA et al., 2014). A estrutura química dos andrógenos contém dezenove átomos de

carbono (C19), que se encontram distribuídos de forma cíclica e a testosterona (Figura 2), principal andrógeno circulante no sangue, é a substância mais característica da classe (GHISELLI; JARDIM, 2007).

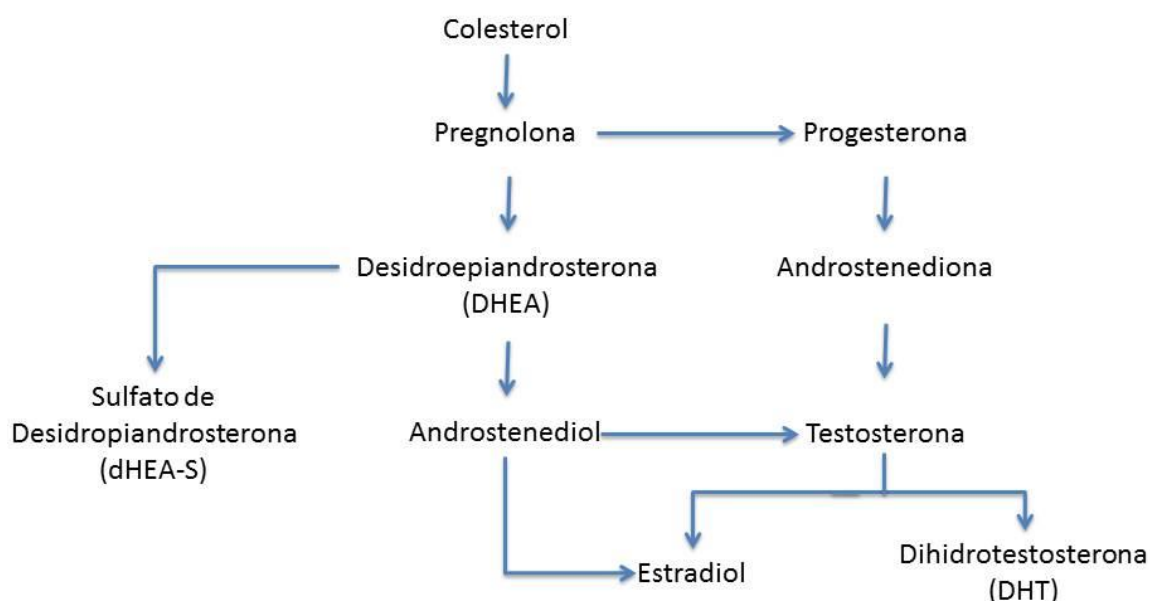


Figura 1. Síntese de hormônios a partir do colesterol (ROCHA et al., 2014)

As ações endócrinas da testosterona integram o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, dessa forma, alterações nesse eixo ocorrem quando há excesso ou déficit de testosterona. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que, por sua vez, estimula a secreção do hormônio luteinizante (LH) pela adenohipófise (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013). Nos homens, ocorre uma ligação entre o LH e receptores das células de Leydig (células intersticiais do testículo), desencadeando a absorção de colesterol circulante o qual, após sucessivas oxidações, forma a pregnenolona (Figura 1). Durante a conversão da pregnenolona em testosterona, são formadas desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (SILVA et al., 2002). Nas mulheres, o LH estimula a síntese de

testosterona pelas células da teca interna dos folículos ovarianos, sendo o ovário o principal órgão responsável pela produção do andrógeno (FINOTTI, 2013; FERNANDES, 2015).

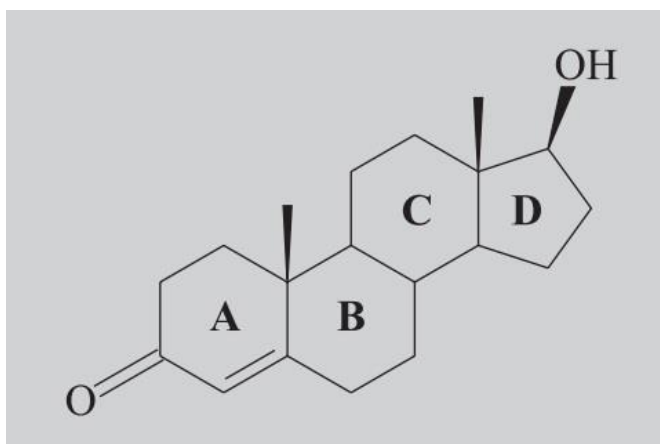


Figura 2. Fórmula estrutural da molécula de testosterona (CUNHA et al., 2004)

O nível de testosterona no sangue de homens saudáveis varia de 270 a 1070 ng/dL (TAYLOR et al., 2016) enquanto na mulher esse valor está entre 14 e 54,3 ng/dL (GUERRIERI et al., 2014) e os diferentes efeitos do hormônio entre os sexos devem-se pela diferença de concentração, metabolismo e expressão de receptores (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013). Do total de testosterona circulante no sangue, apenas a fração livre dissolvida no plasma é biologicamente ativa, que corresponde a 2%, enquanto cerca de 40% está ligada a uma proteína plasmática denominada de globulina ligadora do hormônio sexual (SHBG) e o restante está associado à albumina e outras proteínas plasmáticas (FINOTTI, 2013). No entanto, a testosterona ligada pode ser liberada sob demanda, para que uma maior concentração de testosterona livre esteja disponível para atuar em receptores de tecidos específicos (BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013).

As ações da testosterona e dos outros andrógenos dividem-se em duas categorias principais: efeitos androgênicos, relacionados com as características

sexuais secundárias e com a função reprodutiva, e efeitos anabólicos, que dizem respeito à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não-reprodutivos, através da ação miotrófica e estímulo da síntese proteica além do controle da distribuição de gordura corpórea e depósito de cálcio nos ossos. (CUNHA et al., 2004; NUNES, 2009). Esses diferentes efeitos devem-se à capacidade de atuação da testosterona através de pelo menos três mecanismos distintos: a) ligação com o receptor androgênico, b) conversão em dihidrotestosterona, em determinados tecidos, que também se liga ao receptor androgênico e, c) conversão em estradiol, que se liga ao receptor estrogênico (SOUZA et al., 2013). Os efeitos androgênicos e anabólicos da testosterona estão listados no Quadro 1.

QUADRO 1 Efeitos androgênicos e anabólicos da testosterona (Ghaphery, 1995)	
Efeitos androgênicos	Efeitos anabólicos
Crescimento do pênis	Aumento da massa muscular esquelética
Espessamento das cordas vocais	Aumento da concentração de hemoglobina
Aumento da libido	Aumento do hematócrito
Aumento da secreção nas glândulas sebáceas	Aumento da retenção de nitrogênio
Aumento de cabelos do corpo e da face	Redução dos estoques de gordura corporal
Padrão masculino dos pelos pubianos	Aumento da deposição de cálcio nos ossos

1.1.2. Estrógenos

Os estrogênios são os hormônios sexuais femininos, encontrados em pequenas quantidades nos homens, que atuam em uma grande variedade de ações na fisiologia dos sistemas reprodutor, cardiovascular, esquelético e nervoso (WOLF

et al, 2012; MAUVAIS-JARVIS et al., 2013). Esses hormônios promovem o desenvolvimento dos caracteres sexuais primários e secundários, fenótipo feminino, regulam a menstruação e auxiliam na distribuição dos depósitos de gordura predominantemente para as regiões do quadril e coxas (NAVAS et al., 2013).

Os estrogênios são os principais responsáveis pelo crescimento e reprodução das espécies animais, incluindo os seres humanos, promovendo a proliferação do endométrio e crescimento do útero, aumento da secreção de muco do colo do útero que facilita a passagem dos espermatozoides através do muco cervical e outros ajustes fisiológicos que ocorrem durante a gestação (GHISELLI; JARDIM, 2007; CANALI; KRUEL, 2001). Devido às suas propriedades, derivados sintéticos dos estrogênios (Figura 3) são empregados como contraceptivos (inibidores do processo de ovulação) e também administrados para controle dos sintomas característicos da menopausa e no tratamento do câncer de próstata e de mama (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A estrutura dos estrogênios (Figura 3) apresenta um grupo fenólico e, em alguns casos, um grupo hidroxila alifático (GHISELLI; JARDIM, 2007). As ações dos estrógenos são mediadas por receptores estrogênicos, ER α e ER β , que funcionam como fatores de transcrição ativados por ligante (DRUMMOND; FULLER, 2012; HANDA; WEISER, 2013). Além da sinalização e sensibilidade dos receptores estrogênicos, as ações dos estrógenos dependem da atividade de enzimas como a aromatase P-450, envolvida na biossíntese de estrógenos a partir de andrógenos, e a estrógeno sulfotransferase, responsável pela inativação do estrógeno por sulfatação (MAUVAIS-JARVIS et al., 2013).

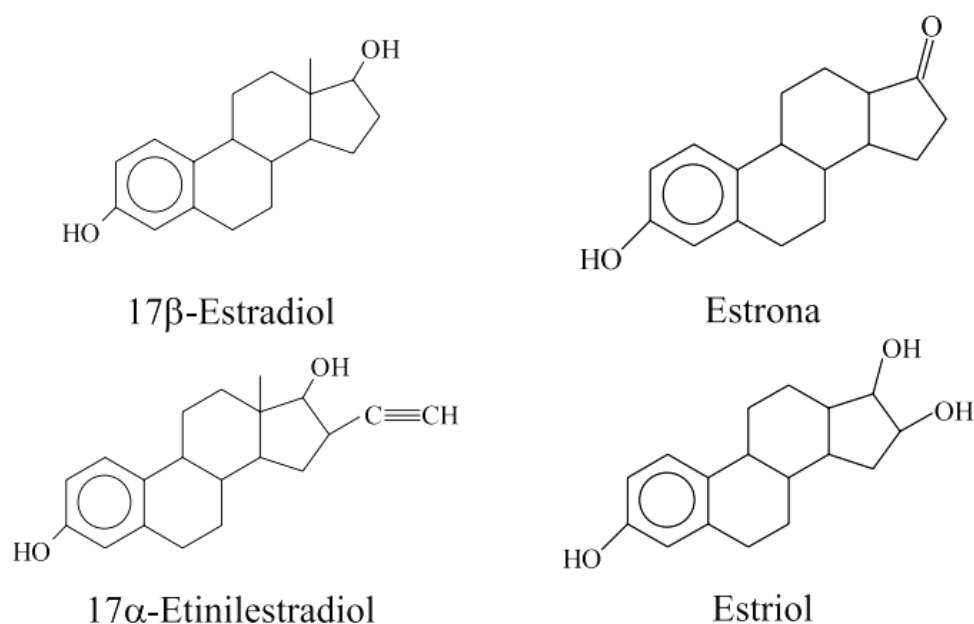


Figura 3. Estrutura química de estrogênios naturais e sintéticos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Fazem parte do grupo dos estrogênios o estradiol, o estriol e a estrona (Figura 3). O estradiol (E2) é muito presente durante o período fértil da mulher enquanto a estrona (E1) é predominante durante o climatério e o estriol é produzido somente durante a gravidez pela placenta (MARQUES et al., 2016). Os estrogênios são sintetizados principalmente nos folículos ovarianos e, em menores proporções, pelo córtex das adrenais enquanto no período gestacional, grandes quantidades são produzidas pela placenta (ITOO et al., 2013). A regulação é relacionada com as gonadotrofinas produzidas pela adenohipófise: FSH, hormônio folículo-estimulante, e LH, hormônio luteinizante. O FSH em baixas taxas estimula a síntese de estrogênio nos ovários enquanto altas taxas promovem inibição. O LH estimula a síntese de estrogênio e também de progesterona (CANALI; KRUEL, 2001).

Antes da menopausa, o 17-β-estradiol (E2) é o principal estrogênio circulante, produzido pelos ovários através da aromatização da testosterona a E2 pela enzima

P450 aromatase ou pela conversão de androstenodiona em estrona (E1), também pela P450 aromatase, que posteriormente é convertida em E2 (BARCELOS et al., MAUVAIS-JARVIS et al., 2013; APOLLONI et al., 2016). A aromatização da testosterona a estradiol é a principal via de biossíntese de estrogênios em homens e em mulheres após a menopausa (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Em mulheres com ciclos menstruais normais, o estradiol (E2) tem função de hormônio circulante e atua em tecidos alvos distantes (Figura 4A). No período pós-menopausa, a produção de E2 pelo ovários decai sendo semelhante a situação encontrada em homens, que têm níveis naturalmente baixos do hormônio. Nesse caso, E2 não funciona mais como um hormônio circulante, pois é sintetizado em locais extra gonadais como as mamas, cérebro, músculo, osso e tecido adiposo, onde atua localmente de forma parácrina ou autócrina, ou seja, atuando sobre receptores intracelulares de células vizinhas ou sobre a própria célula sintetizadora (SIMPSON et al., 2005; MAUVAIS-JARVIS et al., 2013). Dessa forma, a biossíntese de estrogênios depende de uma fonte de androgênios precursores circulantes (Figura 4B).

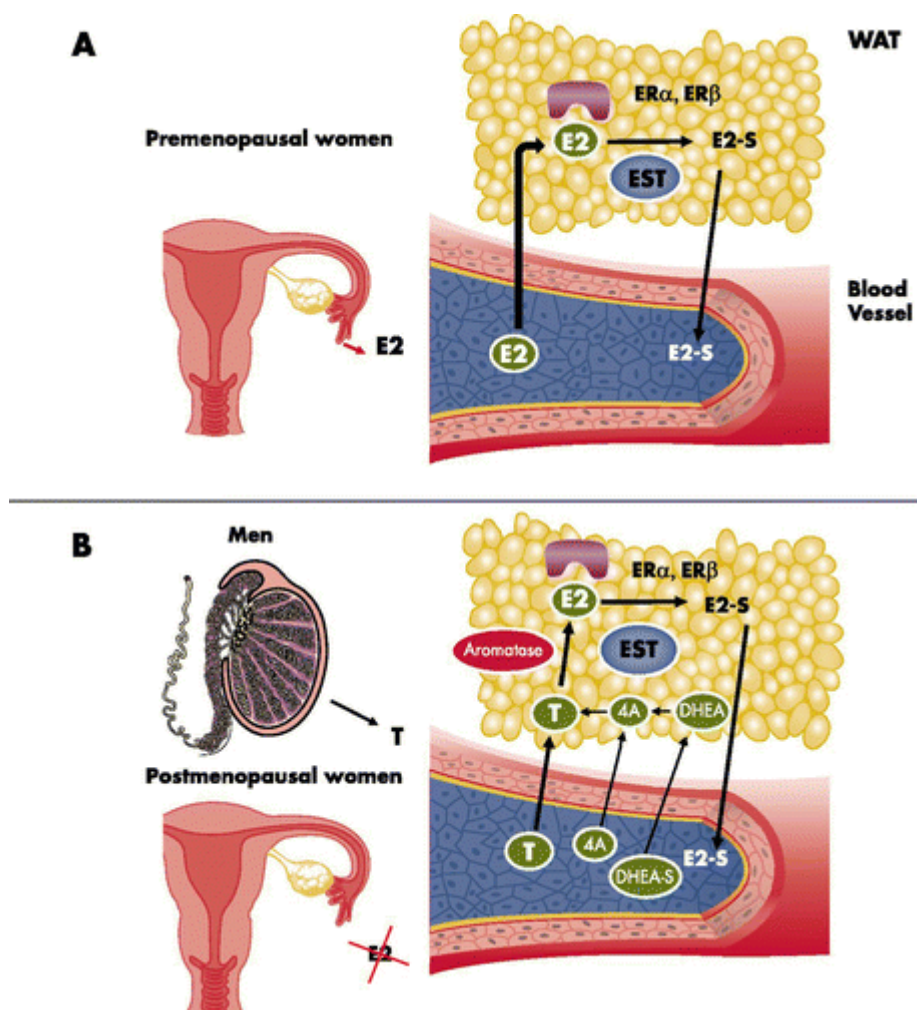


Figura 4. A: Em mulheres antes da menopausa, o estrógeno (E2) é produzido pelos ovários e age como um hormônio circulante na corrente sanguínea atuando em tecidos alvos distantes. **B:** Em mulheres pós-menopausa e em homens, E2 é sintetizado em locais fora das gônadas a partir de precursores androgênicos circulantes, tais como testosterona (T), androstenediona (4A) e desidroepiandrosterona (DHEA). WAT: tecido adiposo; ER: receptores estrogênicos; EST: Enzima estrógeno sulfotransferase; E2-S: estrógeno sulfatado; DHEAS deidroepiandrosterona sulfatada (MAUVAIS-JARVIS et al., 2013).

1.1.3. Progestágenos

Os progestágenos são esteroides sexuais femininos, sintéticos ou naturais responsáveis pela regulação da menstruação e ajustes fisiológicos que ocorrem durante a gestação (CANALI; KRUEL, 2001). Enquanto nos estrogênios existe um grupo fenólico característico, nos progestágenos (Figura 5) esse grupo é substituído por um grupo cetona (GHISELLI; JARDIM, 2007). A progesterona (P4) é o único

progestágeno natural, produzida pelo corpo lúteo ovariano após a ovulação e até oito semanas de gravidez, pela placenta durante a gestação, pelas adrenais e pelo sistema nervoso (VIGO et al., 2011). O corpo lúteo ovariano tem a capacidade de sintetizar vários hormônios, no entanto a síntese de progesterona é a principal, sendo dependente da gonadotrofina LH que atua após a ovulação (BERTAN et al., 2006 ; LIMA-VERDE et al., 2011).

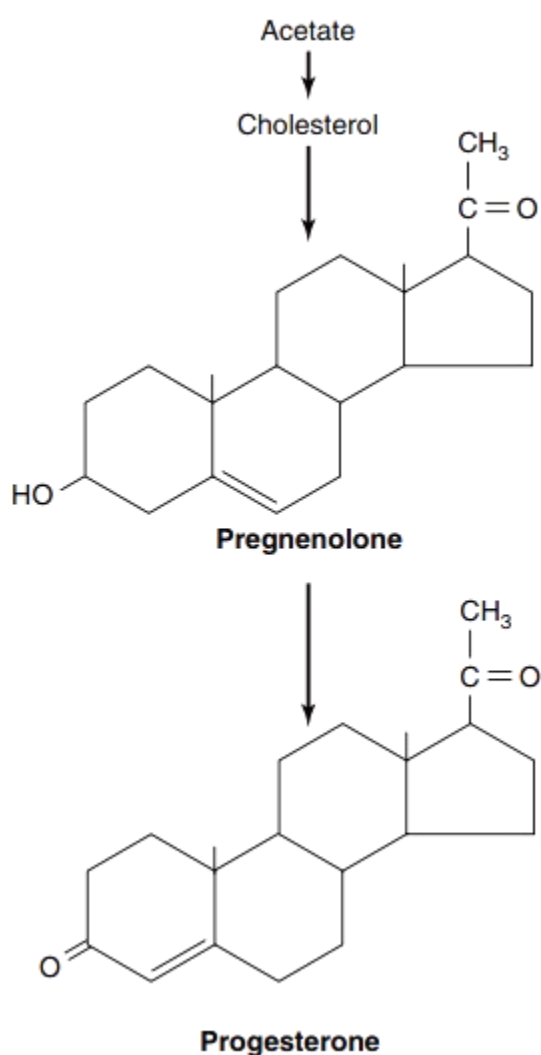


Figura 5. Biossíntese da progesterona e estruturas químicas (MURRAY et al., 2003).

Os progestágenos são precursores de todos os outros hormônios esteroides, incluindo androgênios, estrogênios, mineralocorticoides e glicocorticoides (WOLFF

et al., 2012). Quando a molécula de colesterol é convertida em pregnenolona, existem duas vias pelas quais a pregnolona pode ser metabolizada (Figura 6): 1) predominante em tecidos não luteínicos, culmina na síntese de deidroepiandrosterona (DHEA), precursora da testosterona; 2) predominante em células luteínicas, resulta na produção de progesterona, precursora dos mineralocorticoides, e 17-OH progesterona, precursora dos glicocorticoides e dos andrógenos (BATISTA, 2004; TAMAYO, 2007). A ação da enzima 17,20 liase faz a conversão da 17-OH progesterona em androstenediona que, por sua vez, pode ser convertida à estrona ou à testosterona (TAMAYO, 2007).

Dentre as diversas atividades biológicas da progesterona, a preparação para a gravidez é a principal. A P4 torna o endométrio um tecido secretor, mais espesso e vascularizado, apto para a aceitação e implantação do blastocisto além de aumentar também a atividade secretória das glândulas mamárias e promover o desenvolvimento da placenta (LIMA-VERDE et al., 2011; VIGO et al., 2011). Assim, a manutenção da gestação também é possibilitada pela capacidade da progesterona em inibir as contrações uterinas e de impedir a expulsão do blastocisto durante a implantação e do embrião durante a gestação (MARQUES et al., 2016). Deficiências nos níveis de progesterona podem causar amenorreia e abortos espontâneos recorrentes (WOLFF et al., 2012).

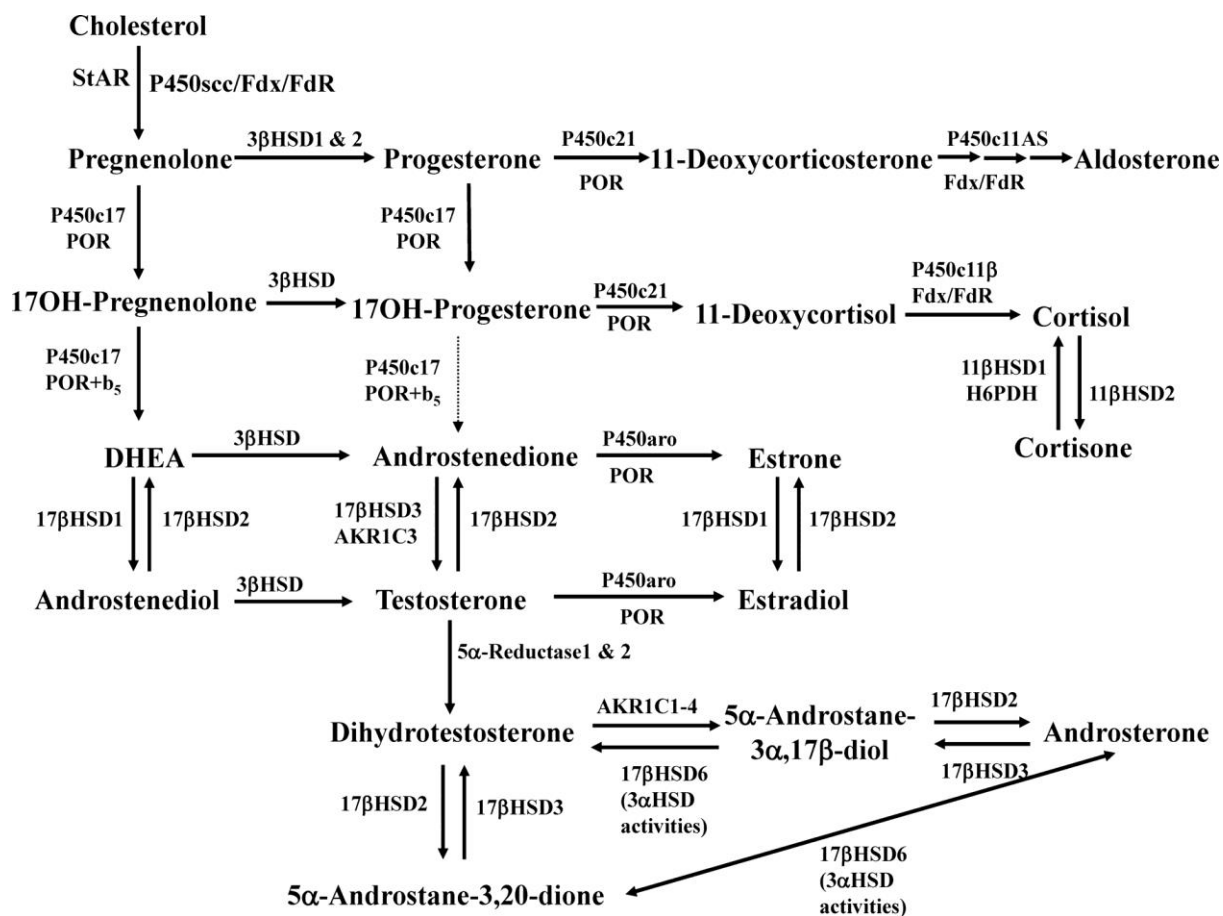


Figura 6. Principais vias da esteroidogênese em humanos. Enzimas e cofatores estão próximos às setas, as quais representam reações químicas (MILLER; AUCHUS, 2010).

A P4 atua no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas regulando a secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, o crescimento folicular, a ovulação e a luteinização (LIMA-VERDE et al., 2011). Dessa forma, por meio de seu efeito antigonadotrófico evita um novo episódio de ovulação; pelo efeito antiestrogênico equilibra a predominância de estrógenos, e pelo efeito antiandrogênico, acopla-se ao receptor androgênico e evita a conversão de testosterona em DHT (VIGO et al., 2011).

Os efeitos da progesterona no ovário são mediados de forma direta, via interação com receptores específicos nos ovários, ou de forma indireta, via eixo

hipotalâmico-hipofisário (LIMA-VERDE et al., 2011). Os receptores de progesterona apresentam duas isoformas: PRA e PRB, que têm funções distintas (LIMA-VERDE et al., 2011). O PRA é fundamental para a fisiologia dos ovários e útero, e não é necessário para o aleitamento, ao passo que o PRB é essencial para a atividade das glândulas mamárias e pouco expressivo para funções ovarianas e uterinas (VIGO et al., 2011).

A progesterona tem ganhado importância na terapia hormonal, pois, além de proteger o endométrio, causa menor sangramento vaginal e menor impacto no perfil lipídico sendo indicada nos tratamentos para as causas de infertilidade e descontrole do ciclo menstrual (GHISELLI; JARDIM, 2007). Os progestágenos sintéticos, também chamados de progestinas, mimetizam o efeito da progesterona, e derivam da estrutura da progesterona e da testosterona (VIGO et al., 2011).

1.2. Ciclo reprodutivo

Reprodução é o processo fisiológico crucial para a sobrevivência das espécies controlado por um eixo neuroendócrino que envolve hipotálamo, hipófise e gônadas. O elemento fundamental desse eixo são os neurônios hipotalâmicos que expressam GnRH, hormônio que estimula a liberação de gonadotrofinas (FSH e LH) pela hipófise (HANDA; WEISER, 2014). Esses neurônios são células neuroendócrinas, reguladas diretamente por vários sistemas neuronais e indiretamente por outros sistemas integrados. Essas células liberam GnRH, de forma pulsátil, no sistema portal hipotálamo-hipófise, uma via sanguínea que desemboca na hipófise anterior. Com a ligação entre o GnRH e receptores específicos da membrana das células produtoras de gonadotrofinas, LH e FSH são liberados na

circulação sistêmica e estimulam a produção de gametas e hormônios sexuais nas gônadas (VERAS; NARDI, 2005).

O ciclo sexual feminino, também designado de ciclo menstrual (Figura 7) em humanos e outros primatas, refere-se às alterações rítmicas ocorrentes na produção e secreção de hormônios sexuais e as mudanças correspondentes no útero, ovários, vagina e mamas que têm por finalidade a reprodução e a fecundação (ARAÚJO et al., 2015). No início da idade reprodutiva, a mulher começa a produzir hormônios gonadais e adquire uma particularidade do ciclo reprodutivo, a periodicidade (VERAS; NARDI, 2005). Um ciclo regular possui duração média de 28 dias, podendo variar entre 21 e 35 dias, sendo essa variante existente entre diferentes mulheres ou em uma mesma mulher (CHAVES et al., 2002; SIMÃO et al., 2007). De maneira didática e segundo as concentrações séricas dos hormônios sexuais, o ciclo menstrual pode ser dividido em três fases distintas: folicular, ovulatória e lútea, embora alguns autores considerem a fase ovulatória como uma etapa tardia pertencente à fase folicular, definindo assim apenas duas fases (FRANKOVICH et al., 2000; CHAVES et al., 2002).

A fase folicular inicia-se no primeiro dia de menstruação e dura em torno de nove dias, a fase ovulatória ocorre entre o 10º e o 14º dia, enquanto a fase lútea tem início no fim da ovulação e dura até o próximo fluxo menstrual (TEIXEIRA et al., 2012). O início da primeira fase do ciclo menstrual (fase folicular) é caracterizado por baixos níveis de estrógeno e progesterona, fazendo com que ocorra a menstruação decorrente da degeneração e do desprendimento do revestimento uterino (ARAÚJO et al., 2015). A partir do 6º dia da fase folicular, a secreção de estrógeno aumenta até seu nível mais elevado, fazendo com que o útero esteja preparado para uma possível gravidez através do aumento da proliferação celular no endométrio e do

desenvolvimento das glândulas. O aumento de estrógeno é estimulado pelo FSH, secretado em resposta aos baixos níveis de estradiol do início da fase folicular, que promove o crescimento dos folículos ovarianos recrutados e estimula a enzima aromatase, conversora de androgênios em estrogênios. Posteriormente, os níveis de FSH decaem e apenas um folículo é selecionado para a ovulação, tornando-se dominante e continuando seu desenvolvimento (VERAS; NARDI, 2005; SIMÃO et al., 2007).

Cerca de 36 horas antes da ovulação, a hipófise começa a aumentar acentuadamente a secreção de LH até 6 a 10 vezes, culminando em seu pico que promove a liberação do oócito do folículo dominante em torno de nove horas depois do pico, pois estimula as enzimas proteolíticas degenerativas de colágeno que iniciam a ruptura da parede do folículo (SANTOS, 2009; BARRET et al 2014). O início da fase ovulatória é marcado por estradiol em seu nível máximo, que depois decai durante o pico de LH, enquanto o nível de progesterona segue em aumento contínuo. O nível de FSH também aumenta durante o pico de LH, porém em menor grau (ARAÚJO et al., 2015).

A fase lútea ou secretória é marcada pelo predomínio de progesterona, com pico máximo logo após a ovulação e, em segundo lugar, de estradiol. O folículo que liberou o oócito forma o corpo lúteo, estrutura que secreta crescentes quantidades de progesterona, hormônio responsável por estimular as células glandulares do endométrio e inibir contrações musculares do miométrio que poderiam interferir na implantação de um possível embrião (SIMÃO et al., 2007). Após a redução durante a ovulação, o estrogênio também volta a aumentar nessa fase e, conjuntamente com as altas quantidades de progesterona secretadas pelo corpo lúteo, inibe as gonadotrofinas hipofisárias, em especial o FSH fazendo com que o desenvolvimento

de outros folículos fique bloqueado durante toda a fase lútea (CHAVES et al., 2002; SILVA et al., 2006).

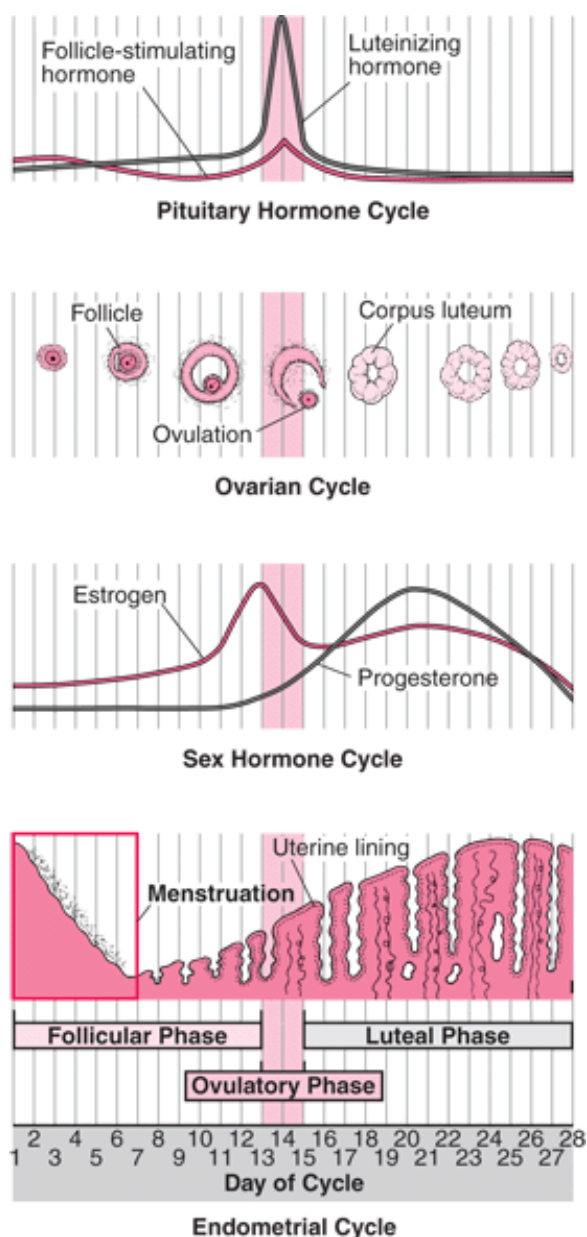


Figura 7. Alterações cíclicas ocorrentes no folículo dominante no ovário, endométrio e nos níveis de gonadotrofinas hipofisárias, estradiol e progesterona durante o ciclo menstrual (BRZYSKI; KNUDTSON, 2013).

Nos últimos dias do ciclo, se não houver fecundação, o corpo lúteo degenera e os níveis de estrógeno e progesterona caem dando início a um novo ciclo (SIMÃO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2015). Se houver fecundação, a gonadotrofina coriônica humana (HCG) produzida pelas células trofoblásticas do embrião em

desenvolvimento impede a degeneração do corpo lúteo, que aumenta de tamanho e intensifica sua produção hormonal, tornando-se o corpo lúteo gravídico. Consequentemente, o ciclo é adiado durante todo o período de gravidez e a menstruação não ocorre (SILVA et al., 2006; SANTOS, 2009).

1.2.1. Ciclo Estral

Diferentemente do ciclo menstrual, que apresenta sangramento vaginal periódico decorrente da descamação da camada uterina, em outros mamíferos que não menstruam o ciclo reprodutivo é denominado de ciclo estral. No caso das ratas e outras espécies com ovulação espontânea, mesmo sem o episódio de sangramento, os eventos endócrinos são correspondentes aos do ciclo menstrual e os hormônios atuantes também são os mesmos (Figura 8) (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001; BARRETT et al., 2014). O ciclo estral é subdividido em quatro fases, proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II), nas quais os ovários, útero e vagina apresentam morfologia característica em cada estágio (DIXON et al., 2014).

O proestro, equivalente ao início da fase folicular, é o período em que ocorre crescimento dos folículos ovarianos o qual é acelerado sob a influência do FSH (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001). O folículo secreta estrógeno que age sobre os órgãos genitais e promove hipertrofia do endométrio. Além do pico expressivo de estrógeno característico dessa fase, LH, FSH e progesterona também aumentam acentuadamente algumas horas depois e o nível alto de gonadotrofinas desencadeia a ovulação que caracteriza o estro ou cio (EMANUELE et al., 2002). Durante o estro, a fêmea apresenta receptividade ao macho, o folículo atinge maturidade e a ovulação ocorre. Os hormônios sexuais retornam aos níveis basais durante ovulação e algumas horas depois há um breve pico de estradiol (MARCONDES et al., 2002).

No metaestro, correspondente ao início da fase secretória ou progestacional, o folículo que liberou o ócito se transforma no corpo lúteo produtor de progesterona (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001). O diestro, equivalente a fase lútea, é marcado pela crescente secreção de progesterona até atingir seu pico e depois decai drasticamente (EMANUELE et al., 2002). Portanto, as fases de proestro e estro, são predominantemente de atuação estrogênica, enquanto o metaestro e o diestro, de atuação da progesterona (CONCEIÇÃO et al., 2005).

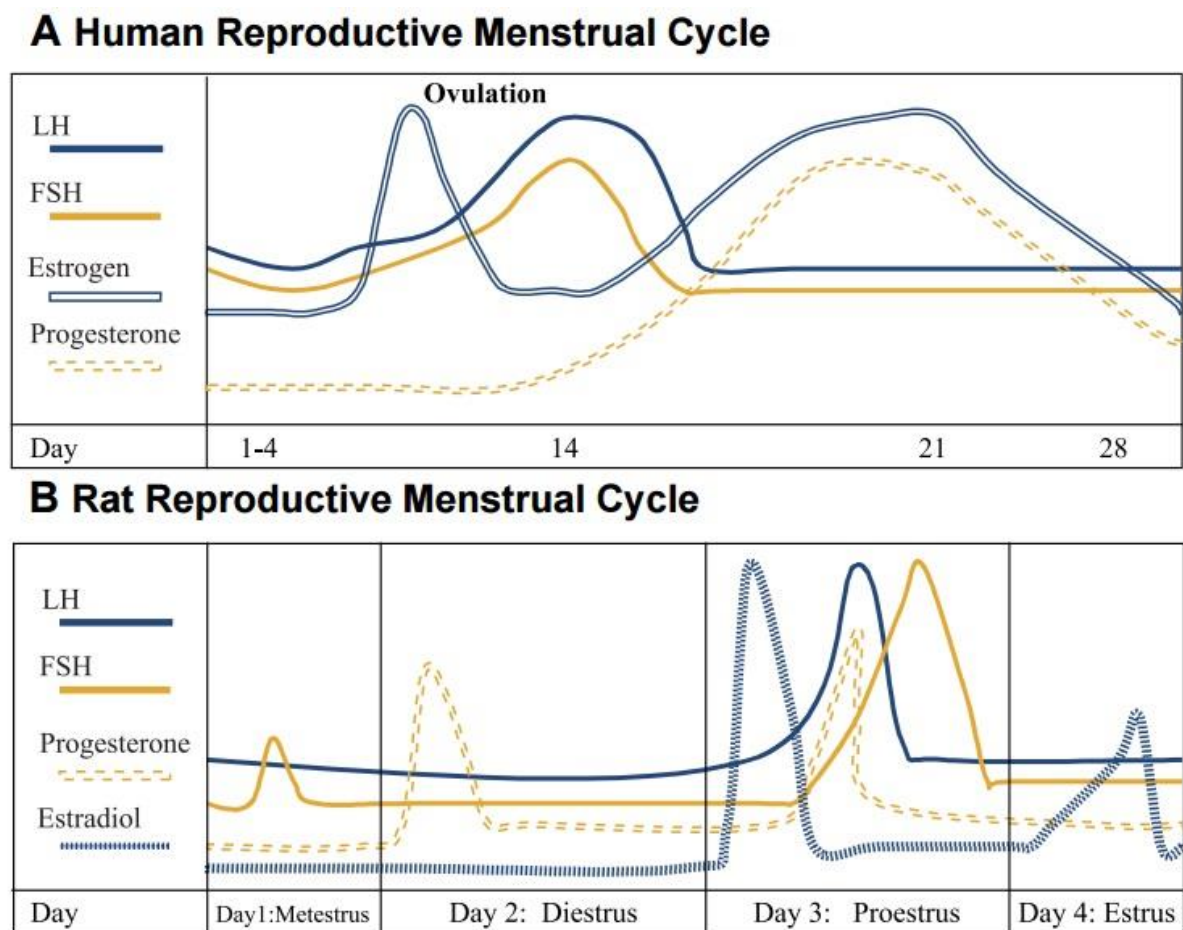


Figura 8. Variações cíclicas das gonadotrofinas hipofisárias, estrógeno e progesterona durante o ciclo reprodutivo humano (A) e do rato (B). LH: Hormônio Luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante (EMANUELE et al., 2002).

Em estudos sobre o sistema reprodutivo através da análise da citologia vaginal de roedores, é possível comprovar a ciclicidade e caracterizar cada fase baseando-se na proporção entre os três tipos de células obtidas do epitélio vaginal (Figura 9): células epiteliais, células queratinizadas e leucócitos (GOLDMAN et al., 2007; DIXON et al., 2014). Pelo fato do ciclo estral de ratas possuir curta duração, entre quatro e cinco dias, esses animais apresentam-se como um bom modelo de estudo (EMANUELE et al., 2002; MARCONDES et al., 2002). Além disso, o ciclo estral desses roedores é considerado altamente eficiente, pois, não ocorre desenvolvimento completo do corpo lúteo funcional, nem inibição da atividade gonadotrófica. Dessa forma, as fêmeas possuem a capacidade de ovular em intervalos tão curtos. O corpo lúteo funcional durante a gestação é desenvolvido completamente somente com a estimulação coital. A liberação de prolactina pela hipófise durante o estímulo da cópula é necessária para manutenção do corpo lúteo e uma secreção de progesterona adequada (BERTAN et al., 2006).

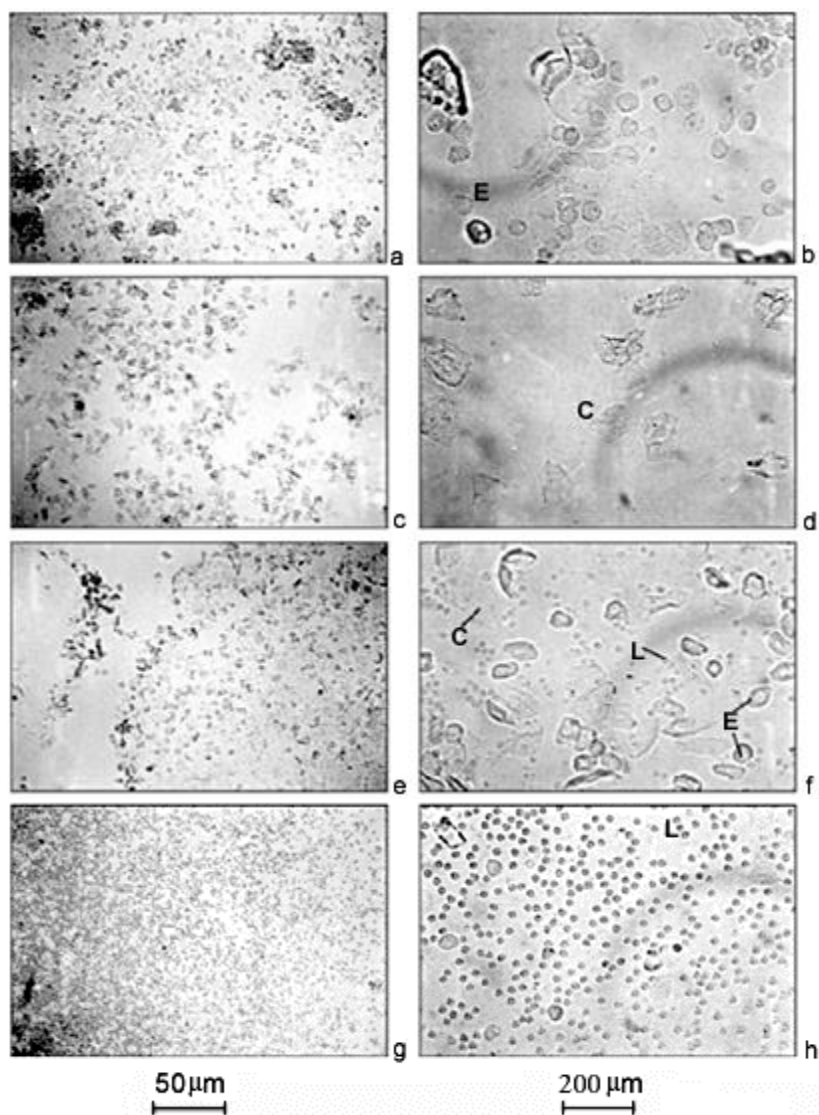


Figura 9. No proestro (a, b) há predominância de células epiteliais nucleadas, enquanto no estro (c, d) as células queratinizadas anucleadas são maioria. O metaestro (e, f), fase de transição, apresenta uma combinação de células queratinizadas, leucócitos e células epiteliais arredondadas em proporções semelhantes. No diestro (g, h), a secreção vaginal apresenta maioria leucocitária (MARCONDES et al., 2002; GOLDMAN et al., 2007).

1.3. Histologia e Fisiologia Ovariana

O centro da fertilidade feminina é o ovário, responsável por dois processos intimamente ligados: a gametogênese, conjunto de modificações que resultam na

liberação de um gameta apto a ser fecundado e a esteroidogênese, síntese e liberação de hormônios esteroides sexuais (SANTOS, 2009).

Os ovários, glândulas endócrinas femininas, contêm os oócitos (gametas femininos de origem extra-embrionária e endodérmica) cercados de células somáticas especializadas que constituem a camada granulosa e a teca. Esse conjunto é denominado de folículo ovariano, a unidade morfofuncional do ovário que se encontra imersa no estroma conjuntivo da gônada (CHAN et al., 2015). Morfologicamente, o ovário apresenta duas zonas (Figura 10): o córtex (mais periférico), onde se encontram os folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação e corpos lúteos e a medula (mais interna) de constituição fibrocelular e ricamente vascularizada (SANTOS, 2009). A superfície do ovário é recoberta por um epitélio germinativo composto de uma camada única de células cúbicas que repousam sobre uma membrana basal. Abaixo dessa camada, existe a túnica albugínea constituída de tecido conjuntivo denso (ERICKSON et al., 2007).

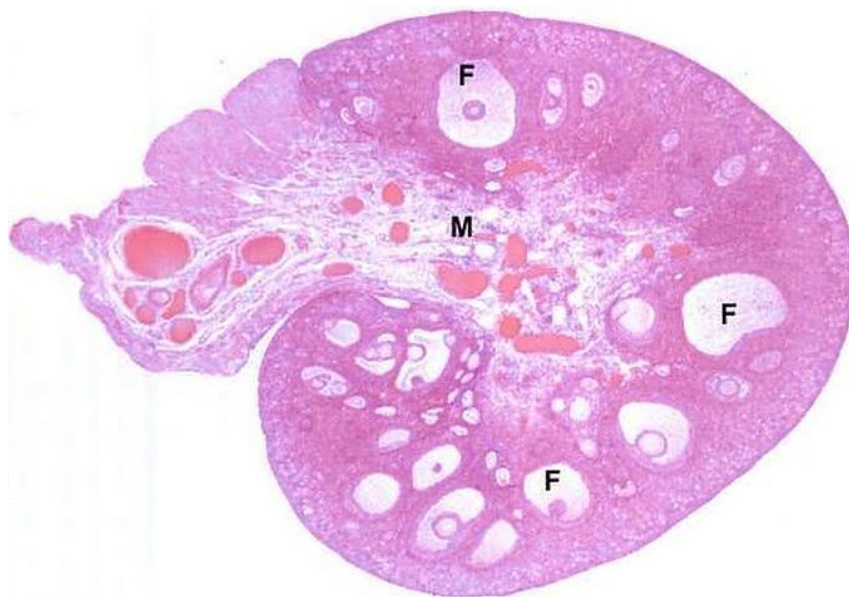


Figura 10. Ovário evidenciando suas duas zonas constituintes: a medula (M) e o córtex, onde se encontram os folículos ovarianos (F) em diferentes estágios de maturação (SANTELLI, 2003).

No ser humano, o desenvolvimento folicular inicia-se desde o período intra-uterino, com cerca de 15 semanas de gestação, quando os oócitos imaturos encontram-se encapsulados e bloqueados no estágio de diplóteno da profase da meiose I, devido ao contato com fatores inibidores da meiose produzidos pelas células da camada granulosa (SANTOS et al., 2009). Com o início da puberdade, ocorre a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas que resulta na liberação pulsátil dos hormônios FSH e LH, responsáveis pelo desenvolvimento cíclico de folículos maduros, ovulação e ciclo menstrual (BAERWALD et al., 2012).

Na mulher, o número de células germinativas é finito e vai decrescendo ao longo da vida devido aos processos de ovulação e principalmente atresia (BAERWALD et al., 2012). Em seis meses de gestação os ovários possuem sete milhões de células germinativas, enquanto no nascimento esse número cai para dois milhões e a redução continua até a menarca, quando existem apenas cerca de 300 mil folículos (BARRET et al., 2014). O processo de atresia é contínuo e é acelerado após os 38 anos, quando ocorre decréscimo da função endócrina e a mulher entra no climatério, período de transição entre o final da fase reprodutiva até a ocorrência da menopausa. A cessação permanente da menstruação e parada na função ovariana indica a menopausa, em torno dos 51 anos, determinada pela quantidade inicial de células germinativas (SPEROFF et al, 2007).

1.3.1. Foliculogênese

A foliculogênese é o conjunto de processos pelas quais a unidade folicular passa desde seu recrutamento da reserva inerte de células germinativas para iniciar seu crescimento até sua involução atrésica ou sua expulsão do ovário através da ovulação. Esses processos têm início na vida fetal e incluem o aumento no tamanho

do oócito, acréscimo no número de células da granulosa e consequente aumento do folículo (SANTOS et al., 2009; Figura 11). O recrutamento de alguns folículos enquanto outros permanecem em repouso é resultado de um delicado equilíbrio entre a expressão e ação de fatores responsáveis por promover proliferação, crescimento e diferenciação das células foliculares e fatores que promovem apoptose (BAERWALD et al., 2012).

A maior parte dos folículos, denominados de folículos primordiais (oócito primário envolvido por uma única camada de células epiteliais achatadas), ficam em estado de repouso e, ao longo da vida reprodutiva, um subconjunto é recrutado a cada ciclo para compor o pool de folículos em crescimento (CHAN et al., 2015). O processo de maturação folicular é dividido em dois períodos: pré-antral, onde o crescimento dos folículos é independente das gonadotrofinas e antral, quando ocorre a formação do antro, e o folículo é dependente de FSH (RAWDING, 2013). O mecanismo de iniciação independente das gonadotrofinas ainda é incerto, o FSH atua somente após o início da maturação folicular, promovendo mitose, aumentando o potencial esteroideogênico e a expressão de receptores de LH (ERICKSON et al., 2007). No entanto, sabe-se que a regulação independente das gonadotrofinas é mediada por reguladores intra-ovarianos como fatores de crescimento, citocinas e esteroides gonadais (ORISAKA et al., 2009).

As células epiteliais proliferam e sofrem modificações, adquirindo uma morfologia cuboide, quando o folículo passa a ser denominado de folículo primário. Ocorre também a formação de uma membrana glicoproteica, entre o oócito e as células da granulosa, denominada de zona pelúcida (DIXON et al., 2014). Com o contínuo desenvolvimento e mitoses sucessivas que resultam em várias camadas celulares na granulosa, surge o folículo secundário, que inicia a formação da teca

interna e externa pela condensação das células conjuntivas que envolvem o folículo e permanecem separadas da granulosa por uma membrana basal (SILVA et al., 2006). Com a formação da teca interna, que é vascularizada diferentemente da camada granulosa, o folículo atinge o estágio de pré-antral (SANTOS et al., 2009).

As mitoses sucessivas das células da granulosa resultam na produção e acumulação de líquido folicular entre as mesmas e, posteriormente, forma-se uma única cavidade denominada de antro, com o líquido em seu interior, originando o folículo antral precoce (BARRET et al, 2014). O oócito continua rodeado de células da granulosa, formando a *corona radiata* e o *cumulus oophorus*, semelhante a uma haste que se prolonga para dentro da cavidade antral, esse folículo é denominado de terciário, pré ovulatório ou de Graaf (DIXON et al., 2014).

O processo de seleção designa o crescimento preferencial do folículo dominante dentre aqueles que foram recrutados e ocorre no início da fase folicular (BAERWALD et al., 2012). A dominância folicular é explicada pela maior resposta do folículo dominante às gonadotrofinas, que é responsável por mediar a produção de estradiol, a expressão de receptores de LH e o crescimento folicular contínuo. Como resultado, ocorre no folículo dominante um crescimento mais rápido, aumento na atividade da aromatase, maior capacidade de secretar estrogênio em seu interior o qual será necessário para sua maturação final e aquisição mais rápida de receptores de LH (BARRET et al., 2014).

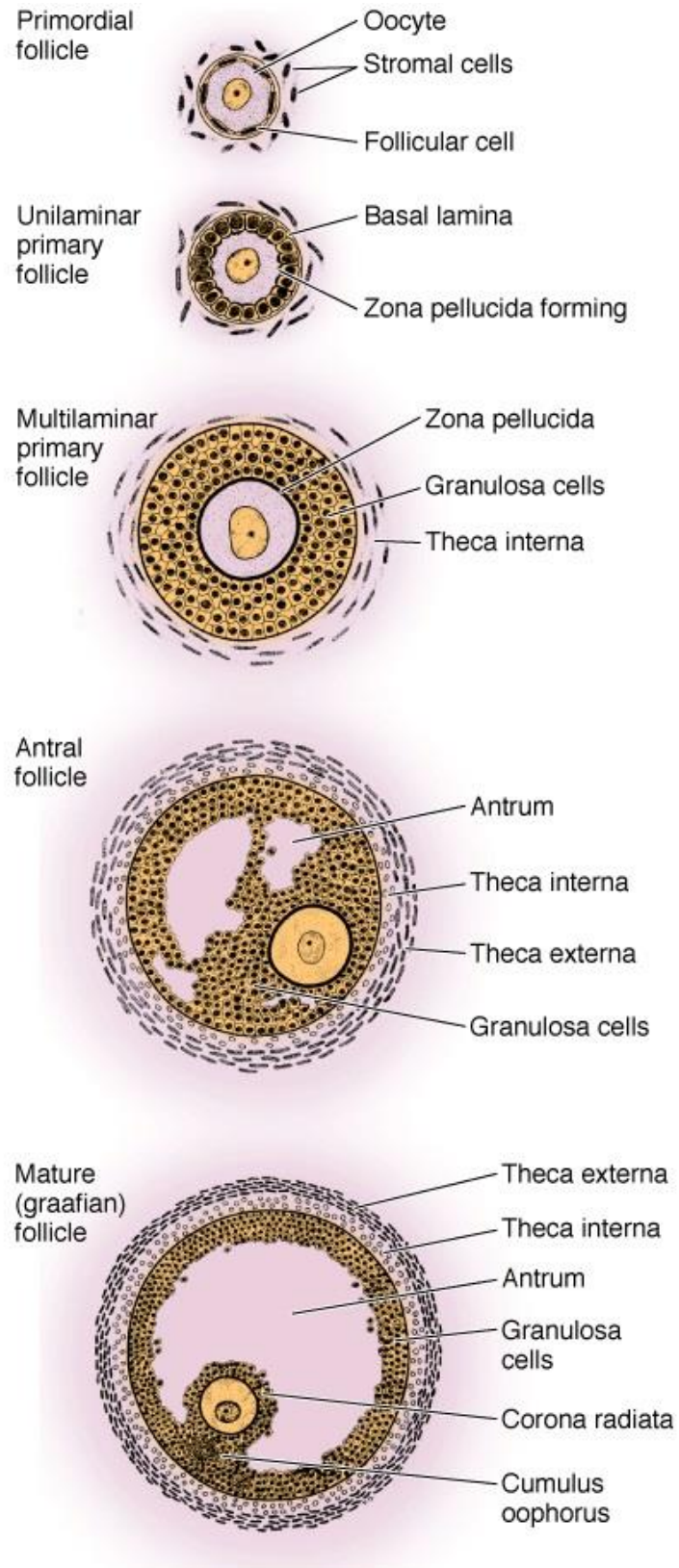


Figura 11. Folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação e estruturas constituintes (MESCHER, 2013).

O folículo dominante suprime o crescimento dos folículos subordinados através de um efeito negativo sobre a secreção de FSH através dos estrogênios e da inibina (BAERWALD et al., 2012). A inibina é um fator expresso nas células da granulosa e da teca, membro da família TGF- β , responsável por uma ação reguladora local e à distância, reduzindo a aromatização de androgênios, inibindo a meiose e impedindo o crescimento dos folículos não selecionados (SANTOS et al., 2009). Os folículos em crescimento que não foram selecionados não possuem receptores de LH na granulosa e são mais sensíveis ao FSH, ao passo que o folículo dominante é mais responsivo ao LH e menos dependente do FSH (BAERWALD et al., 2012). Dessa forma, com a redução fisiológica na concentração desse hormônio entre a fase pré e pós-ovulatória, ocorre regressão e atresia dos demais folículos (BARRET et al., 2014). O processo de atresia ocorre por degeneração das células da granulosa, transformação da teca interna em glândula intersticial e degeneração do oócito (SANTOS et al., 2009).

1.3.2. Ovulação

Na fase final do desenvolvimento folicular, as células da granulosa diferenciam-se morfológica e funcionalmente. As células mais periféricas junto à membrana basal, não proliferam e sintetizam enzimas envolvidas na esteroidogênese e adquirem receptores de LH. Por outro lado, as células das camadas mais internas mantêm a capacidade proliferativa, mas apresentam escassa atividade secretora e raros receptores para LH (SANTOS et al., 2009).

As células da teca interna produzem quantidades crescentes de androgênios sob estímulo do LH e o pico desse hormônio funciona como ativador de uma crescente secreção de proteínas responsáveis por grandes transformações nas

células foliculares. Dentre as modificações estão: parada na proliferação, diferenciação terminal (luteinização), atividade e síntese de enzimas proteolíticas necessárias para a ruptura folicular, liberação do oócito e reinício da meiose bloqueada na prófase I, resultando em duas células filhas, o oócito secundário, que recebe a maior parte do citoplasma e o primeiro corpúsculo polar, que recebe apenas fragmentos e depois desaparece (BERTAN et al., 2006). No entanto, após o oócito iniciar a segunda divisão meiótica, a mesma é novamente bloqueada na metáfase II até a possível ocorrência de fecundação, quando o segundo corpúsculo polar será absorvido e o oócito fertilizado dará sequência ao desenvolvimento de um novo indivíduo (BARRET et al., 2014).

A ovulação designa a ruptura da membrana folicular e liberação do oócito (BERTAN et al., 2006). Dentro de até 24 horas depois do pico de LH, o folículo maduro se rompe e libera o oócito envolvido pelas células da *corona radiata* e *cumulus oophorus* que é captado pelas fímbrias das tubas uterinas e transportado até a região da ampola (BARRET et al., 2014). O rompimento é causado por modificações no conteúdo hormonal e alterações na pressão intra-folicular, desencadeado não somente pelo LH como também por um conjunto coordenado de respostas parácrinas incluindo prostaglandinas e plasminogênio, além da progesterona (RAWDING, 2013). As células tecaais e da camada granulosa de folículos pré-ovulatórios produzem ativadores de plasminogênio, que irão ativar o plasminogênio presente no líquido folicular para produzir plasmina. A plasmina gera collagenase ativa que induz a ruptura folicular (SILVA et al., 2006). As enzimas proteolíticas possuem um importante papel sobre a liberação do oócito, atuando sobre a lâmina basal e parede folicular, degenerando colágeno e induzindo sua ruptura (BERTAN et al., 2006).

Do ponto de vista endócrino, o próprio folículo desencadeia a ovulação através da síntese crescente de estradiol que ao atingir um determinado limiar, ativa o mecanismo de retro regulação que estimula a liberação de gonadotrofinas até o pico pré-ovulatório característico (BARRET et al., 2014). O pico de FSH embora menor, também tem funções importantes como aumento da produção do ativador de plasminogênio, secreção de ácido hialurônico pelas células do *cumulus* que facilita a expansão e dispersão dessas células permitindo que flutuem no líquido folicular antes da ruptura, e constituição de um nível suficiente de receptores de LH na granulosa que é essencial para uma função luteínica adequada (SANTOS et al., 2009).

1.3.3. Formação e fisiologia do corpo lúteo

Após a expulsão do oócito, ocorrem diversas modificações no folículo em nível morfológico e endócrino que dão origem à estrutura endócrina especializada na síntese de progesterona denominada de corpo lúteo (Figura 12; ERICKSON et al., 2007). As células da teca e da granulosa proliferam, aumentam de tamanho e adquirem uma aparência vacuolar com depósito de um pigmento amarelo denominado de luteína e lipídeos, são as células luteínicas. Na maioria dos mamíferos, as células da granulosa originam as grandes células luteais (LLC) e as células da teca, as pequenas células luteais (SLC). As SLC respondem ao LH e liberam baixas concentrações de progesterona, enquanto que as LLC sintetizam altas concentrações de progesterona, mas não respondem ao estímulo do LH (SANTOS et al., 2009).

A diferenciação celular da teca e da granulosa em células luteínicas inicia-se com diminuição na expressão da enzima P450 aromatase e aumento na expressão

de outras enzimas que convertem colesterol em progesterona, como P450scc e 3 β -HSD, e das proteínas que transportam colesterol para a membrana mitocondrial. Ocorre também proliferação de fibroblastos e capilares sanguíneos que penetram na granulosa através da lâmina basal (BERTAN et al., 2006). A angiogênese é fundamental no processo de luteinização e é mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VGEF), essencial para criar a rede necessária para realizar a nutrição do corpo amarelo com substratos necessários à síntese de progesterona e estrógeno (BARRET et al., 2014).

O corpo lúteo é a principal fonte de hormônios esteroides sexuais nessa fase do ciclo e sua capacidade funcional e vida média dependem da secreção de LH na ausência de gestação e de gonadotrofina coriônica humana (HCG) se houver fecundação e gravidez (SANTOS et al., 2009). Além do suporte de LH para que o corpo lúteo exerça uma função endócrina normal é indispensável que se tenha produzido um desenvolvimento folicular normal durante a primeira fase do ciclo, bem como uma luteinização e vascularização adequada da teca durante a fase luteínica precoce (SANTOS et al., 2009). Na ausência de gravidez o corpo lúteo inicia sua degeneração cerca de quatro dias antes da próxima menstruação e é substituído por um tecido de cicatrização, tornando-se o corpo albicans ou albicante (BARRET et al., 2014).

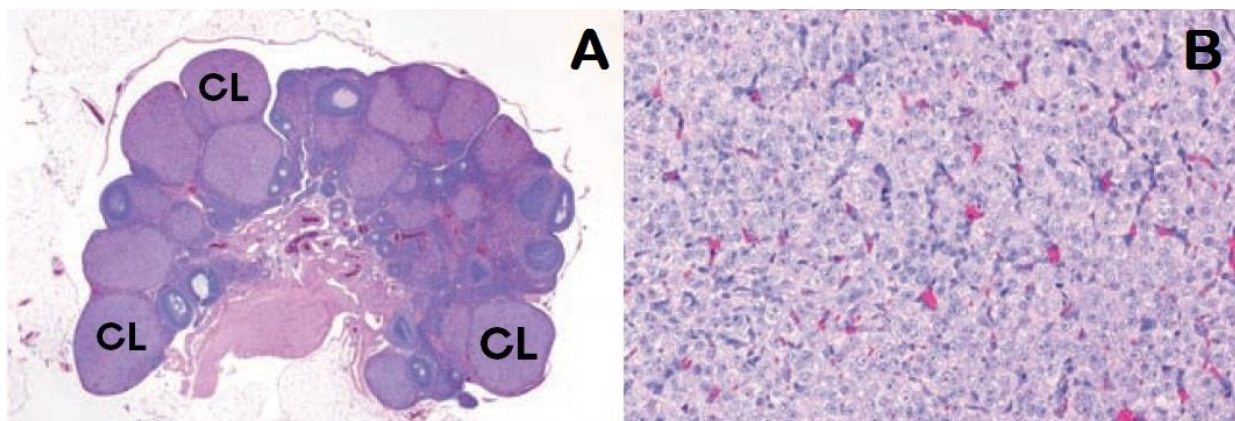


Figura 12. A: Corte histológico de ovário de rata em diestro, com vários corpos lúteos (CL). Em B detalhe de corpo lúteo mostrando as células luteínicas. (DIXON et al., 2014).

1.3.4. Esteroidogênese e regulação hormonal ovariana

A esteroidogênese ovariana obedece a via básica de biossíntese de esteroides a partir do colesterol, que é obtido da síntese local a partir do acetato ou proveniente da circulação geral onde é transportado em forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou alta densidade (HDL), sendo essa a fonte mais importante de colesterol para as células dos ovários (SANTOS et al., 2009). A síntese dos hormônios está funcionalmente compartimentalizada no folículo e a produção de estradiol resulta de um trabalho coordenado entre as células da teca e da granulosa (SILVA et al., 2006; GERVÁSIO et al., 2014). A maquinaria enzimática dos dois tecidos são diferentes e limitam reciprocamente suas atividades (SANTOS et al., 2009).

A teca interna contém receptores de LH e sintetiza preferencialmente androgênios, como a androstenediona e a testosterona, que se difundem através da membrana basal para o interior das células da granulosa onde esses androgênios são convertidos em estrogênios, como a estrona e o estradiol, sob influência de FSH e da indução da atividade da enzima P450 aromatase (BARRET et al., 2014). A teca

sintetiza androgênios que não consegue aromatizar em grande quantidade e a granulosa possui uma grande capacidade de aromatizar androgênios produzidos na teca (SANTOS et al., 2009). Em contato com o LH, os receptores existentes na teca estimulam a atividade de enzimas para realizar a conversão de pregnenolona a androstenediona, transformação que não é possível nas células da granulosa. Por outro lado, a conversão de androstenediona em estradiol pela P450 aromatase é possível somente nas células da camada granulosa (BERTAN et al., 2006).

A esteroidogênese ovariana se resume da seguinte forma (Figura 13): a captação do colesterol para dentro da mitocôndria das células da teca é auxiliada pela enzima StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese) e, em seguida, o colesterol é convertido à pregnenolona pela enzima desmolase (P450scc), sendo esta última convertida em progesterona pela 3β -hidroxiesteroide desidrogenase (3β -HSD). A progesterona pode exercer suas funções biológicas no organismo ou dar seguimento a síntese dos andrógenos, servindo de substrato para a síntese de androstenediona pela enzima citocromo P450-17-hidroxilase. A androstenediona é convertida à testosterona pela 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (17β -HSD) que, por sua vez, pode atuar diretamente no organismo ou nas células da granulosa convertendo-se em dihidrotestosterona através da 5α -redutase ou ser aromatizada a estradiol pela P450 aromatase (CYP450). O estradiol também pode ser sintetizado nas células da granulosa pela aromatização da androstenediona em estrona pela CYP450, e esta em estradiol pela 17β -HSD (GERVÁSIO et al., 2014; APOLLONI et al., 2016).

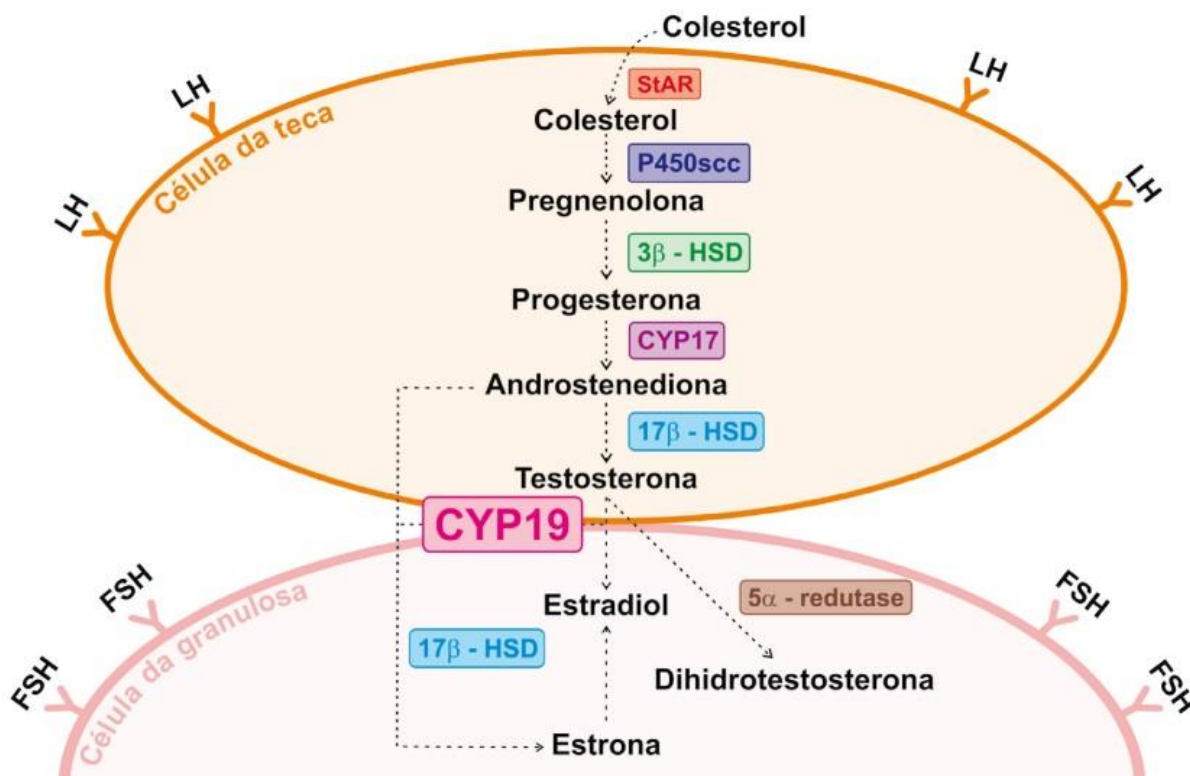


Figura 13. Esteroidogênese nas células ovarianas. Os andrógenos (androstenediona e testosterona) são produzidos nas células tecais pelo estímulo do LH a partir da captação do colesterol circulante. Nas células da granulosa, os andrógenos são aromatizados em estrógenos (estrona e estradiol) pela enzima aromatase sob estímulo do FSH (APOLLONI et al., 2016).

As células da granulosa segregam também grandes quantidades de inibina que tem a propriedade de bloquear a síntese e a liberação de FSH pela hipófise. As taxas plasmáticas de inibina são paralelas às do estradiol e, em conjunto, reduzem a secreção de FSH, suprimindo assim o suporte aos folículos hormônio dependentes, que sofrem atresia. O folículo dominante não é sensível a esse efeito, pois evolui de forma autônoma, sem necessidade do estímulo do FSH (SANTOS et al., 2009). Os estrogênios também exercem uma função de retro-controle positivo sobre a liberação hipofisária de LH, cuja resposta depende do nível da impregnação estrogênica. As altas concentrações plasmáticas de estradiol asseguradas pelo

folículo pré-ovulatório determinam a ocorrência do pico de LH e a consequente ovulação (BERTAN et al., 2006).

O conjunto das regulações do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas se resume da seguinte forma: a partir da puberdade a descarga pulsátil de GnRH permite a secreção basal de FSH que estimula o recrutamento folicular (SANTOS et al., 2009). Os estrogênios intrafoliculares formados a partir dos androgênios e secretados sob controle do LH mantêm sua própria produção e estimulam a proliferação da granulosa. Em sinergia com a inibina, os estrogênios reduzem a liberação de FSH, assegurando a seleção e a dominância do folículo ovulatório (BAERWALD et al., 2012). Acima de um determinado limiar, os estrogênios sensibilizam as células gonadotróficas hipofisárias à ação do GnRH provocando assim a descarga pré ovulatória de LH (SANTOS et al., 2009). A progesterona produzida durante a fase luteínica reduz o ritmo pulsátil de liberação de GnRH que acelera novamente apenas após a queda na secreção de progesterona durante a fase pré-menstrual (SANTOS et al., 2009).

As funções do ovário também são reguladas por fatores autócrinos (produzidos na própria célula) e parácrinos (produzidas em células vizinhas), que podem modular a resposta celular às gonadotrofinas hipofisárias. O sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e os membros da superfamília TGF- β (fator de crescimento transformante beta), como a inibina, activina, follistatina, TGF- β , proteína morfogenética do osso (BMP), fator de crescimento e diferenciação (GDF) e hormônio anti-mulleriano (HAM) são alguns dos fatores de crescimento que operam via parácrina e/ou autócrina na regulação ovariana, no desenvolvimento folicular e na maturação do oócito (BAERWALD et al., 2012). Esses fatores ficam acumulados no líquido folicular, atuam localmente e englobam

hormônios esteroides e proteínas reguladoras que interagem de forma complexa (SANTOS et al., 2009).

1.4. Receptores esteroidais

Os receptores esteroides pertencem à superfamília de receptores nucleares que se localizam no interior das células alvo e agem como fatores de transcrição ativados por ligante (HANDA; WEISER, 2014). A superfamília de receptores nucleares possui uma organização estrutural comum (Figura 14) composta por dois domínios bem definidos: o domínio DNA-ligante (DBD), localizado na região central e o domínio de ligação do ligante (LBD) posicionado na extremidade C-terminal (HUANG et al., 2010). A região N-terminal (grupo amina NH₃) é altamente variável entre os membros da superfamília de receptores nucleares, faz interação com cofatores e possui funções de transativação potentes e independentes do ligante, conhecidas como AF-1 (DRUMMOND et al., 2002; HUANG et al., 2010).

O domínio altamente conservado DNA-ligante (DBD) tem como alvo sequências específicas de DNA denominadas de elementos de resposta hormonal (HREs) e, na maioria das vezes, se ligam ao DNA como dímeros, onde cada monômero reconhece uma sequência de DNA (FONTENELE et al., 2010). O domínio de ligação do ligante (LBD), moderadamente conservado, possui função de ativação da transcrição dois (AF-2), que é responsável pelo recrutamento dos fatores de transcrição de forma dependente do ligante, pois possui propriedade de reconhecer a molécula hormonal, garantindo a especificidade da resposta fisiológica (MANGELSDORF et al., 1995; DRUMMOND et al., 2002; WAGNER et al., 2011).

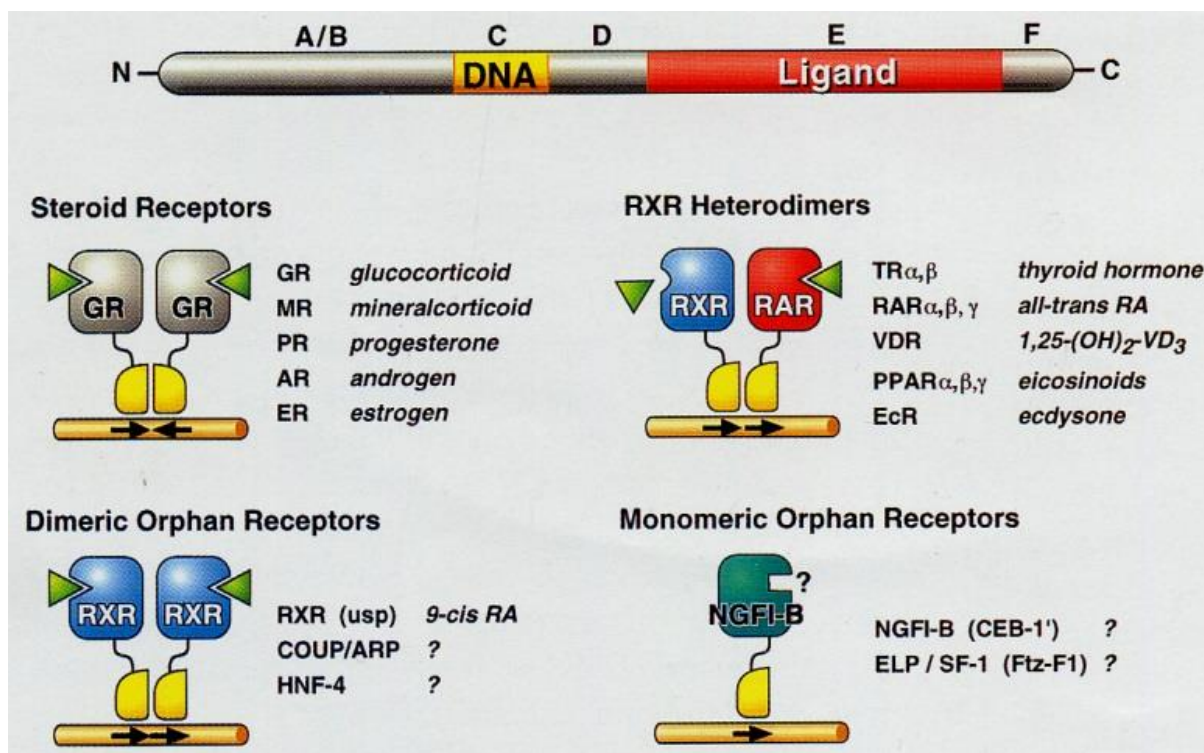


Figura 14. Receptores nucleares típicos apresentam uma estrutura comum. A região N-terminal variável (A/B) um domínio DNA ligante (C), uma região variável D conhecida como *hinge* ou dobradiça, uma região de ligação com ligante (E) e uma região C-terminal variável (F). Os receptores nucleares podem ser subdivididos nas quatro classes mostradas com seus respectivos receptores representativos (MANGELSDORF et al., 1995).

Com base na dimerização e nas propriedades do domínio DNA-ligante, os receptores nucleares podem ser divididos em quatro classes (Figura 14): receptores esteroides que são homodímeros, heterodímeros de RXR (Receptor retinoide X) e receptores órfãos, os quais apresentam ligante específico não definido e a regulação dependente do ligante não é claramente estabelecida, que podem ser homodímeros ou monodímeros (MANGELSDORF et al., 1995; WAGNER et al., 2011). A classe I inclui os receptores de hormônios esteroides (Figura 14), como o receptor de glicocorticoides (GR), mineralocorticoides (MRs), androgênios (AR), estrogênios (ER) e progesterona (PR) que se ligam como homodímeros aos seus respectivos hormônios (MANGELSDORF et al., 1995; FONTENELE et al., 2010).

A classe I de receptores de hormônios esteroides também é agrupada como uma subfamília segundo a sua composição similar de aminoácidos e dipeptídeos (BHASIN; RAGHAVA, 2004). Quando não estão ligados aos hormônios, os receptores dessa classe permanecem associados às proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma ou no núcleo da célula (HANDA; WEISER, 2014). A ligação com o hormônio dissocia esse complexo e provoca a formação de homodímeros que, por sua vez, dirigem-se ao núcleo da célula e se acoplam aos elementos de resposta hormonal para ativação da transcrição (BARRA et al., 2004).

Devido ao caráter lipofílico, os hormônios esteroides sexuais difundem-se através da membrana plasmática e entram na célula onde se acoplam aos receptores que, por sua vez, mediam os efeitos desses hormônios através da regulação da transcrição de genes-alvo (FONTENELE et al., 2010). Além disso, os esteroides sexuais também apresentam seus efeitos rápidos através de receptores na membrana ou no citosol que ativam vias “não-genômicas” ou “não-nucleares”, com ativação de mensageiros secundários e canais iônicos sem a necessidade de ligação com DNA e ativação de transcrição (HANDA; WEISER, 2014; CONTRÒ et al., 2015). A localização dos receptores de esteroides no ovário está ilustrada na Figura 15.

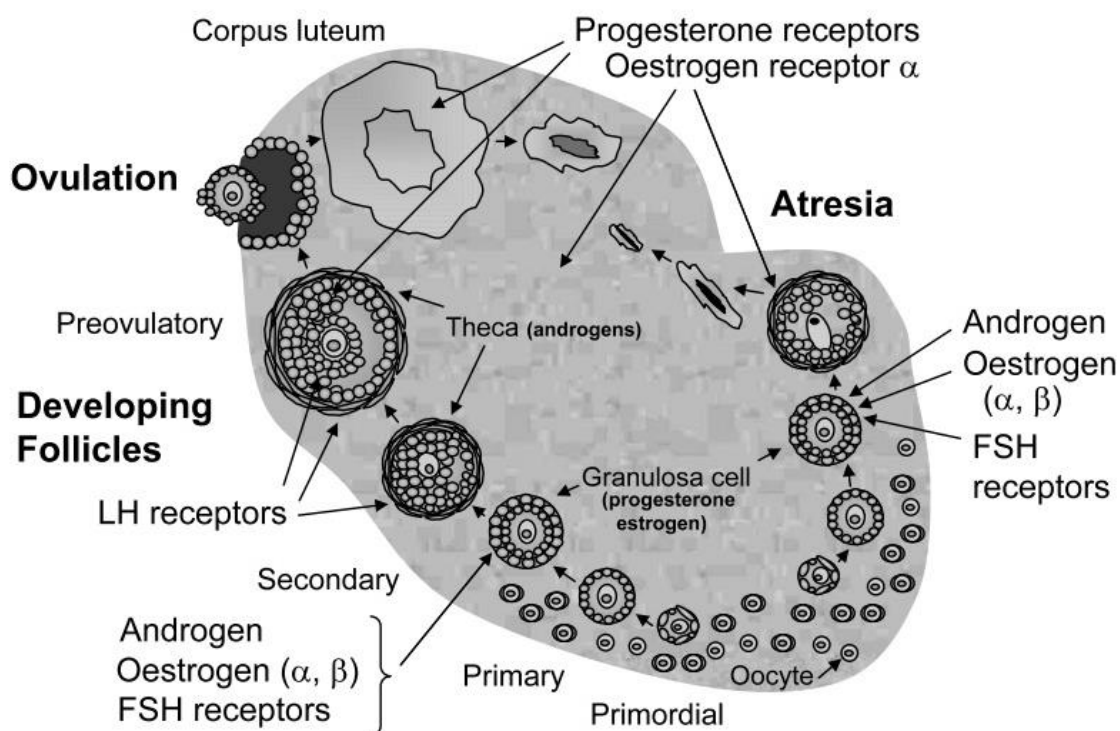


Figura 15. Sítios de receptores de hormônios esteroides, sítios celulares de produção de hormônios esteroides e estruturas foliculares características durante o desenvolvimento folicular e atresia (DRUMMOND et al., 2002).

1.4.1. Receptores estrogênicos

O termo receptor de estrógeno (ER) refere-se a um grupo de receptores que são ativados pelo hormônio 17β -estradiol, exercendo assim um papel crucial no desenvolvimento, reprodução e fisiologia normal em diferentes tecidos-alvo (KORACH, 2000; WOLF et al, 2012). O ovário é o local primário da síntese de estrógeno e o principal alvo desse hormônio que desempenha diversas funções intra-ovarianas durante a foliculogênese mediadas pelos receptores estrogênicos (EMMEN et al., 2005). Os estrogênios ativam ou reprimem a transcrição gênica através da ligação com os ERs formando o complexo hormônio-receptor que, por sua vez, liga-se aos elementos de resposta no DNA na região promotora de genes alvo ou interage com fatores de transcrição (CONTRÒ et al., 2015).

O receptor de estrógeno apresenta-se em duas isoformas: ER α e ER β , ambos presentes nos ovários mas em diferentes tipos celulares e com diferentes papéis na função ovariana (DRUMMOD; FULLER, 2012; WOLF et al, 2012). O ER α está associado à proliferação celular das células da granulosa e ER β , mais abundante, tem função de diferenciação, bloqueando a proliferação celular e iniciando as modificações necessárias para a ovulação (BAERWALD et al., 2012). O ER β é a forma predominante no ovário, expresso pelas células da granulosa em folículos primários, secundários e maduros, células da teca, superfície epitelial e corpo lúteo embora os oócitos também possam expressar o receptor (DRUMMOND; FULLER, 2012). Por outro lado, o ER α está predominantemente localizado nas células da teca interna, nas células intersticiais e no epitélio germinativo, com pequena ou nenhuma expressão nas células granulosas e luteínicas (PELLETIER, 2000; EMMEN et al., 2005).

A importância das ações do estradiol mediadas pelos receptores estrogênicos e a diferença dos papéis desempenhados pelas duas isoformas foram evidenciados por linhagens transgênicas de animais que apresentavam fenótipo de ausência de ER α e/ou ER β , denominadas de ER *knockout* ou ERKO (HEWITT et al., 2000; EMMEN et al., 2005). Fêmeas α ERKO são inférteis, devido à morfologia patológica do ovário (Figura 16), o qual apresenta cistos grandes e hemorrágicos, folículos paralisados no estágio pré-antral, ausência de corpos lúteos e de ovulação e também à insensibilidade do útero que não responde às ações mitóticas e diferenciadoras do estrógeno, essenciais para a completa maturação e função do tecido (HEWITT et al., 2000). O desenvolvimento folicular inicia-se normalmente, porém o fenótipo anovulatório é causado pela ausência do *feedback* negativo sobre a secreção de LH no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas mediado por ER α , pois, em

culturas *in vitro*, excluindo o descontrole no nível de LH, α ERKO exibiram crescimento semelhante à cultura controle e eficiência na ovulação (EMMEN et al., 2005; WOODRUF; MAYO, 2005). Dessa forma, com o ambiente endócrino anormal e ovário hiperestimulado pela elevação crônica nos níveis plasmáticos de LH, ocorre aumento também nas concentrações de estradiol e testosterona (HEWITT et al., 2000; EMMEN et al., 2005).

O ovário de animais β ERKO apresenta morfologia patológica mais atenuada (Figura 16), com presença de folículos em todos os estágios de desenvolvimento, porém há redução no número de folículos maduros e de corpos lúteos (HEWITT et al., 2000; EMMEN et al., 2005). O útero mostrou desenvolvimento normal do epitélio, estroma, miométrio e estruturas glandulares (HEWITT et al., 2000). Em culturas de folículos *in vitro*, β ERKO exibe padrão de crescimento anormal e resposta mediana à indução da ovulação, porém os níveis de gonadotrofinas, estradiol e testosterona são semelhantes às culturas controle (EMMEN et al., 2005). Apesar de apresentar níveis hormonais normais, o número de oócitos liberados em β ERKO é reduzido, sugerindo que o ER β tem participação na ovulação (HEWITT et al., 2000). Além disso, a sinalização por ER β também é necessária para a foliculogênese visto que os ovários de β ERKO mostram menor progressão dos folículos para estágios mais avançados de maturação (DRUMMOND; FULLER, 2012; TARUMI et al., 2014).

Apesar de ER β não mediar diretamente a resposta ovulatória frente ao pico de LH, o mesmo desempenha um importante papel na diferenciação do folículo que será ovulado, intermediando ações críticas do estrógeno como a formação do antro, maturação do folículo pré-ovulatório e a ruptura do folículo maduro (EMMEN et al., 2005). O efeito de sinergia entre estradiol e o FSH também é mediado por ER β e, na ausência dessa via, a estimulação da proliferação da granulosa pelo FSH é

diminuída, resultando em um folículo que não responde totalmente ao estímulo do pico ovulatório de LH (WOODRUF; MAYO, 2005). Dessa forma, a atividade proliferativa do estrógeno é transmitida preferencialmente via ER α , entretanto os demais variados efeitos do hormônio são mediados por ER β (DRUMMOND et al., 2002). Sendo assim, a foliculogênese e a ovulação podem ocorrer normalmente na ausência de ER α , mas não na ausência de ER β , considerando que os níveis hormonais sejam controlados (DRUMMOND; FULLER, 2012).

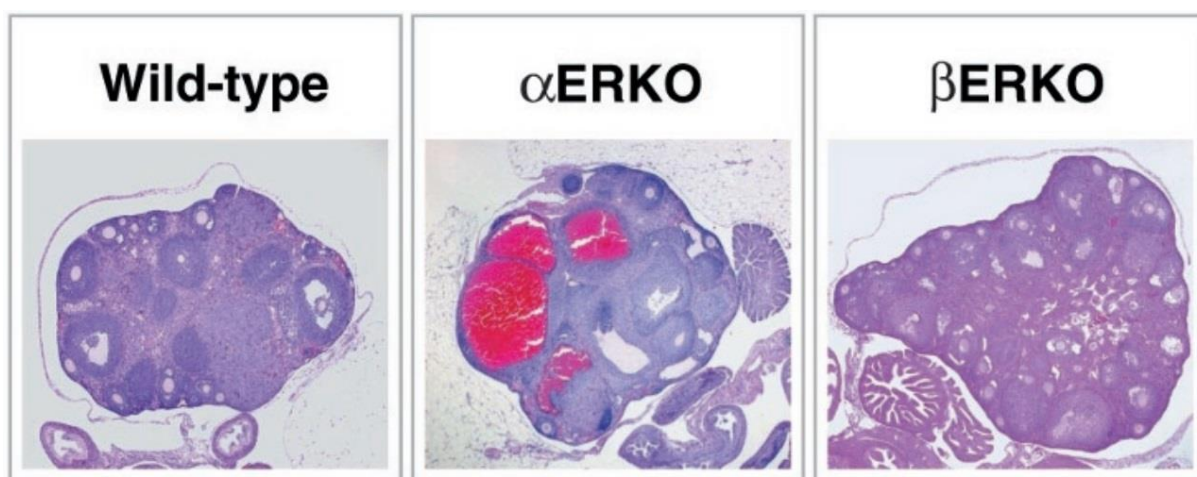


Figura 16. Patologia ovariana em ratas ERKO. A análise histológica evidencia um desenvolvimento folicular normal e indício de ovulação no ovário do tipo selvagem ou normal (à esquerda). O ovário α ERKO mostra grandes estruturas císticas e hemorrágicas e sem indicações de ovulação, enquanto o ovário β ERKO ovário mostra desenvolvimento folicular em vários estágios, porém pouca indicação de sucesso na ovulação (HEWITT et al., 2000).

1.4.2. Receptores androgênicos

Os receptores androgênicos (AR) são responsáveis pelas principais ações centrais e periféricas da testosterona e de seu metabólito reduzido, 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (HANDA; WEISER, 2014). A atividade do AR ocorre com a ligação desses hormônios, sendo o DHT o ligante de maior afinidade e que ativa a

expressão de genes com mais eficiência em relação à testosterona (SOLAKIDI et al., 2005; HUANG et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Quando inativo, AR permanece acoplado com uma proteína de choque térmico (HSP) no citoplasma das células. Com a ligação de um andrógeno, AR dissocia-se da HSP, podendo agir localmente mimetizando ação de fatores de crescimento (ação extra nuclear) ou se unir a outras proteínas auxiliando a estabilização de AR e sua translocação para o núcleo (APOLLONI et al., 2016). No núcleo, o complexo hormônio-receptor junta-se com uma segunda molécula de AR ativada formando um dímero, que então se liga a uma sequência específica no DNA denominada de ARE (elementos de resposta aos andrógenos) (MATSUMOTO et al., 2008). Essa ligação desencadeia a transcrição de genes alvo por interação direta com a maquinaria de transcrição ou através do recrutamento de co-ativadores (WANG; CHANG, 2004; APOLLONI et al., 2016). O AR também desempenha ações não genômicas, quando interage com moléculas sinalizadoras localizadas na membrana plasmática que ativam vias e sinalizam cascatas que regulam outros receptores nucleares, fatores de transcrição e eventos sinalizadores citoplasmáticos como, por exemplo, a liberação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular pelo retículo endoplasmático e mitocôndria (APOLLONI et al., 2016).

Em homens, as ações dos andrógenos mediadas por AR são essenciais para promover a diferenciação sexual, o desenvolvimento durante a puberdade, regulação da espermatogênese e controle dos níveis de testosterona através de *feedback* (SOLAKIDI et al., 2005; HUANG et al., 2010). Disfunções no gene AR em mamíferos machos provocam um quadro denominado de mutação de feminilização testicular andrógeno-insensitiva (Tfm), caracterizado pelos órgãos sexuais externos semelhantes aos femininos e infertilidade (KIMURA et al., 2007; MATSUMOTO et

al., 2008). Em estudos utilizando modelos animais de linhagem AR knockout (ARKO), foram encontrados resultados semelhantes à desordem Tfm, pois os órgãos sexuais possuíam aparência tal como os femininos e órgãos reprodutivos como vesículas seminais, ducto deferente, epidídimo e próstata eram ausentes. Os animais apresentavam um testículo rudimentar com espermatogênese severamente comprometida, evidenciando que o AR não é requerido totalmente para a formação dos testículos, porém é essencial para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e espermatogênese normal (MATSUMOTO et al., 2008; SEM; HAMMES, 2010).

Apesar dos papéis fisiológicos mais críticos nos homens, AR também é responsável por ações importantes na função reprodutiva das mulheres (LU et al., 2006). No ovário, foi encontrada expressão de AR em células da teca, da granulosa e no oócito dos folículos na maioria dos estágios de desenvolvimento e no corpo lúteo e células intersticiais, com o padrão de expressão diferente entre os tipos celulares (CHADHA et al., 1994; KIMURA et al., 2007; SEM; HAMMES, 2010, APOLLONI et al., 2016). A expressão em oócitos é moderada em roedores e pouco evidente ou ausente em humanos (LENIE; SMITZ, 2008). Na maioria das espécies, AR é abundante nos folículos de menor diâmetro, em estágio pré-antral e antral e menos expresso em folículos maduros pré-ovulatórios (LENIE; SMITZ, 2008; SEM; HAMMES, 2010). O mecanismo de regulação da expressão de AR durante o desenvolvimento folicular não está totalmente esclarecida, no entanto o consenso geral é que durante a passagem do estágio pré-antral para o pré-ovulatório, a expressão de AR diminui nos folículos dando espaço para a expressão de ER que se torna a dominante (SEM; HAMMES, 2010).

Os andrógenos via AR auxiliam no desenvolvimento folicular nos estágios mais precoces através da prevenção da atresia folicular e promoção do crescimento

dos folículos a partir do aumento dos níveis de receptores de FSH e regulação da expressão de fatores de crescimento chave (GERVÁSIO et al., 2014; PRIZANT et al., 2014; SEN et al., 2014). O AR facilita a ação do FSH, regulando positivamente o receptor desse hormônio durante o estágio pré-antral, um crítico período de influência do FSH no desenvolvimento folicular (WANG; CHANG, 2004).

Através de estudos com fêmeas ARKO, além de estudos *in vitro* e relatos clínicos foi possível comprovar a necessidade de AR para a foliculogênese normal (SEM; HAMMES, 2010). As fêmeas ARKO desenvolvem a gônada normalmente, porém apresentam fertilidade reduzida caracterizada por redução nas taxas de fertilidade e de ovulação, maior duração do ciclo estral, menor número de filhotes por ninhada, desenvolvimento folicular anormal com maior incidência de atresia e redução no número de folículos antrais e corpos lúteos e na espessura da camada granulosa de folículos (KIMURA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2008; SEM; HAMMES et al., 2010; APOLLONI et al., 2016). No estudo de MATSUTOMOTO et al. (2008), ratas ARKO com oito semanas de idade mostraram ovário (Figura 17) com um número maior de folículos atrésicos e decréscimo no número de corpos lúteos. O resultado foi ainda mais agravante com 40 semanas, quando as ratas tornaram-se inférteis com nenhum folículo detectável. Dessa forma, os folículos pré-antrais tornam-se atrésicos ao invés de progredirem para o estágio ovulatório e posteriormente formarem um corpo lúteo (PRIZANT et al., 2014). Com a maior incidência de atresia ocorre infertilidade precoce, evidenciando o papel crucial de AR para o desenvolvimento folicular e sucesso na ovulação (MATSUMOTO et al., 2008; SEM; HAMMES, 2010).

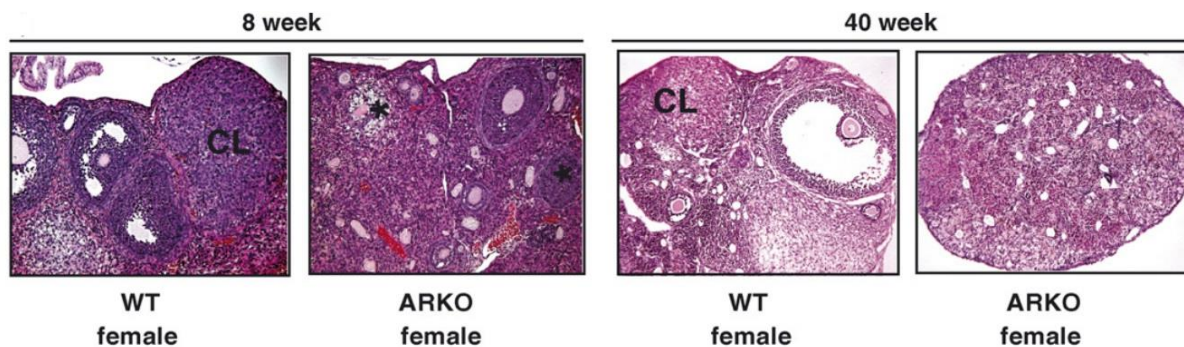


Figura 17. Patologia ovariana em ratas ARKO. Com oito semanas de idade é predominante a presença de folículos atrésicos e em 40 semanas nenhum folículo é detectado. WT: tipo saudável/selvagem (MATSUMOTO et al., 2008).

1.5. Esteroides anabólicos androgênicos (EAA)

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas quimicamente relacionadas à testosterona, principal esteroide androgênico e anabólico endógeno masculino (FRIZON et al., 2009; ROCHA et al., 2014). Grande parte dos autores da comunidade científica utiliza o termo EAA ou anabolizantes em referência aos fármacos sintéticos baseados na estrutura da molécula de testosterona e seus derivados, que mimetizam os hormônios esteroides naturais (CUNHA et al., 2004; WEINECK, 2005; ARALDI et al., 2013; MORAES et al., 2015 CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2016).

O efeito androgênico dos EAA está relacionado ao desenvolvimento das características secundárias masculinas e à função reprodutiva, enquanto que o efeito anabólico corresponde à ação miotrófica, aumentando a síntese proteica e, consequentemente, a massa muscular, além do controle da distribuição de gordura corpórea e depósito de cálcio nos ossos (NUNES, 2009; IRIART et al., 2011; BASUALTO-ALARCÓN et al., 2013). A proporção entre efeitos anabólicos e androgênicos varia de acordo com o EAA, sendo as propriedades androgênicas as

responsáveis pela maioria dos efeitos colaterais e contraindicações (CUNHA et al., 2004; LIMA; CARDOSO, 2011; SOUZA et al., 2013). No entanto, os EAA agem sobre os receptores de andrógenos (AR), os quais ocorrem em praticamente todas as células do corpo e regulam os mecanismos intracelulares responsáveis tanto pelos efeitos anabólicos quanto os androgênicos, não havendo possibilidade de dissociá-los (CUNHA et al., 2004; KICMAN, 2008).

Em 1935, a testosterona foi sintetizada pela primeira vez e tornou-se disponível para finalidades experimentais e terapêuticas (CUNHA et al., 2004). Tradicionalmente, os EAA são prescritos clinicamente para o tratamento do hipogonadismo, realizando a reposição hormonal de testosterona e seus derivados, necessários ao desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas, sendo prescritos também em casos de retardamento na puberdade e crescimento, micropênis neonatal e deficiência androgênica em idosos (CUNHA et al., 2004; MORAES et al., 2015). EAA também são prescritos em casos de perda de massa muscular, câncer de mama, angioedema hereditário, endometriose grave e deficiência no metabolismo proteico (RIBEIRO, 2001; CUNHA et al., 2004; EVANS, 2004; CECCHETTO et al., 2012). Além disso, os EAA atenuam os sintomas da insuficiência respiratória ou cardíaca crônica (HANDELSMAN, 2006), aceleram a cicatrização de fraturas ósseas (AHMAD et al., 2013), tratam os sintomas da AIDS (JOHNS et al., 2005) e também são utilizados na reposição hormonal pós-menopausa (ARLT, 2006).

Nas últimas décadas, no entanto, houve uma explosão de técnicas de manipulação e gerenciamento do corpo humano como dietas, cirurgias estéticas e consumo de “drogas da imagem corporal”, dentre as quais se incluem os anabolizantes, estimuladas por um culto ao corpo ideal presente na sociedade

contemporânea (IRIART et al., 2009; BOFF, 2010). Atraídos pelo potente efeito anabólico capaz de aumentar a massa muscular em curto período de tempo, indivíduos recorrem aos EAA para melhorar não somente desempenho físico e atlético como também a aparência corporal (FERREIRA et al., 2014). Esse tipo de uso estimulado pela busca por padrões de beleza ou repercussões no desempenho físico sem orientação de um profissional da área da saúde é denominado de “não-médico” ou “não-terapêutico”, ao qual estão associados diversos riscos à saúde já descritos na literatura, em artigos de políticas públicas e frequentemente veiculado na mídia (SOUZA et al., 2013; MORAES et al, 2015).

Dessa forma o abuso do consumo de EAA não se restringe somente ao meio esportivo, tornando-se popular entre os jovens não-atletas para finalidades estéticas graças à facilidade de obtenção do fármaco através de meios ilícitos, como o mercado negro ou farmácias que comercializam sem a prescrição médica (FRIZON et al., 2005; IRIART et al., 2009; SOUZA et al., 2013). O grupo de risco inclui os jovens, pois a idade de início do uso de EAA é a adolescência ou logo após a mesma, sendo a maioria dos usuários do sexo masculino, embora as taxas entre as mulheres tenham crescido na última década (KANAYAMA et al., 2010; POPE et al., 2013; SAGOE et al., 2014). Conforme apontam diversas pesquisas, muitas vezes os usuários desconhecem a gravidade dos efeitos colaterais ou não levam em consideração os riscos à saúde associados ao uso não médico do fármaco (ABRAHIN et al., 2013; FRIZON et al., 2005). Considerando-se o perfil dos usuários de abuso e a magnitude dos efeitos colaterais, o uso não terapêutico dos EAA constitui-se de um problema de saúde pública que envolve o âmbito social, governamental e científico (CAMARGO et al., 2009a; LIMA; CARDOSO, 2011).

Os EAA foram desenvolvidos a partir da modificação molecular da estrutura da testosterona, visando a maximização dos efeitos anabólicos em detrimento dos androgênicos além de diminuir a aromatização para estradiol que decorreria em efeitos feminilizantes (ROCHA et al., 2014). As principais modificações na estrutura molecular da testosterona são: a) alquilação na posição 17α resultando em compostos oralmente ativos que resistem ao metabolismo hepático; b) esterificação na posição 17β , resultando em compostos mais hidrofóbicos de ação prolongada e parentéricos ativos, com forma de administração injetável (LIMA; CARDOSO, 2011; SOUZA; HALLAK, 2011; ROCHA et al., 2014).

Dentre os EAA disponíveis comercialmente (Quadro 2), o decanoato de nandrolona é um dos mais utilizados no Brasil (FRIZON et al., 2005) e no mundo (KUTSCHER et al., 2002) e considerado um dos esteroides mais populares (IRIART et al., 2009; ABRAHIN et al., 2013), sendo comercializado com o nome de Deca-Durabolin®. Esse fármaco é uma preparação anabólica injetável, com ação prolongada de até três semanas após administração intramuscular em humanos (CUNHA et al., 2004). Sua substância ativa é a nandrolona (Figura 18), que comparativamente à testosterona, apresenta moderado potencial androgênico e boa propriedade anabólica além de menor taxa de conversão a estrogênio (PERRY et al., 2005; SILVA et al., 2007). Após a administração intramuscular, o fármaco é hidrolisado no organismo, resultando na perda do ácido decanoico e recuperação de um grupo funcional hidroxila, transformando-se em nandrolona, um esteroide biologicamente ativo (TYLICKY et al., 2007). A nandrolona é metabolizada pela enzima 5α -redutase, porém seu metabólito ativo 5α -diidronandrolona apresenta pouca afinidade ao receptor androgênico. A ação 5α -redutase é maior nos órgãos sexuais e menor em outros tecidos, como o muscular esquelético e cardíaco, por tal

fato a nandrolona desencadeia menores efeitos androgênicos em relação à testosterona (CUNHA et al., 2004).

QUADRO 2 Exemplos de nomes comerciais de EAA mais populares (ROCHA et al., 2014)	
Esteroides orais (17α alquilados)	Esteroides injetáveis (17β esterificados)
Anadrol (oximetolona)	Deca Durabolin (decanoato de nandrolona)
Oxandrin/Anavar (oxandrolona)	Durabolin (propionato de nandrolona)
Dianabol (metandrostenolona)	Deposteron (cipionato de testosterona)
Windstrol (stanozolol)	Equipoiese (undecilinato de boldenona)
Danazol	Tetrahydrogestriona (THG)



Figura 18. Fórmula estrutural das moléculas de testosterona, decanoato de nandrolona e nandrolona (NEVES et al., 2015).

1.5.1. Efeitos colaterais dos EAA no organismo

O uso indiscriminado dos EAA acarreta em uma série de efeitos colaterais que são acentuados com o consumo de altas doses e por longos períodos de tempo, em outros termos, os danos são dose e período-dependentes (IRIART et al., 2009; VENÂNCIO et al., 2010). Os efeitos deletérios provocados pelos EAA estão

atrelados às suas propriedades androgênicas e tóxicas e afetam diversos órgãos e sistemas (ABRAHIN; SOUSA, 2013). O hábito do uso não terapêutico de EAA, na maioria dos casos, caracteriza-se pelas doses suprafisiológicas, altamente superiores àquelas indicadas para o tratamento de doenças (PERRY et al., 2005; FRONCZAK et al., 2012). No entanto, os efeitos deletérios do uso de EAA podem ocorrer até mesmo em dosagens terapêuticas (ABRAHIN; SOUSA, 2013), podendo ser reversíveis ou irreversíveis (AMSTERDAM et al., 2010).

O consumo de EAA compromete a função neuroendócrina devido desequilíbrio no balanço hormonal, já que a liberação das gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH) é suprimida pelas doses exógenas de EAA por meio de um *feedback* negativo (ABRAHIN; SOUSA, 2013; BOREGOWDA et al., 2011). No sistema reprodutivo masculino, a diminuição no nível de FSH acarreta em prejuízos à espermatogênese, enquanto a diminuição do LH afeta o estímulo necessário à síntese de testosterona endógena que, por sua vez, é encontrada em baixos níveis nos usuários de EAA (RUWANPURA et al., 2010; VENÂNCIO et al., 2010; FRONCZAK et al., 2012).

Os baixos níveis de testosterona endógena podem resultar no hipogonadismo, atrofia testicular, alterações na espermatogênese, morfologia anormal dos espermatozoides, potencialização do desenvolvimento do câncer de próstata, disfunção erétil, perda da libido e consequente infertilidade (LIMA; CARDOSO, 2011; ABRAHIN; SOUSA, 2013; RAHNEMA et al., 2014; ROCHA et al., 2014). Outro desequilíbrio hormonal encontrado em usuários de EAA é o aumento no nível de estradiol proveniente da aromatização dos andrógenos exógenos o que, muitas vezes, é responsável por acúmulo de gordura em locais específicos como na

região dos mamilos caracterizando a ginecomastia (CUNHA et al., 2004; VENÂNCIO et al., 2010).

A literatura relata os diversos prejuízos promovidos por estes fármacos em outros sistemas do organismo, tais como, o sistema cardiovascular os quais são relatados aumento da pressão sanguínea, insuficiência cardíaca (BAGGISH et al., 2010), hipertrofia do músculo cardíaco (ISMAIL et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2016), aterosclerose e infarto do miocárdio (FRIZON et al., 2005). Mudanças no perfil lipídico como o aumento do colesterol sanguíneo, aumento do LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e diminuição do HDL (lipoproteínas de alta densidade) também são consequências do abuso de EAA (VENÂNCIO et al., 2010).

A estrutura e função do fígado são alteradas em usuários de EAA, causando aumento na atividade das enzimas hepáticas, hepatite, hiperplasia e desenvolvimento de carcinoma hepático (VENÂNCIO et al., 2010; LIMA; CARDOSO et al., 2011; HARDT et al., 2012). Em relação ao sistema musculoesquelético, em tendões e ligamentos os EAA tem efeito contrário ao anabólico ocorrente nos músculos e ossos, aumentando o risco de lesões musculotendinosas devido à alteração na estrutura do colágeno que se torna menos elástico e pela ausência de adaptação dos tendões à hipertrofia dos músculos (ROCHA et al., 2014). O uso de EAA prejudica o crescimento ósseo em usuários em fase de crescimento pelo estímulo do estrógeno que estimula a maturação epifisária de ossos longos (ROGOL, 2010).

Efeitos colaterais dermatológicos são relatados em usuários de EAA, tais como aumento na secreção das glândulas sebáceas resultando em acne severa, alopecia e dermatite seborreica e estrias associadas ao rápido crescimento muscular (ROGOL, 2010; ABRAHIN; SOUZA, 2013; FERREIRA et al., 2014). Alterações

psicológicas e psiquiátricas também foram relacionadas ao uso de EAA, tais como ansiedade, irritabilidade, agressividade, distúrbios de humor e depressão (OBERLANDER; HENDERSON, 2012; RICCI et al., 2012; FERREIRA et al., 2014) e o uso contínuo é inclusive associado à síndrome de dependência (KANAYAMA et al.; POPE et al., 2010). Outra relação é a existência de possíveis déficits cognitivos relacionados à memória visuo-espacial em usuários de EAA (KANAYAMA et al., 2012).

1.5.2. Efeitos dos EAA na reprodução feminina

Embora o público masculino seja maioria entre os usuários de EAA (DICLEMENTE et al.; SAGOE et al.; POPE et al., 2014) e portanto o principal gênero estudado dentro da temática, o uso entre as mulheres tem atingido taxas expressivas nas últimas décadas (IRVING et al., 2002; LUNDHOLM et al., 2010; THORLINDSSON; HALLDORSSON, 2010; ACEVEDO et al., 2011). Entretanto, os estudos detalhados envolvendo a caracterização das usuárias e análise dos efeitos colaterais reprodutivos em mulheres e fêmeas ainda são escassos na literatura (HARTGENS; KUIPERS, 2004; IP et al., 2010). Entre as consequências adversas nas mulheres destaca-se o efeito de masculinização, evidenciado pelo engrossamento da voz e crescimento de pelos pelo corpo (hirsutismo), atrofia das mamas, aumento da libido, agressividade, irregularidade menstrual e hipertrofia clitoriana (HOFFMAN; RATAMESS, 2006; KICMAN, 2008; AMSTERDAM et al., 2010; ROCHA et al., 2014). Pode ocorrer também alopecia androgênica, que juntamente com o engrossamento da voz, aumento do clitóris e hirsutismo facial não são reversíveis após a parada no uso (ABRAHIN; SOUSA, 2013; ROCHA et al., 2014). As desordens no ciclo ovariano e menstrual como puberdade tardia,

deficiência da fase lútea, oligomenorreia (irregularidade na frequência menstrual) ou amenorreia (ausência de fluxo menstrual) e anovulação ocorrem mesmo em doses muito pequenas de EAA (CANNAVÒ et al., 2001; ROGOL, 2010).

Apesar de poucos estudos sobre o impacto dos EAA na reprodução feminina, há relatos na literatura de que em murinos fêmeas, o tratamento com diferentes EAA suprime a ciclicidade estral (CLARK et al., 1998; BENTO-SILVA et al., 2010; CAMARGO et al., 2011), provoca atrofia ovariana, intensa atresia folicular com formação de estruturas císticas e redução ou ausência de corpos lúteos (CAMARGO et al., 2014) resultando em diminuição do peso da gônada (HILLIER; ROSS, 1979; BENTO-SILVA et al., 2010). No útero, a administração de esteroides anabólicos induz alterações histopatológicas e morfométricas em sua estrutura (MOBINI FAR et al., 2007) podendo causar aumento de peso do órgão (CAMARGO et al., 2014).

Os efeitos deletérios na reprodução ocorrem devido à capacidade dos EAA de alterar o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, fazendo com que o aumento nos níveis de andrógenos circulantes iniba a liberação de LH e FSH e consequente diminuição na síntese de estrógeno e progesterona, impedindo o crescimento folicular e a ovulação além das irregularidades no ciclo reprodutivo (CAMARGO et al., 2009b; BORDBAR et al., 2014).

Estudos utilizando o decanoato de nandrolona em ratas, demonstraram que o esteroide promove danos na estrutura morfológica uterina de maneira dose-dependente (CAMARGO et al., 2009a; MOBINI FAR et al., 2007; CHUFFA et al., 2011a; BERLADIN et al., 2014) e aumento no peso do órgão (CAMARGO et al., 2011), aciclicidade estral (GEREZ et al., 2005; SIMÃO et al., 2015), atrofia ovariana com diminuição do peso da gônada (CAMARGO et al., 2009b), diminuição no

número de folículos antrais e primordiais saudáveis (CAMARGO et al., 2011; BORDBAR et al., 2014; SIMÃO et al., 2015), aumento no número de folículos atresícos e diminuição no número e área dos corpos lúteos (CAMARGO et al., 2009b; SIMÃO et al., 2015), comprometimento da capacidade reprodutiva (CAMARGO et al., 2009b) e redução nos níveis de FSH, LH, estrógeno e progesterona (BORDBAR et al., 2014).

1.6. Melatonina

Atualmente, muitas pesquisas têm focado sua atenção na avaliação do uso de substâncias capazes de atenuar ou suprimir os efeitos colaterais promovidos por diversos fármacos (VOLLBRACHT et al., 2011; AYGÜL et al., 2012; BORDBAR et al., 2014). Entre estas substâncias destaca-se o hormônio melatonina, que possui excelente propriedade antioxidante e profilática em diferentes sistemas e tem despertado atenção da comunidade científica e aplicado experimentalmente com intuito terapêutico em várias condições (GALANO et al., 2011; MOHAMMADGHASEMI et al., 2012). O efeito protetor contra toxicidade de substâncias, a possível capacidade de retardo do envelhecimento e a redução de radicais livres (estresse oxidativo) são devido à ação da melatonina sobre o sistema imunológico e à interação com substâncias antioxidativas (MAGANHIN et al., 2008; REITER et al., 2010).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) conhecida como “hormônio do sono”, é um tipo de indolamina de estrutura molecular altamente conservada e secretada em todas as espécies de vertebrados durante a noite pela glândula pineal, um órgão endócrino ativo localizado no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais (AYGÜL et al.; MOHAMMADGHASEMI et al., 2012). Esse

neurohormônio é um composto orgânico de coloração amarelo-claro, altamente lipossolúvel que é transportado no plasma ligado a proteínas como a albumina (MASANA; DUBOCOVICH, 2011; MAGANHIN et al., 2008). Existem outras fontes de produção da melatonina como a retina, o corpo celular da íris, glândulas lacrimais, leucócitos, ovário e intestino grosso, no entanto essa produção extra pineal tem importância para ação local onde foram produzidas, e contribuição mínima para a concentração plasmática (MAGANHIN et al., 2008).

A melatonina tem vida média entre 30 e 60 minutos e é derivada da serotonina, que por sua vez, resulta da conversão do triptofano (RADOONA et al., 2010). Níveis elevados de serotonina são encontrados durante o dia, decaindo durante a fase noturna pela conversão em melatonina na pineal (REITER et al. 2010). A escuridão estimula a produção de melatonina, enquanto a luz inibe e a informação luminosa é captada pelas células ganglionares da retina e transmitida para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo e desse para a glândula pineal (AYGÜL et al., 2012).

A glândula pineal juntamente com os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo constitui parte crucial do sistema neuroendócrino, o qual é responsável pela organização temporal de diferentes eventos fisiológicos e comportamentais (MAGANHIN et al., 2008). Essa capacidade de organização temporal é crucial para regulação endócrina e metabólica em casos de adaptação às flutuações temporais cíclicas do meio ambiente, regulação do ciclo sono-vigília, do sistema imunológico, cardiovascular e reprodutivo (REITER et al., 2010; HARDELAND et al., 2011; AYGÜL et al., 2012). A melatonina influencia o ritmo de diferentes processos fisiológicos durante a noite tais como a digestão que se torna mais lenta, a diminuição da temperatura corporal, a redução do ritmo cardíaco e da pressão sanguínea ao passo

que o sistema imunológico é estimulado (MAGANHIN et al., 2008; PAULIS et al., 2010).

A melatonina age sobre seus receptores específicos, MT1 e MT2, os quais influenciam os ritmos diários e sazonais de processos fisiológicos e comportamentais, como também tem ação independente de receptores quando atua como sequestradora de radicais livres e reagentes relacionados (DUBOCOVICH et al., REITER et al., 2010). Na década de 90, foram encontrados os primeiros indícios de que a melatonina seria capaz de atuar como antioxidante (REITER et al., 1995; 1996). A literatura relata que a melatonina atua diretamente captando os radicais livres (hidroxila e peroxila) e atua em uma ação antioxidante indireta em sinergia com outros antioxidantes (MAGANHIN et al., 2008; REITER et al., 2010). A melatonina é capaz de atuar como doadora de elétrons em processos não enzimáticos e inibe enzimas da família citocromo P450, reduz a formação de peroxinitritos em quadros de inflamação, reduz a peroxidação lipídica e expressão da síntese de óxido nítrico (AYGÜL et al., 2012).

A ação no sistema imunológico ocorre por receptores acoplados à proteína G, na membrana das células imunocompetentes, aumentando a mobilidade de células de defesa, estimulando a produção de anticorpos e facilitando a defesa contra microrganismos. A modulação sobre as respostas inflamatórias pode ocorrer de forma positiva ou negativa, dependendo das células e mediadores envolvidos (MAGANHIN et al., 2008). A melatonina pode modular a ação de enzimas pró-inflamatórias, controlar a produção de mediadores inflamatórios promovendo as fases iniciais de inflamação e por outro lado, contribui para a atenuação da mesma interferindo também nos processos apoptóticos e impedindo as complicações da inflamação crônica. Os leucócitos são capazes de produzir melatonina ou reagem ao

hormônio oriundo de outros sítios de produção, respondendo como uma ação endócrina, parácrina e autócrina da melatonina (RADOGNA et al., 2010).

1.6.1. Melatonina e a reprodução feminina

A regulação da função ovariana pela melatonina envolve a ativação dos receptores MT1 e MT2 ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (DUBOCOVICH et al., 2010) que atuam via redução do AMPcíclico (MAGANHIN et al., 2008). A melatonina é encontrada no fluido dos folículos ovarianos promovendo assim uma ação direta nas funções da gônada (RÖNNBERG et al., 1990). Tamura et al. (2009) mostraram que os folículos pré-ovulatórios contêm alta quantidade de melatonina, indiretamente ligada a processos de diferenciação celular como a esteroidogênese (WOO et al., 2001). Estudos de Taketani et al., (2011) evidenciaram a capacidade protetora da melatonina sobre as células da granulosa dos folículos contra o estresse oxidativo e contribuição para a luteinização e produção de progesterona.

Em relação aos efeitos de doses exógenas de melatonina sobre a função reprodutiva, os experimentos de Woo et al. (2001) mostraram um aumento nos receptores de LH e diminuição na quantidade de GnRH e de seu receptor específico. Chuffa et al. (2011b) mostraram que a administração de melatonina pode suprimir parcialmente o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e induzir uma regulação diferencial de receptores de esteroides sexuais no ovário e útero durante a ovulação, reduzindo os níveis de LH e estradiol e aumentando a progesterona ao passo que a expressão da isoforma ER- α foi diminuída (CHUFFA et al., 2011b; 2013a). Administrações de longo prazo com melatonina alteraram a massa ovariana e a ciclicidade estral além de protegerem os ovários da peroxidação lipídica durante a ovulação (CHUFFA et

al., 2011c). Proteção sobre o gameta feminino e redução da peroxidação lipídica em humanos também foram relatadas (TAKASAKI et al., 2003).

O tratamento com melatonina mostrou eficácia terapêutica na redução do crescimento tumoral, proliferação celular e inibição da angiogênese em mamas (JARDIM-PERASSI et al., 2014) e reduziu a incidência de adenocarcinoma de ovário em modelo de ratas consumidoras voluntárias de etanol (CHUFFA et al, 2013b). A melatonina também desempenha um papel positivo sobre condições como endometriose, síndrome de ovários policísticos e falência ovariana prematura (TAMURA et al., 2009). A ação protetora frente a agentes deletérios foi relatada em ovários de ratas tratadas com nicotina (MOHAMMADGHASEMI et al., 2012) e contra os danos da radiação nos folículos ovarianos (KIM; LEE, 2000). Todavia, nenhum relato na literatura foi até o momento descrito quanto à associação do hormônio melatonina e esteroides anabólicos androgênicos no âmbito da reprodução feminina.

Seria possível um tratamento clínico com esteroides anabólicos, excluindo seus efeitos indesejáveis sobre a reprodução? Quais seriam os resultados de um tratamento terapêutico associando esteroides anabólicos e melatonina? A melatonina deveria ser administrada previamente ou conjuntamente ao esteroide para obtenção de um melhor resultado?

II. HIPÓTESES

Tendo em vista os efeitos prejudiciais dos esteroides anabólicos no trato reprodutor feminino, a melatonina entra nesse cenário como um possível fármaco com potencial protetor nos ovários frente a esses efeitos deletérios, visto que a mesma apresenta regulação sobre a fisiologia ovariana. Sabe-se que o decanoato de nandrolona é capaz de provocar danos no sistema reprodutor masculino através

de estresse oxidativo (TAHTAMOUNI et al., 2010; MINAI et al., 2014), ao passo que a melatonina atua como um potente antioxidante. Além disso, ambos decanoato de nandrolona e melatonina têm influência sobre os receptores dos hormônios esteroides sexuais nos ovários.

Com base nesses questionamentos, o presente estudo tem como hipótese que a melatonina possa recuperar a capacidade reprodutiva de fêmeas suprimida pela administração de decanoato de nandrolona, já que este hormônio possui ação profilática sobre o tecido ovariano e atua na regulação hormonal.

III. OBJETIVOS

O objetivo fundamental do estudo foi avaliar se o tratamento com melatonina apresenta efeito protetor nos ovários de ratas tratadas com o decanoato de nandrolona, utilizando-se da avaliação histopatológica dos ovários, imunolocalização dos receptores androgênicos (AR) e estrogênicos (ER α e ER β), ciclo estral, quantificação de folículos saudáveis e atresicos e medição do número e área de corpos lúteos.

IV. REFERÊNCIAS

ABRAHIN, O. S. C.; SOUZA, N. S. F.; SOUSA, E. C. D.; MOREIRA, J. K. R.; NASCIMENTO, V. C. D. Prevalência do uso e conhecimento de esteroides anabolizantes androgênicos por estudantes e professores de educação física que atuam em academias de ginástica. **Revista brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 1, p. 27-30, 2013.

ACEVEDO, P.; Jorge, J. C.; Cruz-Sánchez, A.; Amy, E.; Barreto-Estrada, J. L. A ten-year assessment of anabolic steroid misuse among competitive athletes in Puerto Rico. **The West Indian medical journal**, v. 60, n. 5, p. 531, 2011.

AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, A.; HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 117-123, 2010.

AHMAD, F. YUNUS, S. M.; ASGHAR, A.; FARUGI, N. A. Influence of Anabolic Steroid on Tibial Fracture Healing in Rabbits – A Study on Experimental Model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 1, p. 93-96, 2013.

APOLLONI, L. B.; Bruno, J. B.; Alves, B. G.; Figueiredo, J. R. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01-15, 2016.

ARALDI, R. P.; OLIVEIRA, D. G. D.; SILVA, D. F. D.; MENDES, T. B.; SOUZA, E. B. D. Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da l-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, p. 448-451, 2013.

ARAÚJO, G. S.; MACHADO, A. F. P.; TACANI, P. M.; TACANI, R. E.; ALBERO, P. J. F.; LIEBANO, R. E. Massa corporal, imagem corporal e desejo por tratamentos estéticos nas diferentes fases do ciclo menstrual. **Saúde (Santa Maria)**, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2015.

ARLT, W. Androgen therapy in women. **European Journal of Endocrinology**, v. 154, p.1-11, 2006.

AYGÜN, D.; KAPLAN, S.; ODACI, E.; ONGER, M. E.; ALTUNKAYNAK, M. E. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. **Histology and histopathology**, v. 27, n. 4, p. 417, 2012.

BAERWALD, Angela R.; ADAMS, Gregg P.; PIERSON, Roger A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2012.

BAGGISH, A.L.; WEINER, R.B.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I. PICARD, M.H., HUTTER, A.M.; POPE, H.G. Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Use Is Associated With Left Ventricular Dysfunction Clinical Perspective. **Circulation: Heart Failure**, v. 3, n. 4, p. 472-476, 2010.

BASUALTO-ALARCÓN, C.; MAASS, R.; JAIMOVICH, E.; ESTRADA, M. Anabolic/Androgenic Steroids in Skeletal Muscle and Cardiovascular Diseases. In: FEDELE, M. **Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases**. 1. ed. Croácia (União Europeia): InTech, 2013.

BARCELOS, I. D. E.; DONABELA, F. C.; DA BROI, M. G.; RIBAS, C. P.; MEOLA, J., NAVARRO, P. A. Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus. **Reprodução & Climatério**, v. 28, n. 2, p. 51-56, 2013.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A.; NEVERS, F. A. R. Molecular mechanism of thyroid hormone action. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BARRETT, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. L. **Fisiologia médica de Ganong**. 24^a ed. Porto Alegre (RS): McGraw-Hill; 2014.

BATISTA, C. S. Progesterona e Progestágenos: Síntese, Classificação e Uso. **Femina**, v. 32, n. 8, p. 639-644, 2004.

BENTO-SILVA, M.T.; MARTINS, M. C. C.; TORRES-LEAL, F. L.; BARROS, T. L.; CARVALHO, I. L. N. F.; CARVALHO, H. A. F.; ALMEIDA, F. R. C. Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. **Brazilian Journal of Pharmacological Science**, v. 46, n.1, p.79-89, 2010.

BELARDIN, L. B.; SIMAO, V. A.; LEITE, G. A. A.; CHUFFA, L. G. D. A.; CAMARGO, I. C. C. Dose- Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 168-177, 2014.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; SOUZA, A. T. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. S. Classification of nuclear receptors based on amino acid composition and dipeptide composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23262-23266, 2004.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BOFF, S. R. Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 18, n. 1, p. 81-88, 2010.

BORDBAR, H.; MESBAH, F.; TALAEI, T.; DEHGHANI, F., MIRKHANI, H. Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. **Iranian journal of medical sciences**, v. 39, n. 1, p. 44, 2014.

BOREGOWDA, K., JOELS, L.; STEPHENS, J. W.; PRICE, D. E. Persistent primary hypogonadism associated with anabolic steroid abuse. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 1, p. e7-e8, 2011.

BRZYSKI, R. G.; KNUDTSON, J. **Menstrual Cycle**. Merck Manual, 2013. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/home/women-s-health-issues/biology-of-the-female-reproductive-system/menstrual-cycle> Acesso em 13 set. 2016.

CAMARGO, I. C. C.; GASPAR, A. L. C.; FREI, F.; MESQUITA, S. F. P. Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n. 9, p. 453-460, 2009a.

CAMARGO, I. C. C.; SOUZA, R. B.; MESQUITA, S. F. P.; CHUFFA, L. G. A.; FREI, F. Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical effort. **Acta Biologica Hungarica**, v. 60, n. 3, p. 253-261, 2009b.

CAMARGO, I. C. C.; GÊNOVA, T. C.; MACHADO, M. C. P.; FREI, F., MESQUITA, P.; FATIMA, S. Administração experimental de esteroide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, p. 656-665, 2011.

CAMARGO, I. C. C.; LEITE, G. A. A.; PINTO, T.; PAES, J. T. R. Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, n. 4, p. 195-202, 2014.

CANALI, E. S.; KRUEL, L. F. M. Respostas hormonais ao exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 15, n. 2, p. 141-53, 2001.

CANNAVÒ, S.; CURTÒ, L.; TRIMARCHI, F. Exercise-related female reproductive dysfunction. **Journal Endocrinology Invest**, v. 24, n.10, p.823–832, 2001.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A.; SILVA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Nível de conhecimento e ocorrência do uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Revista Científica FAGOC-Saúde**, v. 1, n. 1, p.37-40, 2016.

CECCHETTO, F.; MORAES, D. R.; FARIAS, P. S. Distintos enfoques sobre esteroides anabolizantes: riscos à saúde e hipermasculinidade. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 16, n. 41, p. 369-382, 2012.

CHADHA, S.; PACHE, T. D.; HUIKESHOVEN, F. J.; BRINKMANN, A. O. Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. **Human pathology**, v. 25, n. 11, p. 1198-1204, 1994.

CHAVES, C. P. G.; SIMÃO, R.; ARAÚJO, C. G. S. Ausência de variação da flexibilidade durante o ciclo menstrual em universitárias. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 212-8, 2002.

CHUFFA, L. G.; SOUZA, R. B.; FREI, F.; MESQUITA, S. F. P.; CAMARGO, I. C. C. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. **Anatomical Records**, v. 294, n. 2, p. 335-341, 2011a.

CHUFFA, L. G., SEIVA, F. R., SEIVA, F. R. F.; FÁVARO, W. J., TEIXEIRA, G. R., AMORIM, J. P., MENDES, L. O.; FIORUCI, B. A.; PINHEIRO, P. F. F.; FERNADES, A. H.; FRANCI, J. A. A.; DELELLA, F. K.; MARTINEZ M.; MARTINEZ, F. E. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, n. 1, p.108, 2011b.

CHUFFA, L. G. A.; SEIVA, F. R. F.; AMORIM, J. P. A.; TEIXEIRA, G. R.; MENDES, L. O.; NOVELLI, E. L. B.; PINHEIRO, F. F. MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 217-223, 2011c.

CHUFFA, L. G. A.; SEIVA, F. R. R.; FÁVARO, W. J.; AMORIM, J. P. A.; TEIXEIRA, G. R.; MENDES, L. O.; FONTANELLI, B. A. F.; PINHEIRO, P. F. F., MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. **Reproductive Toxicology**, v. 39, p. 40-49, 2013a.

CHUFFA, L. G. A.; FONTANELLI, B. A. F.; MENDES, L. O.; FÁVARO, W. J.; PINHEIRO, P. F. F.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Characterization of chemically induced ovarian carcinomas in an ethanol-preferring rat model: influence of long-term melatonin treatment. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e81676, 2013b.

CLARK, A. S.; BLASBERG, M. E.; BENNETT, E. M. B. Stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiology & behavior**, v. 63, n. 2, p. 287-295, 1998.

CONCEIÇÃO, A. P. M.; BATISTA, A. P. C.; ARAÚJO, A. C. C.; SILVA, F. C. A.; TEIXEIRA, V. W., TEIXEIRA, A. A. Análise histológica da endometriose em ratas durante as fases do ciclo estral. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 439-443, 2005.

CONTRÒ, V.; BASILE, J. R.; PROIA, P. Sex steroid hormone receptors, their ligands, and nuclear and non-nuclear pathways. **AIMS Molecular Sciences**, v. 2, p. 294-310, 2015.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, 2004.

DICLEMENTE, R.; JACKSON, J.; HERTZBERG, V.; SETH, P. Steroid Use, Health Risk Behaviors and Adverse Health Indicators among US High School Students. **Family Medicine & Medical Science Research**, v. 3, n. 2, 2014.

DIXON, D.; ALISON R.; BACH, U.; COLMAN, K.; FOLEY, G. L.; HARLEMAN, J. H.; HAWORTH, R.; HEBERT, R.; HEUSER, A.; LONG, G.; MIRSKY, M.; REGAN, K.; ESCH, E. V.; WESTWOOD, F. R.; VIDAL, J.; YOSHIDA, M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Jornal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 3–4, p. 1S-107S, 2014.

DRUMMOND, A. E.; BRITT, K. L.; DYSON, M.; JONES, M. E.; KERR, J. B.; O'DONNELL, L.; SIMPSON, E. R.; FINDLAY, J. K. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 27-33, 2002.

DRUMMOND, A. E.; FULLER, P. J. Ovarian actions of estrogen receptor- β : an update. In: **Seminars in reproductive medicine**, v. 30, n. 01, 2012. p. 32-38.

DUBOCOVICH, M. L.; DELAGRANGE, P.; KRAUSE, D. N.; SUGDEN, D.; CARDINALI, D. P.; OLCESE, J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 343-380, 2010.

EMANUELE, M. A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N. V. Alcohol's effects on female reproductive function. **Alcohol Research and Health**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2002.

EMMEN, J. M.; COUSE, J. F.; ELMORE, S. A.; YATES, M. M.; KISSLING, G. E.; KORACH, K. S. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2817-2826, 2005.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 534-542, 2004.

ERICKSON, G. F.; CHANG, R. J. Basic Biology: Ovarian anatomy and physiology In: LOBO, R. A. **Treatment of the Postmenopausal Woman: Basical and Clinical Aspects**. 3 ed. St Louis: Elsevier Academic Press, p. 49-66, 2007.

FERNANDES, S.; MAÇÃES, A.; NUNES, F.; GERALDES, F.; ÁGUAS, F. Hirsutismo pós-menopausa: caso clínico raro de hipertecose ovárica. **Reprodução & Climatério**, v. 30, n.1, p. 42-46, 2015.

FERREIRA, L. O.; COUTO, B. P.; SZMUCHROWSKI, L. A.; DRUMMOND, M. D. M. Efeitos Colaterais associados ao uso de Esteroides Anabolizantes Andrógenos Auto Relatados por Praticantes de Musculação do sexo Masculino. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 18, p. 35-42, 2014.

FINOTTI, M. C. C. F. Síndrome de insuficiência androgênica na mulher: diagnóstico e implicações terapêuticas. **Brasília Médica**, v. 50, n. 4, p. 312-317, 2013.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FRANKOVICH, R. J.; LEBRUN, C. M. Menstrual cycle, contraception, and performance. **Clinics in sports medicine**, v. 19, n. 2, p. 251-271, 2000.

FRONCZAK, C. M.; KIM, E. D.; BARQAWI, A. B. The insults of illicit drug use on male fertility. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 515-528, 2012.

FRIZON, F.; MACEDO, S. M. D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 227-232, 2009.

FULLER, P. M.; GOOLEY, J. J.; SAPER, C. B. Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. **Journal of biological rhythms**, v. 21, n. 6, p. 482-493, 2006.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of pineal research**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GHAPHERY, N. A. Performance-enhancing drugs. **The orthopedic clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 433-442, 1995.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. **Embriologia**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001

GEREZ, J. R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. **Contraception**, v. 72, n.1, p. 77-80, 2005.

GERVÁSIO, C. G.; BERNUCI, M. P.; SILVA-DE-SÁ, M.F.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S. The role of androgen hormones in early follicular development. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GUERRIERI, G. M.; MARTINEZ, P. M.; KLUG, S. P.; HAQ, N. A.; VANDERHOOF, V. H.; KOZIOL, D. E.; POPAT, V. B.; KALANTARIDOU, S. N.; CALIS, K. A.; PHARM, D., RUBINOW, D. R., SCHMIDT, P. J., NELSON, L. M. Effects of Physiologic Testosterone Replacement on Quality of Life, Self-Esteem, and Mood in Women with

Primary Ovarian Insufficiency. **Menopause (New York, NY)**, v. 21, n. 9, p. 952-961, 2014.

GHAPHERY, N. A. Performance-enhancing drugs. **The orthopedic clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 433-442, 1995.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 197-220, 2014.

HANDELSMAN, D.J. Testosterone: use, misuse and abuse. **Medical journal of Australia**, v. 185, n. 8, p. 436-439, 2006.

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

HARDT, A.; STIPPEL, D.; ODENTHAL, M.; HÖLSCHER, A.H.; DIENES, H.P.; DREBBER, U. Development of Hepatocellular Carcinoma Associated with Anabolic Androgenic Steroid Abuse in a Young Bodybuilder: A Case Report. **Case Reports in Pathology**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports medicine**, v. 34, n. 8, p. 513-554, 2004.

HEWITT, S. C.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor transcription and transactivation Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 345-352, 2000.

HILLIER, S. G.; ROSS, G. T. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. **Biology of Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 261-268, 1979.

HOFFMAN J. R; RATAMESS N. A. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 182-193, 2006.

HUANG, P.; CHANDRA, V.; RASTINEJAD, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 247, 2010.

IP, E. J.; BARNETT, M. J.; TENEROWICZ, M. J.; KIM, J. A.; WEI, H.;PERRY, P. J. Women and anabolic steroids: an analysis of a dozen users. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 20, n. 6, p. 475-481, 2010.

IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 25, p. 773-782, 2009.

IRVING, L. M.; WALL, M.; NEUMARK-SZTAINER, D.; STORY, M. Steroid use among adolescents: findings from Project EAT. **Journal of Adolescent Health**, v. 30, n. 4, p. 243-252, 2002.

ISMAIL, T. F.; ANGELL, P. J.; JABBOUR, A.; SMITH, G.; WAGE, R.; HEWINS, B.; PRASAD, S. K. Cardiac effects of anabolic steroid use amongst recreational body builders-a CMR study. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 14, n.1, p. 186, 2012.

ITOO, M. S.; SHAHDAD, S.; ITOO, O. B.; AKHTER, F.; SHAH, N. A.; SHAH, B. A., BHAT, G. M.; ZAGOO, A. H.; GILKAR, S. A. Effects of estrogen benzoate on the microanatomy of adrenal gland in female Albino rats. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 373, 2013.

JARDIM-PERASSI, B. V., ARBAB, A. S., FERREIRA, L. C., BORIN, T. F., VARMA, N. R., ISKANDER, A. S. M.; SHANKAR, A.; ALI, M. M.; ZUCCARI, D. A. P. C. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. **PloS one**, v. 9, n. 1, p e85311, 2014.

JOHNS, K. K. J; BEDDALL, M. J.; CORRIN, R. C. Anabolic steroids for the treatment of weight loss in HIV-infected individuals. **The Cochrane Library**, 2005.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Illicit anabolic-androgenic steroid use. **Hormones and behavior**, v. 58, n. 1, p. 111-121, 2010.

KIMURA, S.; MATSUMOTO, T.; MATSUYAMA, R.; SHIINA, H.; SATO, T.; TAKEYAMA, K. I.; KATO, S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 183-189, 2007.

LENIE, S.; SMITZ, J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 4, p. 685-695, 2009.

LIMA, A. P.; CARDOSO, F. B. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. **Revista de Atenção à Saúde (antiga Rev. Bras. Ciên. Saúde)**, v. 9, n. 29, 2012.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influencia dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 472-482, 2011.

LUCHI, W. M.; RICARTE, R. N.; ROITMAN, L. F.; SANTOS, O. D. R. Nephrocalcinosis associated with the use of anabolic steroid. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 1, p. 135-140, 2015.

MESCHER A. L. Junqueira basic histology: text and atlas. 13 ed. Shanghai: McGraw-Hill Medical, 2013.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p.502-21, 2008.

KIM, J. K.; LEE, C. J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in γ -irradiated mouse. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 449, n. 1, p. 33-39, 2000.

KORACH, K. S. Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1 suppl, p. S16-S17, 2000.

KUTSCHER, E. C.; LUND, B. C.; PERRY, P. J. Anabolic steroids: A review for the clinician. **Sports Medicine**, v. 32, n. 5, p. 285-296, 2002.

LU, N. Z.; WARDELL, S. E.; BURNSTEIN, K. L.; DEFRANCO, D.; FULLER, P. J.; GIGUERE, V.; HOCHBERG, R. B.; MCKAY, L.; R. J. M.; WEIGEL, N. L.; WILSON, E. M.; MCDONNELL, D. P.; CIDLOWSKI, J. A. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 782-797, 2006.

LUCHI, W. M.; RICARTE, R. N.; ROITMAN, L. F.; SANTOS, O. D. R. Nephrocalcinosis associated with the use of anabolic steroid. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 1, p. 135-140, 2015.

LUNDHOLM, L.; KÄLL, K.; WALLIN, S.; THIBLIN, I. Use of anabolic androgenic steroids in substance abusers arrested for crime. **Drug and alcohol dependence**, v. 111, n. 3, p. 222-226, 2010.

CARLA, C. M.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; SOUZA, I. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609-614, 2002.

MARQUES, S. S. S.; CRUZ, M. C.; TOLENTINO, I. G.; FERNANDES, E. P. Q.; BORGES, J. F. C.; FERREIRA, M. M.; SOUZA, J. H. K. D. Dosagem sérica dos esteróides sexuais. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.14, n. 13, p. 102-105, 2016.

MASANA M. I.; DUBOCOVICH M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Science Signaling**, v. 2001, n. 107, p. pe39, 2011.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, 2013.

MATSUMOTO, T.; SHIINA, H.; KAWANO, H.; SATO, T.; KATO, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 3, p. 236-241, 2008.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 1, p. 81-151, 2010.

MINAI, B.; MOAYERI, A.; SHOKRI, S.; ROUDKENAR, M. H.; GOLMOHAMMADI, T.; MALEK, F.; BARBARESTANI, M. Melatonin improve the sperm quality in forced swimming test induced oxidative stress in nandrolone treated wistar rats. **Acta Medica Iranica**, v. 52, n. 7, p. 496, 2014.

MOHAMMADGHASEMI, F.; JAHROMI, S. K.; HAJIZADEH, H.; HOMAFAR, M. A.; SAADAT, N. The Protective Effects of Exogenous Melatonin on Nicotine-induced Changes in Mouse Ovarian Follicles. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 13, n. 3, p. 143, 2012.

MOBINI FAR, H. R.; AGREN, G.; LINDQVIST, A. S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.; THIBLIN, I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **European Journal Obstetric Gynecology Reproductive Biology**, v. 131, n. 2, p. 189-197, 2007.

MORAES, D. R.; CASTIEL, L. D.; RIBEIRO, A. P. P. G. "Não" para jovens bombados," sim" para velhos empinados: o discurso sobre anabolizantes e saúde em artigos da área biomédica. **Cadernos de saúde pública**, v. 31, p. 1131-1140, 2015.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's illustrated biochemistry**. 26 ed. Nova York: McGraw-Hill Companies, 2003.

NASCIMENTO, A. M.; LIMA, E. M.; BRASIL, G. A.; CALIMAN, I. F.; SILVA, J. F.; LEMOS, V. S.; ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S. Serca2a and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p. 22-30, 2016.

NAVAS, S.; ALVIS, H.; GUTIÉRREZ, J.; ALCALÁ, G.; MOSCOTE, L. Estrógenos, receptores estrogénicos y aneurismas cerebrales: Revisión de la literatura Estrogens, estrógeno receptors and cerebral aneurysms: Review of the literature. **Neurocirugía**, v. 22, n. 2, P. 19-30, 2013.

NEVES, V. J.; GUZZONI, V.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M.; MARCONDES, F. K. Efeitos cardiovasculares da associação de esteroides anabólicos androgênicos

com treinamento físico resistido. **Arquivos em Movimento**, v. 11, n. 2, p. 56-69, 2015.

NUNES, L. G. Esteroides anabolizantes: mecanismos de ação e efeito sobre o sistema reprodutor masculino. **Revista Digital EFD Esportes**, Ano 14, n.136, 2009. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/efd136/esteroides-anabolizantes-e-sistema-reprodutor-masculino.htm>> Acesso em: 04 jan. 2015.

OBERLANDER, J. G.; HENDERSON, L. P. The Sturm und Drang of anabolic steroid use: angst, anxiety, and aggression. **Trends in Neurosciences**, v.35, p. 382-392, 2012.

ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; TSANG, B. K.; KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. **Journal of ovarian research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2009.

PAULIS, L.; PECHANOVA, O.; ZICHA, J.; BARTA, A.; GARDLIK, R.; CELEC, P.; KUNES, J.; SIMKO, F. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during I-NAME-induced hypertension. **Journal of pineal research**, v. 48, n. 2, p. 102-108, 2010.

PELLETIER, G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. **Histology and histopathology**, v. 15, n. 4, p. 1261-1270, 2000.

PERRY, P. J.; LUND, B. C; DENINGER, M. J; KUTSCHER, E. C; SCHNEIDER, J. Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey and drug utilization. **Clinic Journal Sport Medicine**, v. 15, n. 5, p. 326-330, 2005.

POPE, H. G.; KEAN, J.; NASH, A.; KANAYAMA, G.; SAMUEL, D. B.; BICKEL, W. K.; HUDSON, J. I. A diagnostic interview module for anabolic-androgenic steroid dependence: preliminary evidence of reliability and validity. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v.18, n. 3, p. 203-2013, 2010.

POPE JR, H. G.; WOOD, R. I.; ROGOL, A.; NYBERG, F.; BOWERS, L.; BHASIN, S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 35, n. 3, p. 341-375, 2013.

POPE, H. G.; KANAYAMA, G.; ATHEY, A.; RYAN, E.; HUDSON, J. I.; BAGGISH, A. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: Current best estimates. **The American Journal on Addictions**, v. 23, n. 4, p. 371-377, 2014.

PRIZANT, H.; GLEICHER, N.; SEN, A. Androgen actions in the ovary: balance is key. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R141-R151, 2014.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1844-1852, 2010.

RAHNEMA, C. D.; LIPSHULTZ, L. I.; CROSNOE, L. E.; KOVAC, J. R.; KIM, E. D. Anabolic steroid-induced hypogonadism: diagnosis and treatment. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 5, p. 1271-1279, 2014.

RAWDING, R. S. The human ovarian cycle: why are undergraduate texts still getting it wrong. **HAPS Educator**, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2013.

REITER, R. J.; MELTZ, M. L. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. **Mutation Research Letters**, v. 346, n. 1, p. 23-31, 1995.

REITER, R. J. Antioxidant actions of melatonin. **Advances in pharmacology**, v. 38, p. 103-117, 1996.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127-151, 2010.

RIBEIRO, P.C.P. O uso indevido de substâncias: esteroides anabolizantes e energéticos. **Adolescência Latino Americana**, v. 2, n. 2, p. 97-101, 2001.

RICCI, L. A.; MORRISON, T. R.; MELLONI JR, R. H. Serotonin Modulates Anxiety-Like Behaviors during Withdrawal from Adolescent Anabolic-Androgenic Steroid Exposure in Syrian Hamsters. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 5, p. 569-578, 2012.

ROCHA, F. L.; ROQUE, F. R.; OLIVEIRA, E. M. Esteroides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. **Revista o Mundo da Saúde**, v. 31, n. 4, p. 470-477, 2007.

ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H. O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos—uma epidemia silenciosa. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 9, n. 2, p. 98-105, 2014.

ROGOL, A. D. Drugs of abuse and the adolescent athlete. **Italian journal of pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 1, 2010.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and Seasonal Variation in Human Preovulatory Follicular Fluid Melatonin Concentration. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 71, n. 2, p. 493-496, 1990.

RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 2, p. 117-131, 2010.

SAGOE, D.; MOLDE, H.; ANDREASSEN, C. S.; TORSHEIM, T.; PALLESEN, S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 383-398, 2014.

SANTELLI, G. M. M. Histologia: imagens em foco. 1 ed. Barueri (SP): Manole 2003.

SANTOS, T. Fisiologia do ovário e da Fecundação. **Oliveira CF. Manual de Ginecologia**, v. 1, p. 39-56, 2009.

SEN, A.; PRIZANT, H.; LIGHT, A.; BISWAS, A.; HAYES, E.; LEE, H. J.; BARAD, D.; GLEICHER, N.; HAMMES, S. R. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3008-3013, 2014.

SEN, A.; HAMMES, S. R. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 7, p. 1393-1403, 2010.

SILVA, A. C. J. S.; SILVA, J. C. R.; GOMES, M. K. O.; REIS, R. M. D.; FERRIANI, R. A.; SÁ, M. F. S. Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Femina**, v. 34, n. 7, p. 469-476, 2006.

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-43, 2002.

SILVA, P. R. P.; JUNIOR, L. C. M.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P.; PRESTES, M. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. Arquivos. Brasileiros sobre **Endocrinology Metabolism**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2007.

SIMÃO, R.; CHAVES, C. P. G.; MONTEIRO, L.; NUNES, A. P. L.; MAIOR, A. S. Variações na força muscular de membros superior e inferior nas diferentes fases do ciclo menstrual. **Revista brasileira de Ciência e Movimento**, v. 15, n. 3, p. 47-52, 2007.

SIMÃO, V. A.; BELARDIN, L. B.; LEITE, A. A. G.; CHUFFA, L. G. A., CAMARGO, I. C. C. Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods. **International journal of experimental pathology**, v. 96, n. 5, p. 338-349, 2015.

SIMPSON, E. R.; MISSO, M.; HEWITT, K. N.; HILL, R. A.; BOON, W. C.; JONES, M. E.; KOVACIC, A.; ZHOU, J.; CLYNE, C. D. Estrogen - the good, the bad, and the unexpected. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 322-330, 2005.

SOLAKIDI, S.; PSARRA, A. G.; NIKOLAROPOULOS, S.; SEKERIS, C. E. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. **Human reproduction**, v. 20, n. 12, p. 3481-3487, 2005.

SOUZA, A. O.; NASCIMENTO, A. M.; COLE, E. R. Problemas relacionados ao uso de Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA) por praticantes de musculação e o papel do farmacêutico na educação destes atletas de modo a reduzir o uso indiscriminado. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 3, p. 143-154, 2013.

SOUZA, G. L.; HALLAK, J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. **BJU international**, v. 108, n. 11, p. 1860-1865, 2011.

SPEROFF, L.; BARNHART, K. T.; GONZALEZ, J. The menopause: a signal for the future. **Treatment of the Postmenopausal Woman**. Toronto, ON, Canada: Elsevier Inc, p. 1-13, 2007.

TAKASAKI, A.; NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, n. 4, p. 139-144, 2003.

TAKETANI, T.; TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; LEE, L.; KIZUKA, F.; TAMURA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; SHIMAMURA, K.; SUGINO, N.; REITER, R. J.. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. **Journal of pineal research**, v. 51, n. 2, p. 207-213, 2011.

TAMAYO, C. M.; GONZÁLEZ, A. R.; GARCÉS, J. Z.; VELÁSQUEZ, J. M. A.; GONZÁLEZ, V. Caracterización clínica y epidemiológica de una cohorte de pacientes con hiperplasia adrenal congénita. **Medicina & Laboratorio**, v. 13, n. 09-10, p. 451-460, 2007.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n.1, p. 328-343, 2009.

TAYLOR, A. P.; LEE, H.; WEBB, M. L.; JOFFE, H.; FINKELSTEIN, J. S. Effects of testosterone and estradiol deficiency on vasomotor symptoms in hypogonadal men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 101, n. 9, p. 3479-3486, 2016.

TARUMI, W.; ITOH, M. T.; SUZUKI, N. Effects of 5 α -Dihydrotestosterone and 17 β -Estradiol on the Mouse Ovarian Follicle Development and Oocyte Maturation. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99423, 2014.

TAHTAMOUNI, L. H.; MUSTAFA, N. H.; HASSAN, I. M.; AHMAD, I. M.; YASIN, S. R.; ABDALLA, M. Y. Nandrolone decanoate administration to male rats induces oxidative stress, seminiferous tubules abnormalities, and sperm DNA fragmentation. **JJBS**, v. 3, p. 165-174, 2010.

TEIXEIRA, A. L. D. S.; FERNANDES JÚNIOR, W.; MARQUES, F. A. D.; LACIO, M. L. D.; DIAS, M. R. C. Influência das diferentes fases do ciclo menstrual na flexibilidade de mulheres jovens. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 18, n. 6, p. 361-364, 2012.

THORLINDSSON, T.; HALLDORSSON, V. Sport, and use of anabolic androgenic steroids among Icelandic high school students: a critical test of three perspectives. **Substance abuse treatment, prevention, and policy**, v. 5, n. 1, p. 1, 2010.

TYLICKI, A.; KAWALKO, A.; SOKOLSKA, J.; STRUMILO, S. Effect of anabolic steroid nandrolone decanoate on the properties of certain enzymes in the heart, liver, and muscle of rats, and their effect on rats' cardiac electrophysiology. **Hormone and metabolic research**, v. 39, n. 04, p. 268-272, 2007.

VERAS, A. B.; NARDI, A. E. J. Hormônios sexuais femininos e transtornos do humor. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 54, n. 1, p. 57-68, 2005.

VENÂNCIO, D. P.; NÓBREGA, A. C. L. D.; TUFIK, S.; MELLO, M. T. D. Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2010.

VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v. 39, n. 3, 2011.

VOLLBRACHT, C.; SCHNEIDER, B.; LEENDERT, V.; WEISS, G.; AUERBACH, L.; BEUTH, J. Intravenous vitamin C administration improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. **In vivo**, v. 25, n. 6, p. 983-990, 2011.

WAGNER, M.; ZOLLNER, G.; TRAUNER, M. Nuclear receptors in liver disease. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1023-1034, 2011.

WANG, P. H.; CHANG, C. Androgens and ovarian cancers. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 392, p. 2936, 2004.

WEINECK J. **Biologia do esporte**. 7 ed. São Paulo: Manole; 2005.

WOLFF, R. B.; VERNA, C.; MAIORAL, G. C. C. C.; SIMOES, R. S.; BARACAT, E. C. Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. **Revista da Associação médica brasileira**, v. 58, n. 4, p. 493-497, 2012.

WOO, M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. S.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789-4797, 2001.

WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. To β or not to β : estrogen receptors and ovarian function. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3244-3246, 2005.

CAPÍTULO I

*Avaliação do ciclo estral e tecido ovariano de ratas androgenizadas
tratadas com melatonina*

Bianca Ribeiro de Souza, Vinícius Augusto Simão, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
e Isabel Cristina Cherici Camargo

Manuscrito elaborado para submissão ao periódico *Reproductive Toxicology* ISSN
0890-6238. Fator de impacto: 2.850.

Obs: as figuras apresentam os símbolos abreviados para a escrita em inglês.

**Avaliação do ciclo estral e tecido ovariano de ratas androgenizadas tratadas
com melatonina**

Bianca Ribeiro de Souza¹, Vinícius Augusto Simão¹, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa² &
Isabel Cristina Cherici Camargo^{1*}

¹*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Biotecnologia. Assis, SP, Brasil.*

²*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Anatomia. Botucatu, SP, Brasil.*

*Endereço para correspondência: Isabel Cristina Cherici Camargo, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Biotecnologia. 19806-900, Assis, SP, Brasil.

Tel.: +55 18-3302 5852; Fax: +55 18-3302 5849.

E-mail: camargo@assis.unesp.br

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito da melatonina nos ovários de ratas androgenizadas. Os animais receberam óleo mineral (Controle), decanoato de nandrolona (7,5 mg/kg; 15 dias) e o tratamento com melatonina (10 mg/kg; 7 dias) isoladamente, previamente ou concomitantemente ao esteroide. Nas ratas androgenizadas, a melatonina recuperou o peso e o tecido ovariano, mas não restabeleceu o ciclo estral e o peso uterino. O tratamento com melatonina recuperou o número e área dos corpos lúteos nos ovários androgenizados e apenas o tratamento prévio restabeleceu a quantidade de folículos saudáveis e atresícos. A melatonina promoveu uma fraca expressão do ER α e ER β nos folículos ovarianos das ratas androgenizadas e o tratamento prévio inibiu o aumento na expressão do AR induzido pelo esteroide nos folículos atresícos e corpos lúteos. Em conclusão, a melatonina apresentou efeito benéfico nos ovários androgenizados através da recuperação da foliculogênese e da luteogênese, sendo o tratamento prévio mais eficaz.

Palavras chave: *melatonina; ovários; decanoato de nandrolona; AR; ER α ; ER β .*

1. INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são fármacos sintéticos baseados na estrutura molecular da testosterona, prescritos clinicamente para a reposição hormonal pós-menopausa e tratamento de diversas doenças tais como hipogonadismo, câncer de mama, angioedema hereditário, endometriose e insuficiência respiratória ou cardíaca [1-10]. Os riscos à saúde relacionados ao uso dos EAA decorrem mesmo quando em dosagens terapêuticas [9, 11-13]. Em mulheres, os efeitos adversos incluem a masculinização e distúrbios no ciclo sexual [14, 15], as quais podem ocorrer mesmo em baixas dosagens [16, 17]. Em roedores, o tratamento com esteroides sintéticos suprimiu a capacidade reprodutiva das fêmeas devido às alterações histopatológicas ocorridas nos ovários [18-21].

O decanoato de nandrolona (DN) é um dos EAA mais utilizados no mundo [1, 13, 22] na qual sua ação ocorre via receptores de andrógenos (AR), que regulam os mecanismos intracelulares responsáveis pelos efeitos anabólicos e androgênicos [3, 23]. Quando aromatizados, os EAA incluindo a nandrolona são convertidos em estrogênios via enzima citocromo P450 aromatase e exercem suas atividades através dos receptores de estrogênio ER α e ER β [12, 24]. Em ratas, o tratamento com DN promoveu aciclicidade estral, redução no peso ovariano devido à condição atrofica, redução no número de folículos saudáveis e no número e área de corpos lúteos e houve aumento na incidência de atresia folicular [20, 25-28].

Atualmente, vários estudos têm concentrado sua atenção no uso de drogas com a capacidade de reduzir ou suprimir os efeitos colaterais promovidos por agentes toxicantes. Nesse contexto, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), neurohormônio secretado pela glândula pineal durante a fase de escuro, tem se destacado devido às suas propriedades antioxidantes e profiláticas em diferentes sistemas, com aplicação experimental terapêutica em diversas condições [29, 30]. As ações da melatonina podem ocorrer via receptores de membrana (MT1 e MT2) ou nucleares, as quais influenciam os ritmos diários e sazonais de

processos fisiológicos e comportamentais, ou atua como sequestradora de radicais livres [31-33].

Em mamíferos, a melatonina pode regular a função reprodutiva feminina através do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas [31]. Além disso, a melatonina é encontrada no fluído dos folículos ovarianos e apresenta uma ação direta nas funções da gônada [34], relacionada aos processos de diferenciação celular e esteroidogênese [35, 36]. Estudo prévio mostrou que a melatonina apresenta capacidade protetora contra o estresse oxidativo em células da granulosa e contribui para a luteinização e produção de progesterona [37].

O tratamento com doses exógenas de melatonina modula a função reprodutiva, que induz a uma regulação diferencial de receptores de andrógenos (AR), estrógenos (ER α e ER β) e progesterona (PRA e PRB) nos ovários e útero, e protege o tecido ovariano contra a peroxidação lipídica durante a ovulação em modelos animais [35, 38, 39] e humanos [40]. A eficácia terapêutica da melatonina foi comprovada na redução do crescimento tumoral, proliferação celular e inibição da angiogênese em modelos de carcinoma de mama e ovário [41, 42]. A melatonina também previne e regride determinadas condições patológicas tais como, a endometriose, síndrome de ovários policísticos e falência ovariana prematura devido à exposição à quimioterapia ou radioterapia [36, 43-46].

O efeito protetor da melatonina foi previamente relatado nos ovários de ratas tratadas com nicotina [30], no útero e oviduto de camundongas expostas à nicotina [47] e nos folículos ovarianos submetidos à radiação [48]. Considerando-se que o DN compromete a capacidade reprodutiva e promove efeitos colaterais no tecido ovariano, e que são ausentes os relatos sobre o possível efeito protetor da melatonina em ovários androgenizados, o presente estudo avaliou qualitativamente e quantitativamente o tecido da gônada, a imunolocalização dos receptores de esteroides sexuais (AR, ER α e ER β) no órgão e o ciclo estral de ratas androgenizadas experimentalmente com DN e submetidas ao tratamento com melatonina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Quarenta ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com 12 semanas de idade e peso médio de 260 g, foram obtidas da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Botucatu, SP, Brasil) e mantidas no Biotério Central da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP - Assis, SP, Brasil). As fêmeas foram alojadas em caixas de polipropileno (45cm x 30cm x 15cm, 4 animais por caixa) forradas com aparas de pinheiro e mantidas em condições adequadas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, 200 lux). Água e dieta comercial (Nuvilab[®], Colombo, PR, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências e Letras (Número de permissão: 005/2014).

2.2. Fármacos

Foi utilizado o esteroide sintético decanoato de nandrolona (17 β -hidroxi-19-nor-4-androsteno-3-ona), comercializado pelo Laboratório Schering-Plough (Deca-DurabolinTM, São Paulo, Brasil). A droga é uma solução injetável oleosa que contém 50 mg do esteroide [49].

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi adquirida do Laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), a qual se apresenta na forma de pó de coloração branca. O conteúdo foi dissolvido em 0,1 mL de etanol 95% e diluído em 0,3 mL de NaCl a 0,9% (veículo), até a concentração final de 25 mg/mL [50].

2.3. Procedimento experimental

As ratas com ciclo estral regular foram pesadas e divididas aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n = 8/grupo; Figura 1): a) Controle (C), tratado com injeção de 0,1 mL

de óleo mineral (veículo) durante 15 dias consecutivos por via subcutânea (s.c.); b) grupo tratado com DN na dose de 7,5 mg/kg de peso corpóreo (p.c.), em dose única diária diluída em veículo, subcutaneamente, durante 15 dias consecutivos; c) grupo tratado com injeção s.c. de óleo mineral durante oito dias, seguida por injeção intraperitoneal (i.p.) de melatonina (MLT) na dose de 10 mg/kg p.c., durante os últimos sete dias do período experimental; d) grupo tratado com DN, via s.c., durante quinze dias consecutivos, e co-administração de MLT, via i.p., nos últimos sete dias do tratamento esteroidal (DN/MLT); e) grupo tratado previamente com MLT, via i.p., durante sete dias consecutivos, seguido pelo tratamento com DN, via s.c., durante 15 dias consecutivos (MLT/DN). As injeções de óleo mineral e DN foram administradas no mesmo intervalo de tempo (12h30min-13h00min), e o tratamento com MLT foi realizado no início da fase de escuro entre 18h30min e 19h00min.

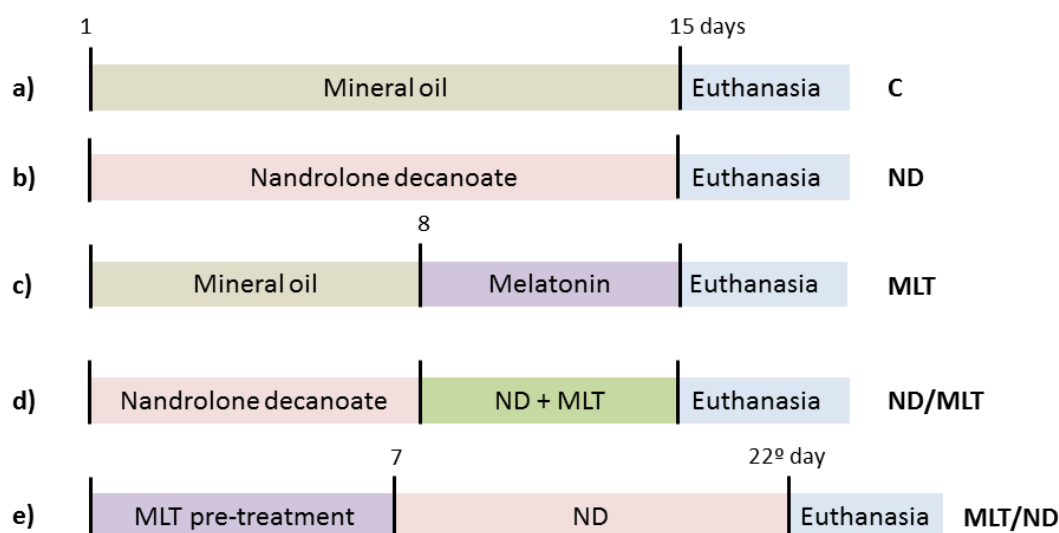


Figura 1. Esquema cronológico dos tratamentos nos diferentes grupos experimentais. a) Controle (C), tratado com óleo mineral durante 15 dias; b) tratado com decanoato de nandrolona durante 15 dias (ND); c) tratado com óleo mineral por oito dias e com melatonina durante os últimos sete dias do tratamento experimental (MLT); d) tratado com decanoato de nandrolona por 15 dias e com melatonina nos últimos sete dias do tratamento esteroidal (ND/MLT); e) tratado previamente com melatonina durante sete dias seguidos pelo tratamento esteroidal de 15 dias (MLT/ND).

2.4. Seleção das dosagens

A dose suprafisiológica de 7,5 mg DN/kg foi selecionada com base em estudos prévios em animais [21, 51], a qual simula as condições geralmente empregadas por usuários não terapêuticos de EAA (variando de 250 a 3200 mg/semana) [4, 52]. O protocolo experimental adotado para a escolha da dose de 10 mg MLT/kg baseou-se nos estudos de Baykara et al. [53] e Chabra et al. [54].

2.5. Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral foi monitorado diariamente por exame citológico do material obtido por meio da técnica de lavado vaginal [55]. O horário de coleta foi fixado às 12h00min. As lâminas contendo as células descamadas do epitélio vaginal foram analisadas sob um microscópio de luz (Olympus CX31 RBSFA, Tóquio, Japão) e as fases do ciclo estral foram identificadas segundo o critério descrito por Goldman et al. [56].

2.6. Preparação do tecido para análise histopatológica e imuno-histoquímica

Após o período experimental, as ratas foram pesadas e sacrificadas por saturação anestésica em CO₂ seguida por decapitação. Os ovários foram coletados e pesados, e os pesos relativos foram obtidos (peso do órgão/peso corporal X 100, expresso como g/100 g de peso corporal). Os ovários foram fixados em formalina tamponada a 10% (0,2 M NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 0,2 M, 37% de formaldeído LABIMPEX Ltda., Diadema, SP, Brasil, pH 7,2) por 24 h. Em seguida, o tecido foi desidratado em soluções de etanol e clarificado em xilol para inclusão em parafina (Paraplast Labware-Oxford, St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram cortados em secções de 4 µm de espessura em um micrótomo RM2125 LEICA (Alemanha). De cada animal, foram obtidas quatro secções ovarianas coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), as quais foram destinadas à análise histopatológica em

microscopia de luz. Para a identificação dos tipos foliculares foi utilizada a classificação proposta por Pedersen & Peters [57].

Para a análise imuno-histoquímica, secções ovarianas foram ao micro-ondas (700-800W), imersas em tampão citrato de sódio 0,01 M (pH 6,0) para a recuperação de antígeno. Depois do bloqueio da atividade da peroxidase endógena, o tecido foi incubado com 3% de albumina de soro bovino (BSA, 3%) durante 1 h para evitar a ligação não específica. Na sequência, as secções foram incubadas em uma câmara úmida durante a noite à 4°C com o anticorpo primário do receptor de andrógeno (AR) (diluição 1: 100, NB300-551, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), anti-receptor de estrogênio alfa (ER- α) (diluição 1: 100, NB110-56961, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) e anti-receptor de estrogênio beta (ER- β) (1 ug de diluição/ml, NB120-3577, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA).

Após as reações, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, cloreto de sódio, cloreto de potássio, di-hidrogênio fosfato, e fosfato de hidrogênio dissódico) e incubadas com o anticorpo secundário (Polímero Anti-Mouse IgG ou anti-Rabbit - DAKO[®] CYT) em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, as lâminas foram colocadas para reagir com o cromógeno diaminobenzidina (DAB; Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 5 minutos e posteriormente as secções foram contrastadas com hematoxilina. Os controles negativos foram realizados omitindo o anticorpo primário.

Os resultados das imunomarcações foram analisados sob um microscópio Zeiss Axio Scope-A1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), usando-se os seguintes critérios de intensidade de coloração: ausente (-), fraca (+), moderada (++) e forte (+++).

A captura das imagens foi realizada em um microscópio de luz (Axio Scope A1 acoplado a uma vídeo-câmera AxioCam ICc3), as quais foram digitalizadas pelo software Axio Vision, versão 4.7.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

2.7. *Análise morfométrica*

Nas secções ovarianas coradas em HE (4 secções/rata/grupo), os folículos saudáveis, folículos atrésicos e corpos lúteos foram quantificados. Para a identificação e classificação dos folículos saudáveis, utilizou-se o critério descrito por Hirshfield [58], como segue: Classe I (pequenos folículos pré-antrais com diâmetro menor que 90 μm); Classe II (grandes folículos pré-antrais com diâmetro entre 91-260 μm); Classe III (pequenos folículos antrais com diâmetro entre 261-350 μm); Classe IV (folículos antrais de tamanho médio; 351-430 μm); Classe V (grandes folículos antrais com diâmetro entre 431-490 μm); Classe VI (folículos maduros ou Graafianos com diâmetro maior que 491 μm).

O critério para a identificação dos folículos atrésicos baseou-se no grau de degeneração dos folículos antrais, de acordo com a classificação descrita por Osman [59], que considera: encolhimento da camada granulosa e alterações degenerativas (Estágio IA); degeneração da camada granulosa e presença de fragmentos nucleares na periferia do antro (Estágio IB); oócito degenerado circundado por um envelope de células do *cumulus* ou seus remanescentes (Estágio IIA); e, oócito no antro, com a camada granulosa geralmente constituída por um delgado revestimento e presença usual de macrófagos no antro (Estágio IIB).

Os corpos lúteos foram quantificados e sua área foi obtida. As mensurações do diâmetro dos folículos saudáveis e da área dos corpos lúteos foram obtidas por meio do microscópio Zeiss A1-Axio, acoplado a uma vídeo-câmera AxioCam ICc3. As imagens foram digitalizadas através do software Axio Vision, versão 4.7.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

2.8. *Análise estatística*

Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey quando apresentaram normalidade, e foram expressos como a média $\pm$

desvio padrão. Na ausência de normalidade foi realizado o teste de variância não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls e os resultados foram expressos como a mediana $\pm$ desvio interquartilico. A significância estatística foi dada para $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. *Ciclo estral e peso dos órgãos reprodutivos*

Os grupos DN, DN/MLT e MLT/DN apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de dias na fase de diestro do ciclo, em comparação ao grupo controle e grupo tratado apenas com a melatonina (Figura 2a). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos que receberam DN. O grupo MLT apresentou ciclicidade estral, com número de dias em diestro similar ($p > 0,05$) ao grupo controle.

Devido à persistência da fase de diestro nas ratas dos grupos androgenizados, todas as fêmeas foram sacrificadas nesta mesma fase do ciclo, inclusive aquelas dos grupos controle e tratado com melatonina.

O peso relativo dos ovários foi significativamente reduzido apenas no grupo tratado com DN (Figura 2b). Os grupos MLT, DN/MLT e MLT/DN não diferiram ($p > 0,05$) entre si e do grupo controle.

Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso uterino dos grupos DN, DN/MLT e MLT/DN, em comparação aos grupos C e MLT (Figura 2c). O grupo tratado somente com melatonina apresentou peso uterino similar ($p > 0,05$) ao grupo controle.

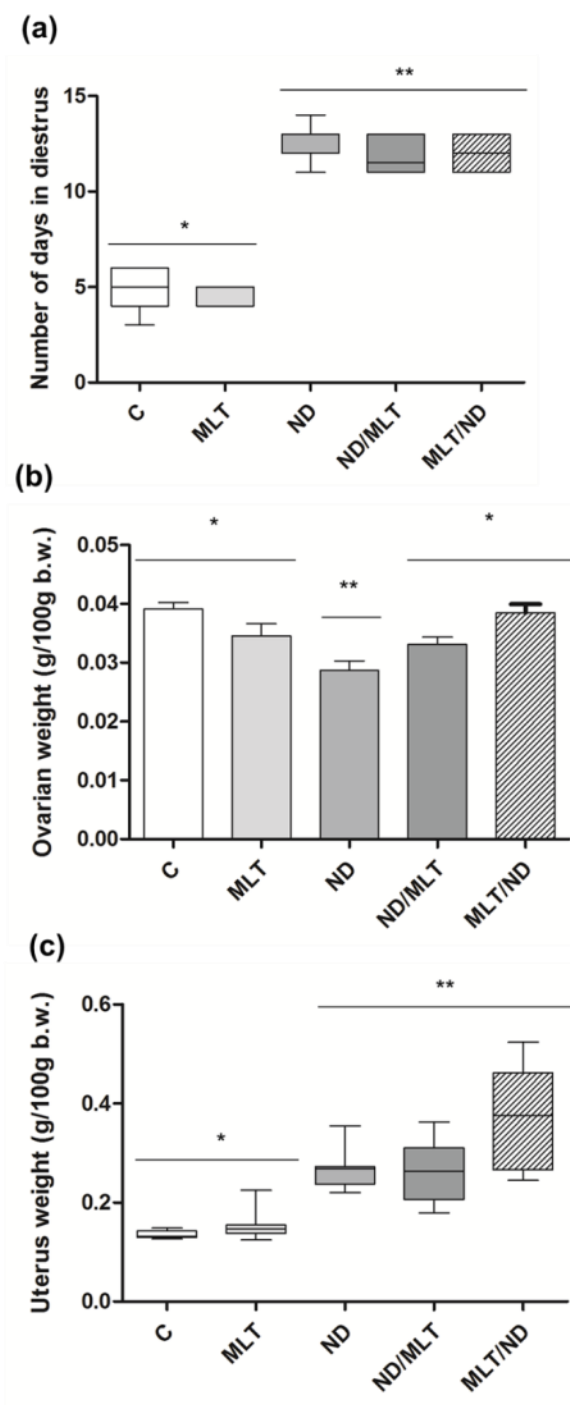


Figura 2. a) Número de dias em diestro nas fêmeas dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como a mediana $\pm$ desvio interquartílico; Kruskal-Wallis, teste de Student-Newman-Keuls. **b)** Peso relativo dos ovários das ratas dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como a média $\pm$ desvio padrão; ANOVA, teste de Tukey. **c)** Peso relativo do útero das ratas dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como a mediana $\pm$ desvio interquartílico; Kruskal-Wallis, teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Grupos: C (Controle), MLT (tratado com melatonina), DN (tratado com decanoato de nandrolona), DN/MLT (tratado com esteroide e melatonina) e MLT/DN (tratado previamente com melatonina e posteriormente com o esteroide).

3.2. *Análise histológica ovariana*

Os animais em diestro dos grupos controle (Figura 3A) e tratado com melatonina (Figura 3B), apresentaram o mesmo padrão morfológico ovariano, caracterizado por um córtex com presença de vários folículos em diferentes estágios de maturação e corpos lúteos bem desenvolvidos. As células luteínicas apresentaram núcleo arredondado, nucléolo evidente e citoplasma abundante e acidófilo. A medula ovariana, constituída de tecido conjuntivo predominantemente frouxo, apresentou rica vascularização.

No grupo tratado com DN (Figuras 3C, D), houve alterações histopatológicas ovarianas, caracterizadas pela intensa atresia folicular, escassez de corpos lúteos e folículos em maturação, e presença de cistos foliculares. Estes apresentam tamanho superior aos folículos pré-ovulatórios e são circundados por uma delgada camada de células achatadas que repousam sobre uma cápsula fibrosa. Os corpos lúteos mostraram-se pouco desenvolvidos e com aspecto fibroso na área central. Observou-se também que no grupo DN, houve atrofia ovariana e presença de vasos sanguíneos dilatados e congestos na região medular.

No grupo DN/MLT (Figuras 3E, F), observou-se um aspecto histológico ovariano distinto daquele das fêmeas tratadas somente com o esteroide, visto que os corpos lúteos mostraram aspecto bem desenvolvido e vascularizado, similarmente aos grupos controle e tratado com melatonina. No entanto, a presença de folículos em diferentes estágios de degeneração foi marcante, assim como, ocasionalmente foram observados cistos foliculares. Além disso, capilares sanguíneos dilatados foram observados na medula e córtex.

Os ovários do grupo MLT/DN (Figuras 3G, H) exibiram corpos lúteos bem desenvolvidos, com rica vascularização, e folículos saudáveis em diversos estágios de maturação. Morfologicamente o tecido gonadal apresentou aspecto semelhante ao grupo controle, com ausência de folículos císticos e vasodilatação medular nos ovários das fêmeas do grupo MLT/DN.

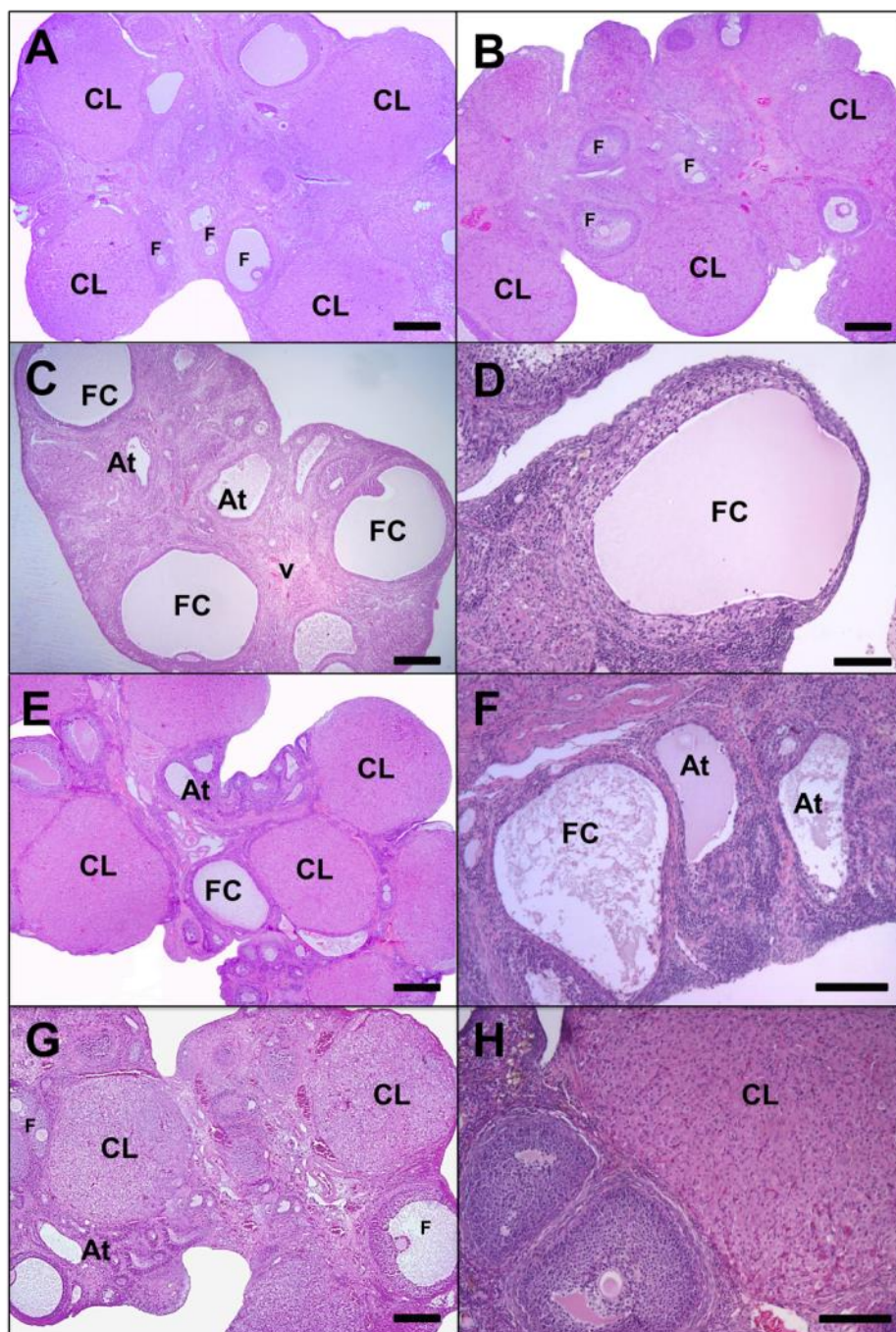


Figura 3. Fotomicrografias dos ovários das ratas nos diferentes grupos experimentais: Controle (A); tratado com melatonina (B); tratado com decanoato de nandrolona (C, D); tratado com o esteroide e melatonina (E, F); e tratado previamente com melatonina e posteriormente com o esteroide (G, H). Em A e B, observar o aspecto morfológico similar, com vários corpos lúteos (CL) e folículos (F) em diversos estágios de maturação. Em C, note a atrofia gonadal, a escassez de corpos lúteos, a marcante atresia folicular (At), e a vasodilatação (v) medular. Detalhe de um cisto folicular (FC) é mostrado em D. No grupo DN/MLT (E, F), são exibidos corpos lúteos (CL), folículos atrésicos (At) e cistos foliculares (FC). No grupo MLT/DN (G, H), observe o aspecto saudável dos corpos lúteos (CL) e a presença de folículos em maturação (F) e degeneração (At). Hematoxilina-eosina. Barras = 600 µm (A-C, E, G) e 100 µm (D, F, H).

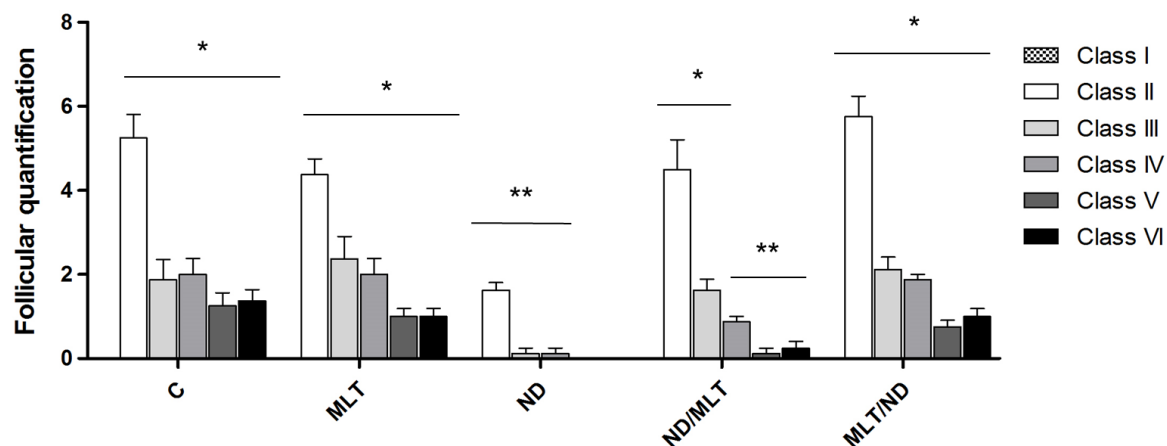
3.3. *Quantificação de folículos saudáveis, atrésicos e corpos lúteos*

A Figura 4a mostra a quantificação dos folículos saudáveis nas diferentes classes de maturação, em cada grupo experimental. No grupo DN, a frequência de folículos das classes II, III e IV foi reduzida ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle e grupos MLT e MLT/DN, e os folículos em estágios mais avançados de maturação (classes V e VI) foram ausentes. O grupo DN/MLT apresentou menor ($p < 0,05$) número de folículos das classes IV, V e VI, em comparação com os grupos controle, MLT e MLT/DN, enquanto que para as classes II e III o resultado foi similar ($p > 0,05$). No entanto, o tratamento prévio com melatonina (grupo MLT/DN) exibiu uma frequência folicular equivalente ($p > 0,05$) ao grupo controle, em todos os estágios de maturação. O grupo tratado somente com melatonina apresentou resultado semelhante ($p > 0,05$) ao grupo controle na quantificação de folículos saudáveis nas diferentes classes.

Na avaliação dos folículos atrésicos (Figura 4b), verificou-se que entre os estágios de degeneração considerados, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas na quantificação dos folículos que apresentaram o grau mais avançado de atresia (estágio IIB). Neste caso, os grupos DN e DN/MLT apresentaram significativamente maior número de folículos atrésicos no estágio IIB que os demais grupos experimentais.

O número e a área dos corpos lúteos foram significativamente reduzidos ($p < 0,05$) no grupo tratado apenas com DN, em comparação aos demais grupos experimentais (Tabela 1). A introdução da melatonina previamente ou concomitante ao tratamento esteroideal (grupos DN/MLT e MLT/DN) resultou na restauração do número e área dos corpos lúteos similarmente aos grupos C e MLT.

(a)



(b)

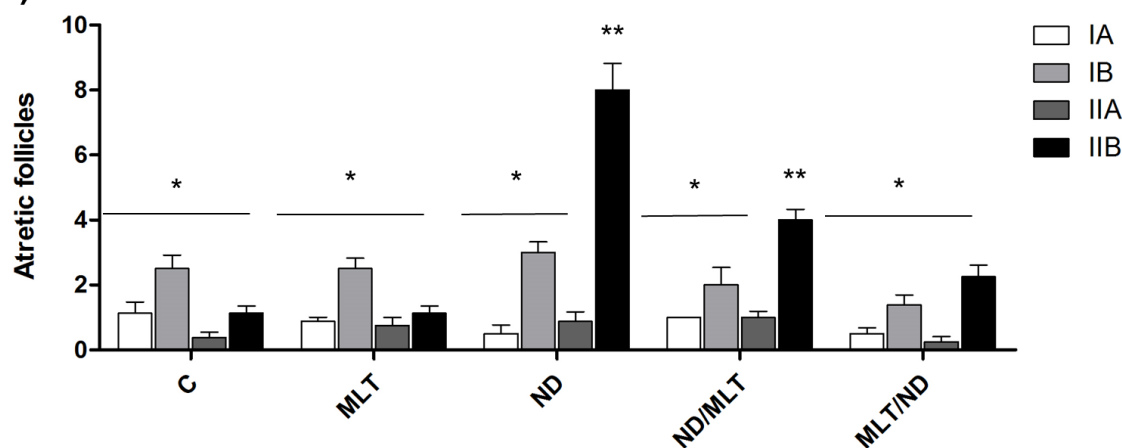


Figura 4. a) Quantificação folicular ovariana nas diferentes classes de maturação, e nos diferentes grupos experimentais. **b)** Quantificação de folículos atresícos nos diferentes estágios de degeneração, e nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como a mediana $\pm$ desvio interquartilico. Kruskal-Wallis, teste de Student-Newman-Keuls ($n=4$ secções/ovário/fêmea/grupo). Símbolos diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$). Grupos: C (Controle), MLT (tratado com melatonina), DN (tratado com decanoato de nandrolona), DN/MLT (tratado com esteroide e melatonina) e MLT/DN (tratado previamente com melatonina e posteriormente com o esteroide).

Tabela 1. Número e área (mm²) dos corpos lúteos nos ovários dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos Experimentais (n=8/grupo)	Parâmetros	
	Número de corpos lúteos	Área dos corpos lúteos
C	4,9 ± 1,1 a	684,1 ± 2251,5 a
MLT	5,3 ± 2,0 a	410,0 ± 811,5 a
DN	1,9 ± 1,2 b	166,6 ± 500,9 b
DN/MLT	4,0 ± 2,3 a	456,7 ± 283,3 a
MLT/DN	5,8 ± 2,3 a	552,5 ± 225,6 a

Valores expressos como a média ± desvio padrão. ANOVA, teste de Tukey (n=4 secções/ovário/fêmea/grupo). Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p<0,05). Grupos: C (Controle), MLT (tratado com melatonina), DN (tratado com decanoato de nandrolona), DN/MLT (tratado com esteroide e melatonina) e MLT/DN (tratado previamente com melatonina e posteriormente com o esteroide).

3.4. *Imunohistoquímica*

A imunolocalização dos receptores sexuais ovarianos AR, ER α e ER β é apresentada na Tabela 2 e Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. A marcação do AR nos grupos Controle (Figura 5A) e MLT/DN (Figura 5E) foi moderada nas células da camada granulosa, células tecaais e oócitos dos folículos saudáveis em todos os estágios de maturação (primários, em crescimento e antrais), além de folículos atresícos e nas células luteínicas. No grupo tratado com melatonina (Figuras 5B, F), os folículos em crescimento, antrais e atresícos apresentaram marcação de intensidade baixa nas células granulosas e tecaais enquanto nos grupos DN (Figuras 5C, G) e DN/MLT (Figuras 5D, H), a marcação foi forte nas células granulosas dos folículos atresícos. Nos corpos lúteos, as células luteínicas dos grupos que receberam melatonina (MLT; Figura 5I), DN/MLT (Figura 5J) e MLT/DN (Figura 5K), exibiram marcação de alta intensidade. Em relação às demais estruturas, em todos os grupos

experimentais o tecido intersticial, o epitélio germinativo e a túnica albugínea apresentaram moderada, alta e fraca intensidade de marcação para o AR, respectivamente.

As células granulosas e oócitos de folículos saudáveis e atresícos, corpos lúteos e tecido intersticial apresentaram moderada marcação para ER α nos grupos Controle (Figuras 6A, F) e tratado com o DN (Figuras 6C, G). Nos grupos MLT (Figuras 6B, I), DN/MLT (Figuras 6D, J) e MLT/DN (Figuras 6E, K), houve fraca intensidade de coloração nas células da camada granulosa dos folículos saudáveis nos diferentes estágios de maturação (primários, em crescimento e antrais) e nos folículos atresícos, porém a marcação moderada nos corpos lúteos foi mantida. Os cistos foliculares (Figuras 5C, H) encontrados nos grupos DN e DN/MLT apresentaram moderada marcação nas células granulosas. O epitélio germinativo exibiu marcação de alta intensidade em todos os grupos experimentais enquanto na túnica albugínea houve ausência de imunorreação para ER α .

Em relação à imunolocalização do ER β , no grupo controle (Figura 7A, F) as células granulosas, tecais e os oócitos dos folículos saudáveis e atresícos apresentaram moderada marcação enquanto os corpos lúteos tiveram forte marcação. No grupo tratado com melatonina (Figura 7B, G), os folículos saudáveis em diferentes estágios de maturação e os folículos atresícos exibiram marcação de fraca intensidade para o ER β nas células granulosas, assim como nos grupos DN/MLT (Figura 7D, H) e MLT/DN (Figura 7E, I). O grupo DN (Figura 7C) manteve a expressão de moderada intensidade nas células granulosas dos folículos saudáveis e atresícos. No entanto, as células luteínicas dos escassos corpos lúteos (Figura 7K) apresentaram imunorreação de fraca intensidade. Exceto a túnica albugínea, a qual foi ausente de marcação, o epitélio germinativo e os cistos foliculares apresentaram marcação de intensidade moderada para ER β em todos os grupos experimentais.

Tabela 2. Intensidade de marcação dos receptores AR, ER α e ER β nas estruturas ovarianas dos animais nos diferentes grupos experimentais.

Estruturas ovarianas	Grupos Experimentais (n=8/grupo)				
	C	MLT	DN	DN/MLT	MLT/DN
AR					
Epitélio germinativo	+++	+++	+++	+++	+++
Túnica albugínea	+	+	+	+	+
Folículo primário	++	++	++	++	++
Folículo em crescimento	++	+	++	++	++
Folículo antral	++	+	++	++	++
Folículo atresico	++	+	+++	+++	++
Corpo Lúteo	++	+++	+++	+++	++
Oócito	++	++	++	++	++
Tecido intersticial	++	++	++	++	++
Cisto folicular	*	*	++	++	*
ERα					
Epitélio germinativo	+++	+++	+++	+++	+++
Túnica albugínea	—	—	—	—	—
Folículo primário	++	+	++	+	+
Folículo em crescimento	++	+	++	+	+
Folículo antral	++	+	++	+	+
Folículo atresico	++	+	++	+	+
Corpo Lúteo	++	++	++	++	++
Oócito	++	++	++	++	++
Tecido intersticial	++	+	++	++	++
Cisto folicular	*	*	++	++	*
ERβ					
Epitélio germinativo	+++	+++	+++	+++	+++
Túnica albugínea	—	—	—	—	—
Folículo primário	++	+	++/+	++	++
Folículo em crescimento	++	+	++/+	+	+
Folículo antral	++	+	++/+	+	+
Folículo atresico	++	+	++	+	+
Corpo Lúteo	+++	+++	++	+++	+++
Oócito	++	+	++	++	++
Tecido intersticial	++	++	++	++	++
Cisto folicular	*	*	++	++	*

Reações foram classificadas como forte (+++), moderada (++), fraca (+) e ausente (—).

++/+ Variação na intensidade de imunomarcacão dentro do grupo. * Estrutura ausente nos ovários.

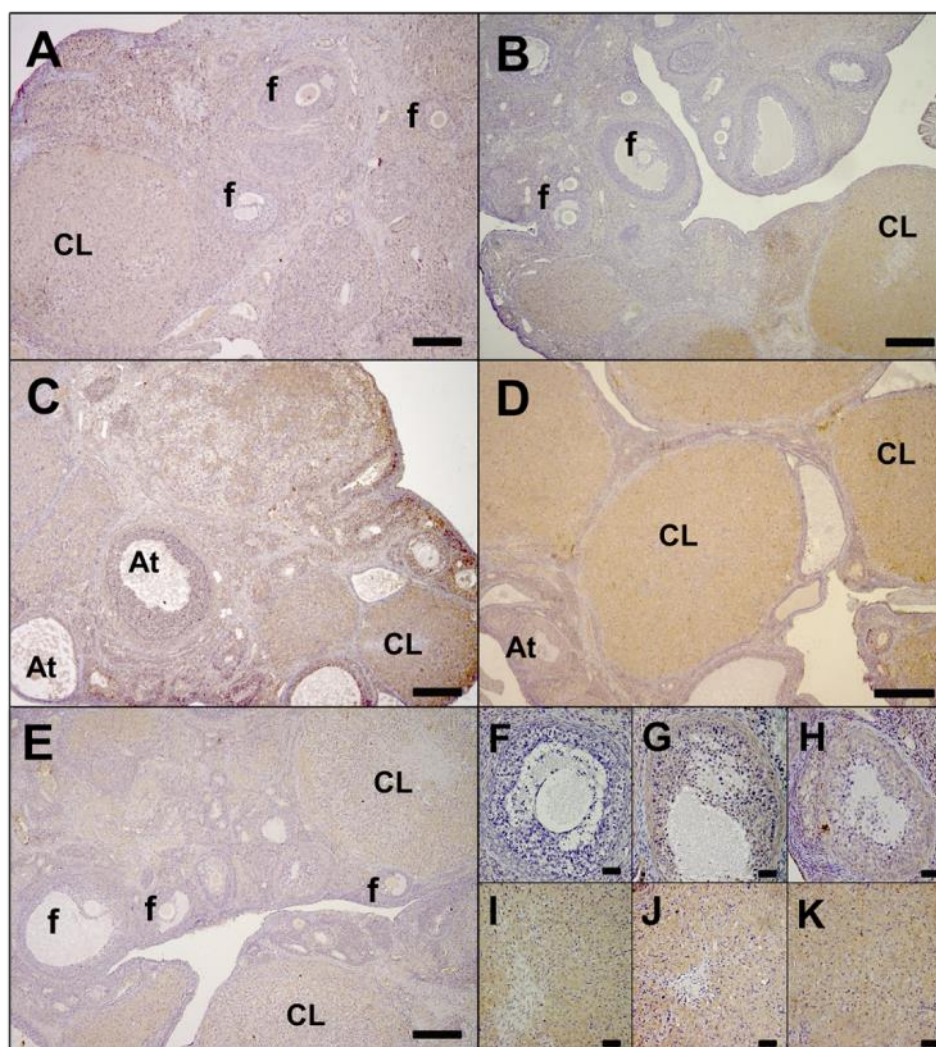


Figura 5. Localização imunohistoquímica do receptor AR nos ovários das ratas nos diferentes grupos experimentais. A imunoreatividade para o AR no grupo Controle (A) foi de intensidade moderada nos folículos saudáveis (f) e corpos lúteos (CL). No grupo MLT (B), os folículos (f) e corpos lúteos (CL) apresentaram fraca e forte marcação, respectivamente. Em C, os folículos atrésicos (At) e os corpos lúteos (CL) do grupo DN apresentaram forte marcação. No grupo DN/MLT (D), a marcação dos corpos lúteos (CL) e dos folículos atrésicos (At) foi forte enquanto em MLT /DN (E), foi moderada nos folículos (f) e corpos lúteos (CL). Em F, folículo atrésico com fraca marcação no grupo MLT, enquanto nos grupos DN (G) e DN/MLT (H) os folículos atrésicos foram fortemente marcados. Em I, J e K, células luteínicas dos grupos MLT, DN e DN/MLT, respectivamente com forte marcação para o AR. Barras = 200 μ m (A-E) e 50 μ m (F-K).

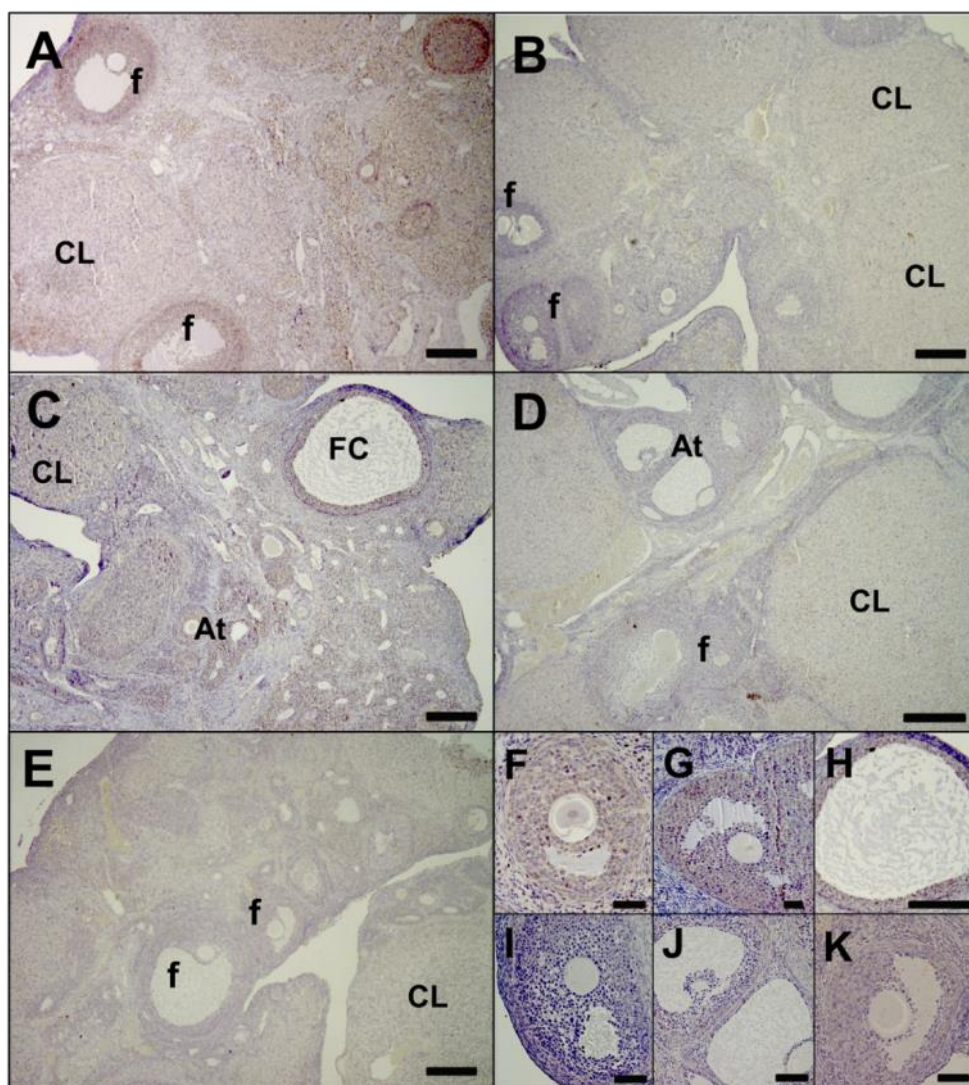


Figura 6. Localização imunohistoquímica do receptor ER α nos ovários das ratas nos diferentes grupos experimentais. A marcação para ER α no grupo Controle (A) foi moderada nos folículos saudáveis (f) e corpos lúteos (CL). No grupo MLT (B), os corpos lúteos (CL) mantiveram a marcação moderada enquanto nos folículos houve fraca marcação. Em C (grupo DN), observar a marcação moderada nos folículos atrésicos (At), corpos lúteos (CL) e cistos foliculares (FC). Nos grupos DN/MLT (D) e MLT/DN (E), os folículos (f) exibiram fraca marcação e os corpos lúteos (CL), moderada. Em F e G, é destacada a marcação moderada nos folículos antrais dos grupos Controle e DN, respectivamente, enquanto nos folículos antrais dos grupos MLT (I), DN/MLT (J) e MLT/DN (K), a marcação foi fraca. Em H, detalhe de cisto folicular no grupo DN com marcação moderada para o ER α . Barras = 200 μ m (A-E, H) e 50 μ m (F, G, I-K).

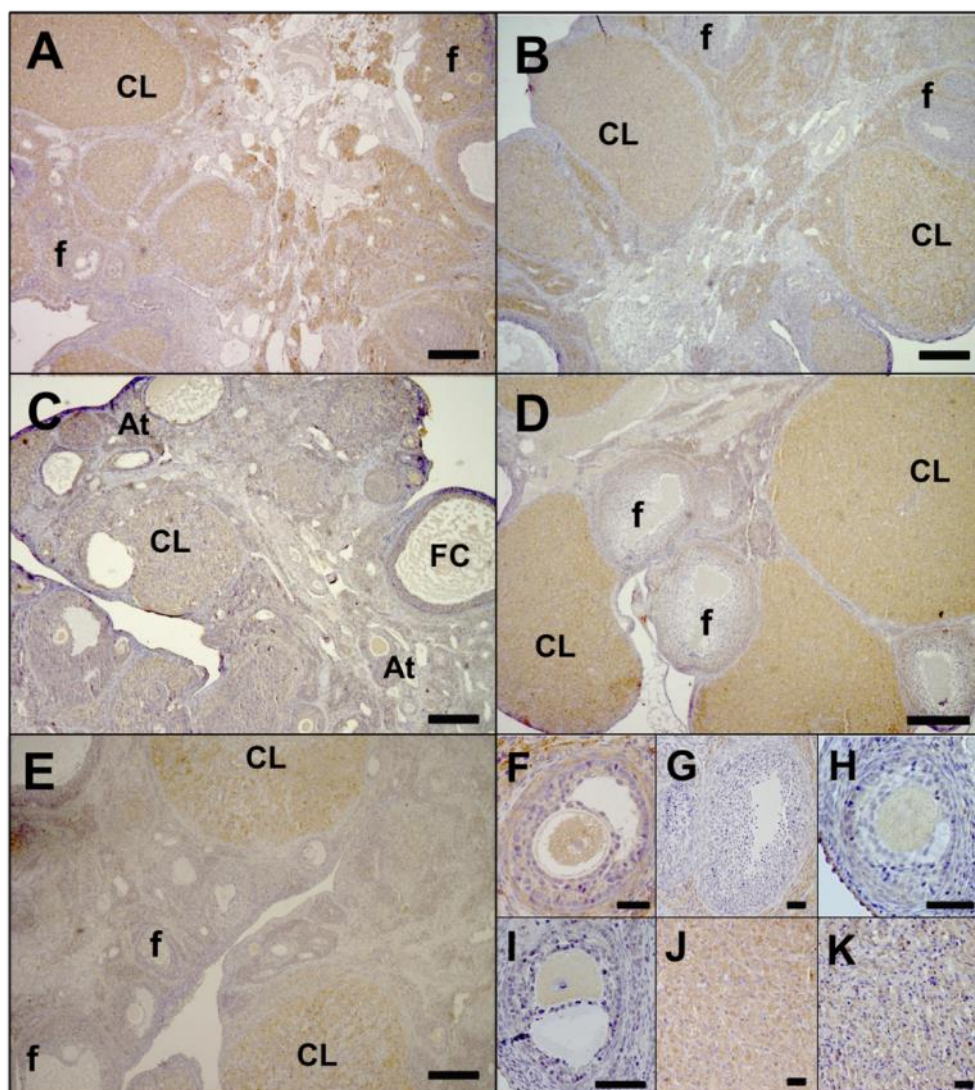


Figura 7. Localização imunohistoquímica do receptor ER β nos ovários das ratas nos diferentes grupos experimentais. Em A, notar a marcação moderada nos folículos saudáveis (f) e forte nos corpos lúteos (CL) do grupo Controle. No grupo MLT (B), os folículos (f) exibiram fraca marcação enquanto os corpos lúteos (CL) permaneceram com forte marcação. Em C, observar a marcação moderada nos corpos lúteos (CL), nos folículos atresícos (At) e cistos foliculares (FC) do grupo DN. Nos grupos DN/MLT (D) e MLT/DN (E), os corpos lúteos (CL) mantiveram a forte marcação, porém os folículos (f) foram fracamente marcados. Em F, é mostrada a marcação moderada no folículo antral do grupo Controle, comparativamente com folículos antrais dos grupos MLT (G), DN/MLT (H) e MLT/DN (I), os quais exibem fraca marcação. Nas células luteínicas no grupo Controle (J), houve forte marcação enquanto no grupo DN (K), a marcação foi moderada. Barras = 200 μ m (A-E) e 50 μ m (F-K).

4. DISCUSSÃO

Apesar da influência da melatonina no controle da fisiologia reprodutiva [60-62], os resultados encontrados neste estudo confirmaram que na dose utilizada esse hormônio não acarreta alterações na ciclicidade estral das ratas, em concordância com outros estudos [38, 63-65]. No entanto, o tratamento com 10 mg/kg de MLT durante 60 dias em ratos [39] e 300mg por quatro meses em mulheres [66] suprimiu a função ovariana através da diminuição da secreção e da liberação de LH.

O prejuízo na ciclicidade estral promovido pelo DN observado neste estudo e previamente com diferentes doses do esteroide (1,85; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg) durante 15 dias [25, 67], persistiu mesmo com a associação da melatonina. É documentado que os esteroides exógenos são capazes de alterar o controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, fazendo com que o aumento nos níveis de andrógenos circulantes iniba a liberação de gonadotrofinas [26, 68] e, conseqüentemente ocorra uma diminuição na síntese de estrógeno pelos ovários, ocasionando o diestro persistente nas ratas androgenizadas [51, 26-28].

Simão et al. [69] relataram que o tratamento com 7,5 mg de DN/kg induziu a uma hipersecreção de LH e aumento nos níveis de testosterona e diidrotestosterona (DHT), enquanto os níveis de FSH permaneceram inalterados. Além disso, os níveis de estrógeno aumentaram como resultado da interferência do esteroide sintético na síntese de estradiol mediada pela enzima CYP450 aromatase, a qual aumentou nos grupos androgenizados. Dessa forma, os andrógenos influenciam não somente a atividade da aromatase como também servem de substrato para a síntese de estrógenos [75, 76]. Esse perfil hormonal encontrado no estudo de Simão et al. [69] esteve associado à aciclicidade das ratas, em concordância com o relato por Gervásio et al. [72], segundo os quais em ovários excessivamente androgênicos, a hipersecreção de LH acarreta na anovulação e infertilidade. Costa & Mendonça [73] também

observaram aumento nos níveis de LH e FSH em pacientes transexuais tratadas com esteroides androgênicos sintéticos.

Neste estudo, a redução no peso ovariano das ratas tratadas com o esteroide sintético colabora com os relatos prévios [74-76], devido à atrofia do órgão e prejuízos à foliculogênese e luteogênese [25]. A administração da melatonina recuperou o peso gonadal nos grupos androgenizados, visto que houve desenvolvimento folicular e formação de corpos lúteos nos ovários das ratas. É documentado que a melatonina diminui os níveis de LH [39], enquanto que o tratamento com 7,5 mg DN/kg pode aumentar os níveis dessa gonadotrofina [69]. Em nosso estudo, o tratamento com a melatonina pode ter equilibrado o nível de LH desregulado pelo esteroide, atenuando os danos sobre o funcionamento ovariano. Além disso, o efeito protetor da melatonina nos ovários contra danos oxidativos [35, 39, 41, 77] e agentes tóxicos [30, 48] pode ser verificado também frente ao tratamento esteroidal, na dose e tempo de tratamento utilizado em nosso estudo.

O aumento no peso uterino verificado em todos os grupos androgenizados, tratados ou não com a melatonina, ocorreu provavelmente devido às alterações histopatológicas relatadas previamente, tais como, a hipertrofia das camadas uterinas e a intensa secreção luminal [27, 67, 76, 78].

Neste estudo, o tecido ovariano foi severamente afetado pelo tratamento esteroidal, confirmando os resultados de outras pesquisas [21, 25, 27, 75]. As deficiências na foliculogênese foram evidenciadas pela intensa atresia folicular, ausência de folículos antrais maduros e diminuição no número de folículos saudáveis nos diferentes estágios de maturação nas ratas tratadas somente com o esteroide. Houve presença de estruturas císticas nos grupos DN e DN/MLT, provenientes da desregulação no balanço hormonal e falha na ovulação [69, 79]. Entretanto, nas ratas tratadas com a melatonina e o esteroide, os folículos saudáveis

maduros foram identificados, embora no grupo DN/MLT, os folículos mais desenvolvidos foram menos frequentes que os observados nos grupos controle, MLT e MLT/DN. Da mesma forma, a quantificação do estágio mais avançado de atresia foi mais expressiva no grupo DN/MLT, enquanto que no grupo MLT/DN o número de folículos atrésicos nos diferentes estágios foi similar ao controle e os cistos foliculares foram ausentes.

Embora o papel da melatonina no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ainda não esteja totalmente esclarecido, é relatado que a influência da melatonina é maior sobre o processo de ovulação do que sobre o crescimento folicular [62]. Então, os danos na foliculogênese causados pelo DN foram revertidos no grupo MLT/DN, mas não em DN/MLT, pois no grupo DN houve intensa atresia folicular induzida pelo excesso de andrógenos circulantes (testosterona e DHT) [69]. Lima et al. [80] utilizaram ratas submetidas à luz constante para obter um modelo próximo ao da Síndrome do Ovário Policístico (SOP), caracterizada pelo grande número de cistos foliculares e folículos atrésicos e reduzida quantidade de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos. Após o tratamento com melatonina, os autores identificaram uma redução no número, área e diâmetro das estruturas císticas.

A literatura relata que o tratamento com esteroides sintéticos é capaz de desequilibrar o balanço entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes, resultando em um quadro de estresse oxidativo e consequente dano tecidual em diferentes órgãos tais como, fígado, rins, testículos e no sistema cardiovascular [81-85]. Essa ação é decorrente da ligação direta do esteroide sintético aos receptores AR, podendo causar danos às mitocôndrias [86]. Minaii et al. [87] comprovaram que a melatonina atenua o quadro de estresse oxidativo e os danos acometidos sobre os gametas masculinos de ratos tratados com DN e submetidos ao nado forçado. Dessa forma, o resultado mais positivo obtido pelo tratamento prévio com a melatonina pode ser explicado pelas propriedades antioxidantes desse hormônio e de seus metabólitos nos oócitos e nas células granulosas dos folículos ovarianos, já descritas por

outros autores [37, 39, 62], as quais no presente estudo tais propriedades evitaram a degeneração provocada pelo esteroide nas estruturas foliculares e luteínicas.

O processo de luteogênese, severamente afetado pelo DN, assim como relatado em outros estudos [21, 25, 27], não foi alterado nas fêmeas que receberam a melatonina associada ao tratamento esteroidal. O número e a área dos corpos lúteos reduzidos no grupo DN, foram recuperados nos grupos DN/MLT e MLT/DN. O declínio na secreção de progesterona promovido pelo tratamento androgênico está associado com a degeneração das estruturas luteínicas [26, 69, 88]. Dessa forma, a ação benéfica da melatonina sobre a luteogênese pode ser explicada pela sua correlação positiva com a secreção de progesterona [62, 89, 90], sem ocorrência de associação com a síntese de estradiol ou de testosterona. Taketani et al. [37] relataram que a melatonina contribuiu para o processo de luteinização e síntese de progesterona em células humanas. Estudos prévios [80, 61] mostraram um efeito benéfico da melatonina sobre a luteogênese de ratas com ovários característicos de SOP. Além disso, a melatonina também pode provocar *upregulation* sobre os receptores de progesterona [38, 61, 91].

Na imunolocalização, o tratamento com a melatonina causou uma baixa expressão dos receptores AR nos folículos saudáveis e atresícos, enquanto nos grupos DN e DN/MLT a expressão do AR foi alta nos folículos atresícos. O aumento na expressão do AR folicular em ratas tratadas com esteroides sintéticos foi relatado por Chadha et al. [92] e Simão et al. [69], o qual está vinculado aos efeitos prejudiciais sobre a foliculogênese através da ação direta do esteroide sobre os receptores androgênicos no tecido ovariano. Chuffa et al. [38] encontraram uma diminuição na expressão do AR nas tubas uterinas de ratas tratadas com a melatonina. No grupo MLT/DN, a expressão do AR foi semelhante ao controle, evidenciando-se a capacidade da melatonina em diminuir a expressão do AR aumentada nos grupos DN e DN/MLT por meio de um efeito de *upregulation* provocado pelo DN. Já as células luteínicas

dos corpos lúteos dos grupos MLT, DN e DN/MLT mostraram expressão aumentada de AR. Dessa forma, tanto o decanoato de nandrolona quanto a melatonina influenciaram a expressão do AR no corpo lúteo, embora a interação do tratamento prévio da melatonina com o DN não promoveu diferenças na imunomarcacão para o AR.

Os andrógenos sintéticos exercem efeitos negativos diretos sobre a foliculogênese, através do AR e indiretos a partir da conversão a outros esteroides, agindo via ER [93, 94]. Embora o ER β seja predominante nos ovários, ambos subtipos ER α e ER β tem papéis importantes na fertilidade e função ovariana [24]. Em nosso estudo, todos os grupos que receberam a melatonina apresentaram uma baixa expressão de ER α e ER β nos folículos saudáveis e atresícos, enquanto no grupo tratado somente com o DN a expressão dos dois receptores nos folículos foi semelhante ao controle, mostrando que a melatonina foi responsável pela diminuição na expressão dos receptores estrogênicos. A baixa regulacão dos receptores estrogênicos promovida pela melatonina foi relatada anteriormente em ovários, tubas uterinas e útero de ratas utilizando as doses de 0,8 mg/kg durante quinze dias [91] e 1mg/kg por 60 dias [38].

Jakimiuk et al. [95] e Zurvarra et al. [96] relataram a reduçao da expressao de ER β nas células granulosas e tecais dos folículos e nos cistos foliculares em modelos de SOP. Assim como observado nos folículos ovarianos dos animais deste estudo e no relato de Simão et al. [69], o tratamento com 7,5 mg de DN/kg não alterou a expressao e a quantidade de receptores ER α e ER β , mostrando que o aumento no nível de estradiol não culminou no aumento dos receptores estrogênicos. Embora a reduçao da expressao de ER β nesse estudo não foi encontrada nos folículos, os corpos lúteos das ratas tratadas somente com o DN apresentaram uma diminuicão na marcaçao de ER β ; alteraçao que não foi encontrada nos animais dos grupos DN/MLT e MLT/DN. Esse resultado sugere que a atuacão da melatonina teve um papel regulador sobre a açao direta do esteroide na marcaçao do ER β nos corpos lúteos.

Portanto, é possível observar que tanto a melatonina como o DN interferiram de maneira diferencial sobre a foliculogênese e a luteogênese. Estudos complementares são necessários para realização de dosagem hormonal e quantificação dos receptores de melatonina, a fim de elucidar os mecanismos complexos pelos quais a melatonina e o DN modulam a atividade ovariana.

Em conclusão, a melatonina apresentou um efeito benéfico sobre os ovários das ratas tratadas com o DN, através da recuperação da foliculogênese e da luteogênese. Os receptores esteroides sexuais foram regulados diferentemente pela melatonina nos folículos ovarianos e corpos lúteos. Enquanto nos folículos saudáveis, a melatonina promoveu fraca expressão do ER α e ER β , nos folículos atresícos e corpos lúteos, a mesma inibiu o aumento na expressão do AR induzido pelo DN. O tratamento prévio com melatonina foi mais eficaz em relação ao tratamento concomitante ao esteroide sintético.

5. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. REFERÊNCIAS

- [1] J.A.B. Iriart, J. C., Chaves, R.G. Orleans. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cadernos de Saúde Pública*. 25 (2009) 773-782.
- [2] S.R. Boff. Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. 18 (2010) 81-88.
- [3] T.S. Cunha, N.S. Cunha, M.J.C.S. Moura, F.K. Marcondes Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 40 (2004) 165-179.
- [4] N.A. Evans. Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. **British Journal Sports Medicine**, 31 (1997) 54-58.
- [5] W. Arlt Androgen therapy in women. **European Journal of Endocrinology**.154 (2006) 1-11.

- [6] D.J. Handelsman. Testosterone: use, misuse and abuse. **Medical journal of Australia**. 185 (2006) 436-439.
- [7] F. Ceccheto, D.R. Moraes, P.S. Farias Distintos enfoques sobre esteroides anabolizantes: riscos à saúde e hipermasculinidade. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**. 16 (2012) 369-382.
- [8] F. Ahmad, S.M. Yunus, A. Asghar, N.A. Faruqi. Influence of Anabolic Steroid on Tibial Fracture Healing in Rabbits—A Study on Experimental Model. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**. 7 (2013) 93-96.
- [9] D.R. Moraes, L.D. Castiel, A.P.P.G.A Ribeiro. “Não” para jovens bombados, “sim” para velhos empinados: o discurso sobre anabolizantes e saúde em artigos da área biomédica. **Cardernos de saúde pública**. 31 (2015) 1131-1140.
- [10] M.A. Carneiro-Júnior, A.C. Silva, M.M. Almeida. Nível de conhecimento e ocorrência do uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Revista Científica FAGOC-Saúde**. 1 (2016) 37-40.
- [11] A.P. Lima, F.B. Cardoso. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. **Revista de Atenção à Saúde**. 9 (2012) 39-46.
- [12] A.O. Souza, A.M. Nascimento, E.R Cole. Problemas relacionados ao uso de Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA) por praticantes de musculação e o papel do farmacêutico na educação destes atletas de modo a reduzir o uso indiscriminado. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**. 25 (2013) 143-154.
- [13] O.S.C. Abrahin, E.C. Sousa. Esteroides anabolizantes androgênicos e seus efeitos colaterais: uma revisão crítico-científica. **Revista da Educação Física/UEM**. 24 (2013) 669-679.
- [14] J. Amsterdam, A. Opperhuizen, F. Hartgens. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 57 (2010) 117-123.
- [15] M. Rocha, F. Aguiar, H. Ramos. O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos—uma epidemia silenciosa. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, 9 (2014) 98-105.
- [16] S. Cannavò, L. Curtò, F. Trimarchi. Exercise-related female reproductive dysfunction. **Journal Endocrinology Invest**. 24 (2001) 823-832.
- [17] A.D. Rogol. Drugs of abuse and the adolescent athlete. **Italian journal of pediatrics**. 36 (2010) 1-6.
- [18] A.S. Clarck, M.E. Blasberg, E.M. Brandling-Bennett. Stanozolol, oxymetholone and testosterone cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiology & behavior**. 63 (1998) 287-295.
- [19] M.T. Bento-Silva, M.C.C. Martins, F.L. Torres-Leal, T.L. Barros, I.L.N.F. Carvalho, H.A.F. Carvalho, F.R.C. Almeida. Effects of administering testosterone undecanoate in rats

subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. **Brazilian Journal of Pharmacological Science**. 46 (2010) 79-89.

[20] I.C.C. Camargo, T.C. Gênova, M.C.P. Machado, F. Frei, P. Mesquita, S. Fátima. Administração experimental de esteroide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. **Bioscience Journal**. (2011) 656-665.

[21] I.C.C. Camargo, G.A.A. Leite, T. Pinto, J.T. Ribeiro-Paes. Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. **Experimental and Toxicologic Pathology**. 66 (2014) 195-202.

[22] F. Frizon, S.M.D. Macedo, M. Yonamine. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 26 (2009) 227-232.

[23] A.T. Kicman. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**. 154 (2008) 502-21.

[24] Drummond, A. E.; Fuller, P. J. Ovarian actions of estrogen receptor- β : an update. **Seminars in reproductive medicine**. 30 (2012) 32-38.

[25] V.A. Simão, L.B. Berladin, G.A.A. Leite, L.G.A. Chuffa, I.C.C. Camargo. Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods. **International journal of experimental pathology**. 96 (2015) 338-349.

[26] H. Bordbar, F. Mesbah, T. Talaei, F. Dehghani, H. Mirkhani. Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. **Iranian journal of medical sciences**. 39 (2014) 44-50.

[27] J.R. Gerez, F. Frei, I.C.C. Camargo. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. **Contraception**. 72 (2005) 77-80.

[28] I.C.C. Camargo, R.B. Souza, S.F.P. Mesquita, L.G.A. Chuffa, F. Frei. Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical effort. **Acta Biologica Hungarica**. 60 (2009) 253-261.

[29] A. Galano, D.X. Tan, R.J. Reiter. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of pineal research**. 51 (2011) 1-16.

[30] F. Mohammadghasemi, S. K. Jahromi, H. Hajizadeh, M. A. Homafar, N. Saadat. The Protective Effects of Exogenous Melatonin on Nicotine-induced Changes in Mouse Ovarian Follicles. **Journal of Reproduction & Infertility**. 13 (2012) 143.

[31] M;L. Dubovich, P. Delagrande, D.N. Krause, D. Sugden, D.P. Cardinali, J. Olcese. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. **Pharmacological reviews**. 62 (2010) 343-380.

- [32] Reiter, D.X. Tan, L. Fuentes-Broto. Melatoni: a multitasking molecule. **Progress in brain research**. 181 (2010) 127-151.
- [33] M. I. Masana, M. L. Dubocovich. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Science Signaling**, 2001 (2011) pe39.
- [34] L. Rönnerberg, A. Kauppila, J. Leppälüoto, H. Martikainen, O. Vakkuri. Circadian and Seasonal Variation in Human Preovulatory Follicular Fluid Melatonin Concentration. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 71 (1990) 493-496.
- [35] M.M. Woo, C.J. Tai, S.K. Kang, P.S. Nathwani, S.F. Pang, P.C., Leung. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 86 (2001) 4789-4797.
- [36] H. Tamura, Y. Nakamura, A. Korkmaz, L.C. Manchester, D.X. Tan, N. Sugino, R.J. Reiter. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. 92 (2009) 328-343.
- [37] T. Taketani, H. Tamura, A. Takasaki, L. Lee, F. Kizuka, I. Tamura, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, K. Shimamura, R.J. Reiter, N. Sugino. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *Journal of pineal research*. 51 (2011) 207-213.
- [38] L.G.A. Chuffa, F.R. Seiva, F.R.F. Seiva, W.J. Fávaro, G.R. Teixeira, J.P. Amorim, L.O. Mendes, B.A. Fioruci, P.F.F. Pinheiro, A.H. Fernandes, J.A.A. Franci, F.K. Delella, M. Martinez, F.E. Martinez. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 9 (2011) 1-9.
- [39] L.G.A. Chuffa, F.R.F. Seiva, J.P.A. Amorim, G.R. Teixeira, L.O. Mendes, E.L.B. Novelli, F.F. Pinheiro, M. Martinez, F.E. Martinez. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 44 (2011) 217-233.
- [40] A. Takasaki, Y. Nakamura, H. Tamura, K. Shimamura, H. Morioka. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. **Reproductive Medicine and Biology**. 2 (2003) 139-144.
- [41] L.G.A. Chuffa, B.A. Fioruci-Fontanelli, L.O. Mendes, W.J. Favaro, P.F.F. Pinheiro, M. Martinez, F.E. Martinez. Characterization of chemically induced ovarian carcinomas in a ethanol-preferring rat model: influence of long-term melatonin treatment. **PloS one**. 8 (2013) p. e81676.
- [42] B.V. Jardim-Perassi, A.S. Arbab, L.C. Ferreira, T.F. Borin, N.R. Varma, A.S.M. Iskander, A. Shankar, M.M. Ali, D.A.P.C. Zuccari. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. **PloS one**. 9 (2014) e85311.
- [43] R.J. Reiter, D.X. Tan, T.S. Herman, C.R. Thomas. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 59 (2004) 639-653.
- [44] M. Güney, B. Oral, N. Karahan, T. Mungan. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. **Fertility and sterility**. 89 (2008) 934-942.

- [45] S. Paul, A.V. Sharma, P.D. Mahapatra, P. Bhattacharya, R.J. Reiter, S. Swarnakar. Role of melatonin in regulating matrix metalloproteinase-9 via tissue inhibitors of metalloproteinase-1 during protection against endometriosis. **Journal of pineal research**. 44 (2008) 439-449.
- [46] S.A. Pai, A.S. Majumdar. Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 66 (2014) 1710-1721.
- [47] S.N.S. Saadat, F. Mohammadghasemi S.K. Jahromi, M.A. Homafar, M. Haghiri. Melatonin protects uterus and oviduct exposed to nicotine in mice. **Interdisciplinary toxicology**. 7 (2014) 41-46.
- [48] J.K. Kim, C.J. Lee. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in γ -irradiated mouse. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 449 (2000) 33-39.
- [49] R.C. Marqueti, J. Prestes, C.C. Wang, O.H. Ramos, S.E. Perez, W.R. Nakagaki, H.F. Carvalho, H.S. Selistre-Araujo. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. **Scandinavian Journal of Medicine & Sciences in Sports**. 21 (2010) 91-99.
- [50] L.G.A. Chuffa, B.A.F. Fontanelli, L.O. Mendes, F.R.F. Seiva, M. Martinez, W.J. Fávaro, R.F. Domeniconi, P.F.F. Pinheiro, L.D. Santos, F.E. Martinez. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88-and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. **BMC cancer**. 15 (2015) 1-13.
- [51] M.E. Blasberg, C.J. Langan, A.S. Clark. The Effects of 17 α -Methyltestosterone, Methandrostenolone, and Nandrolone Decanoate on the Rat Estrous Cycle. **Physiology & Behavior**. 61 (1997) 265-272.
- [52] G. Gayan-Ramirez, H. Rollier, F. Vanderhoydonc, G. Verhoeven, R. Gosselink, M. Decramer. Nandrolone decanoate does not enhance training effects but increases IGF-I mRNA in rat diaphragm. **Journal of Applied Physiology**. 88 (2000) 26-34.
- [53] B. Baykara, I. Tekmen, C. Pekcetin, C. Ulukus , P. Tuncel, O. Sagol, M. Ormen, C. Ozogul. The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver. **Acta histochemical**. 111 (2009) 42-51.
- [54] A. Chabra, M. Shokrzadeh, F. Naghshvar, F. Salehi, A. Ahmadi. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. **Human & experimental toxicology**. (2013) 0960327113489052.
- [55] M.G. Vilela, L. Júnior, J.G.C. Silva. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **Femina**. 35 (2007) 61-64.
- [56] J.M. Goldman, A.S. Murr, R.L. Cooper. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**. 80 (2007) 84-97.

- [57] T. Pedersen, H. Peters. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of reproduction and fertility**. 17 (1968) 555-557.
- [58] A.N. Hirshfield. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**. 124 (1991) 43-101.
- [59] P. Osman. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. **Journal of reproduction and fertility**. 73 (1985) 261-270.
- [60] M.M. Macchi, J.N. Bruce. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in neuroendocrinology**. 25 (2004) 177-195.
- [61] L.R.G. Romeu, E.L.A. Motta, C.C. Maganhin, C.T.F. Oshima, M.C. Fonseca, K.F. Barrueco, R.S. Simoes, R. Pellegrino, E.C. Baracat, J.M. Soares-Junior. Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. **Fertility and sterility**. 95 (2011) 1379-1384.
- [62] H. Tamura, A. Takasaki, T. Taketani, M. Tanabe, F. Kizuka, L. Lee, I. Tamura, R. Maekawa, H. Asada, Y. Yamagata, N. Sugino. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [Review]. **Endocrine journal**. 60 (2013) 1-13.
- [63] E. Diaz, D. Pazo, A.I. Esquifino, B. Diaz. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in rats. **Journal of reproduction and fertility**. 119 (2000) 151-156.
- [64] V.N. Anisimova, I.N. Alimova, D.A. Baturin, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski, S.V. Rosenfeld, K.G. Manton, A.V. Semenchenko, A.I. Yashin. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. **Experimental gerontology**. 38 (2003) 449-461.
- [65] C.D. Bondi, C. Alonso-Gonzalez, W.P. Clafshenkel, M.P. Kotlarczyk, B.R. Dodda, E. Sanchez-Barcelo, V.L. Davis, P.A. Witt-Enderby. The effect of estradiol, progesterone, and melatonin on estrous cycling and ovarian aromatase expression in intact female mice. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 174 (2014) 80-85.
- [66] B.C. Voordouw, R. Euser, R.E. Verdonk, B.T. Alberda, F.H. Jong, A.C. Drogendijk, B.C. Fauser, M. Cohen. Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 74 (1992) 108-117.
- [67] L.B. Belardin, V.A. Simão, G.A.A. Leite, L.G.A. Chuffa, I.C.C. Camargo. Dose-Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**. 101 (2014) 168-177.
- [68] S. Purkayastha, R. Mahanta. Effect of nandrolone decanoate on serum FSH, LH and testosterone concentration in male albino mice. **World Journal of Life Sciences and Medical Research**. 2 (2012) 123-127.

- [69] V.A. Simão, L.G.A. Chuffa, I.C.C. Camargo. Ovarian sex steroid receptors and sex hormones in androgenized rats. **Reproduction**. 152 (2016) 545-559.
- [70] I.D.E. Barcelos, F.C. Donabela, M.G. Da Broi, C.P. Ribas, J. Meola, P.A. Navarro. Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus. **Reprodução & Climatério**. 28 (2013) 51-56.
- [71] L.B. Apolloni, J.B. Bruno, B.G. Alves, J.R. Figueiredo. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44 (2016) 01-15.
- [72] C.G. Gervásio, M.P. Bernuci, M.F. Silva-de-Sá, A.C.J.S. Rosa-e-Silva. The role of androgen hormones in early follicular development. **ISRN obstetrics and gynecology**, 2014 (2014) 1-11.
- [73] E.M.F. Costa, B.B. Mendonca. Clinical management of transsexual subjects. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 58 (2014) 188-196.
- [74] S.G. Hillier, G.T. Ross. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. **Biology of Reproduction**. 20 (1979) 261-268.
- [75] S. Karbalay-Doust, A. Noorafshan. Stereological estimation of ovarian oocyte volume, surface area and number: application on mice treated with nandrolone decanoate. **Folia Histochem Cytobiol**. 50 (2012) 275-79.
- [76] I.F. Caliman, C.S. Bernabe, A.F. Melo Jr., G.A. Brasil, A.M. Nascimento, E.M. Lima, S.G. Figueiredo, T.U. Andrade, N.S. Bissoli. Long-term Treatment with Nandrolone Decanoate Impairs Mesenteric Vascular Relaxation in both Sedentary and Exercised Female Rats. **Steroids**. 120 (2017) 7-18.
- [77] L.G.A. Chuffa, F.R.F. Seiva, J.P.A. Amorim, G.R. Teixeira, L.O. Mendes, E.L.B. Novelli, F.F. Pinheiro, M. Martinez, F.E. Martinez. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 44 (2011) 217-223.
- [78] H.R. Mobini Far, G. Agren, A.S. Lindqvist, M. Marmendal, C. Fahlke, I. Thiblin. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **European Journal Obstetric Gynecology Reproductive Biology**. 131 (2007) 189-197.
- [79] D. Dixon, R. Alison, U. Bach, K. Colman, G.L. Foley, J.H. Harleman, R. Haworth, R. Herbert, A. Heuser, G. Long, M. Mirsky, K. Regan, E.V. Esch, F. R. Westwood, J. Vidal1, M. Yoshida. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Jornal of Toxicologic Pathology**. 27 (2014) 1S-107S.
- [80] M.F.P. Lima, E.C. Baracat, M. D.J. Simões. 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 (2004) 987-995.

- [81] A. Pey, A. Saborido, I. Blázquez, J. Delgado, A. Megías, Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**. 87 (2003) 269-277.
- [82] CHAVES, Elen Aguiar et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**. 99 (2006) 223-230.
- [83] L.H. Tahtamouni, N.H. Mustafa, I.M. Hassan, I.M. Ahmad, S.R. Yasin, M.Y. Abdalla. Nandrolone decanoate administration to male rats induces oxidative stress, seminiferous tubules abnormalities, and sperm DNA fragmentation. **JJBS**. 3 (2010) 165-174.
- [84] I. Riezzo, E. Turillazzi, S. Bello, S. Cantatore, D. Cerretani, M. Di Paolo, A.I. Fiaschi, P. Frati, M. Neri, M. Pedretti, V. Fineschi. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. **Toxicology and applied pharmacology**. 280 (2014) 97-106.
- [85] C. Pomara, M. Neri, S. Bello, C. Fiore, I. Riezzo, E. Turillazzi. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: Oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. **Current neuropharmacology**. 13 (2015) 132-145.
- [86] R.L. Cunningham, A. Giuffrida, J. L. Roberts. Androgens induce dopaminergic neurotoxicity via caspase-3-dependent activation of protein kinase C δ . **Endocrinology**. 150 (2009) 5539-5548.
- [87] B. Minaii, A. Moayeri, S. Shokri, M.H. Roudkenar, T. Golmohammadi, F. Malek, M. Barbarestani. Melatonin improve the sperm quality in forced swimming test induced oxidative stress in nandrolone treated wistar rats. **Acta Medica Iranica**. 52 (2014) 496-504.
- [88] J. Lüttgenau, N. Beindorff, S.E. Ulbrich, J.P. Kastelic, H. Bollwein. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**. 76 (2011) 12-22.
- [89] Y. Nakamura, H. Tamura, H. Takayama, H. Kato. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and sterility**. 80 (2003) 1012-1016.
- [90] I. Adriaens, P. Jacquet, R. Cortvrindt, K. Janssen, J. Smitz. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**. 228 (2006) 333-343.
- [91] A.R. Abd-Allah, E.S.M. El-Sayed, M.H. Abdel-Wahab, F.M. Hamada. Effect of melatonin on estrogen and progesterone receptors in relation to uterine contraction in rats. **Pharmacological research**. 47 (2003) 349-354.
- [92] S. Chadha, T.D. Pache, F.J. Huikeshoven, A.O. Brinkmann. Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. **Human pathology**. 25 (1994) 1198-1204.

- [93] K.A. Walters, C.M. Allan, D.J. Handelsman. Androgen actions and the ovary. **Biology of Reproduction**. 78 (2008) 380-389.
- [94] W. Tarumi, M.T. Itoh., N. Suzuki. Effects of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on the mouse ovarian follicle development and oocyte maturation. **PloS one**. 9 (2014) e99423.
- [95] A.J. Jakimiuk, S.R. Weitsman, H.W. Yen, M. Bogusiewicz, D.A. Magoffin. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 87 (2002) 5532-5538.
- [96] F.M. Zurvarra, N.R. Salvetti, J.I. Mason, M.M. Velazquez, N.S. Alfaro, H.H. Ortega. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. **Reproduction, Fertility and Development**. 21 (2009) 827-839.

CERTIFICADO

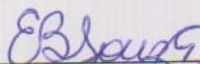
CERTIFICAMOS que o Projeto "**Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do possível efeito protetor da melatonina em ovários de ratas tratadas com o decanoato de nandrolona**", Registro nº 005/2014, sob responsabilidade do(a) Pesquisador(a) **Isabel Cristina Cherici Camargo** e colaboração dos alunos **Bianca Ribeiro de Souza**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange ao respeito aos princípios éticos na experimentação animal:

Animais utilizados: **ratos heterogênicos Wistar**

Número de animais solicitados e autorizados: **22 (vinte e dois)**

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido em 35 meses, no período de 15/07/2015 a 14/06/2018, sendo que o Relatório Parcial deverá ser entregue em agosto/2016 e agosto de 2017 e o Relatório Final em julho/2018.

Assis, 07 de julho de 2015.



Edislane Barreiros de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Reproductive Toxicology



Copyright © 2017 Elsevier B.V.

ISSN: 0890-6238

Supports Open Access

Editor-in-Chief: Thomas B. Knudsen, Ph.D.

Impact Factor: 2.850

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.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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 Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Preparation

NEW SUBMISSIONS

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 your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). 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 word processor.

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.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. 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 the e-mail address is given and that contact details are 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

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. 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. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and 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 editable 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). You can view [example Highlights](#) on our information site.

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.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with 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. Many word processors 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.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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 finalized, 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 (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

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

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized 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 (or JPEG), EPS (or PDF), 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 online (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 online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. 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

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

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.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames,

journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/reproductive-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

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. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

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] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

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 links to 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 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). 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](#). 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 material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Transparency

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).