



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RECEPTORES ANDROGÊNICOS E
ESTROGÊNICOS NO OVÁRIO DE RATAS PRENHES SUBMETIDAS AO CONSUMO
DE ÁLCOOL E TRATADAS COM MELATONINA**

ARYANE ALVES DA SILVA

RECIFE

2023

ARYANE ALVES DA SILVA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RECEPTORES ANDROGÊNICOS E
ESTROGÊNICOS NO OVÁRIO DE RATAS PRENHES SUBMETIDAS AO
CONSUMO DE ÁLCOOL E TRATADAS COM MELATONINA**

**Monografia apresentada á Coordenação Do Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal Rural de Pernambuco como
componente obrigatório para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Valeria Wanderley Teixeira

**Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho
Teixeira**

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a da Silva, Aryane Alves
Análise morfológica de receptores androgênicos e estrogênicos no ovário de ratas prenhes submetidas ao consumo de álcool e tratadas com melatonina / Aryane Alves da Silva. - 2023.
51 f.
- Orientadora: Valeria Wanderley Teixeira.
Coorientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2023.
1. Reprodução. 2. Pineal. 3. Imunohistoquímica. 4. Receptores esteróides. 5. Ratas. I. Teixeira, Valeria Wanderley, orient. II. Teixeira, Alvaro Aguiar Coelho, coorient. III. Título

CDD 574

ARYANE ALVES DA SILVA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE RECEPTORES ANDROGÊNICOS E ESTROGÊNICOS
NO OVÁRIO DE RATAS PRENHES SUBMETIDAS AO CONSUMO DE ÁLCOOL
E TRATADAS COM MELATONINA**

Comissão Avaliadora:

Prof^a. Dr^a Valeria Wanderley Teixeira
Orientadora

Dr. Clovis José Cavalcanti Lapa Neto – UFRPE
Titular

MSc. Yasmim Barbosa dos Santos – UFRPE
Titular

MSc. Vanessa Maria da Silva – UFRPE

Suplente
Recife
2023

AGRADECIMENTOS

Inicialmente dedico meus agradecimentos a Deus, pois foi ele quem me deu força de vontade e resiliência durante todo o curso, me mantendo firme e segura com os meus sonhos.

Não poderia jamais se esquecer de agradecer meus pais, Rosa Amélia de Lima Neta e Ailton Alves da Silva, que com sua criação e amor durante toda minha vida me preparam para esse momento, me ofereceram apoio e nunca duvidaram da minha capacidade mesmo quando eu duvidei. Sem eles, a existência deste trabalho de conclusão de curso não seria possível. Espero poder retribuir em vida todo amor que eles depositaram em mim.

Agradeço a minha amiga Eduarda Gomes Monteiro de Oliveira, que durante todo o curso me ofereceu momentos felizes, de apoio e me acompanhou nessa jornada caótica, mas muito prazerosa dentro da Universidade. Eternamente grata a ela, vou levar nossos bons momentos e sua linda amizade pra vida.

Agradeço também a Bruno José do Nascimento, que me ajudou muito durante todo o projeto, sempre disponível quando mais precisava, me acompanhando nos procedimentos além de me dar apoio e me ensinar bastante. Agradeço também a Vanessa Maria da Silva e Yasmim Barbosa dos Santos que foram muito atenciosas durante meu período como estagiária no laboratório.

Agradeço a Ismaela Maria Ferreira de Melo, que ensinou tanto durante meu período no laboratório, além de também de ser muito parceira durante momentos difíceis e me ensinar bastante com seu conhecimento.

Os meus sinceros agradecimentos a Prof^a. Dr^a Valéria Wanderley Teixeira e ao Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, que acolheram em seu laboratório, LABEMOVI, me dando a oportunidade aprender muito com seus conhecimentos, além de oferecer um espaço em que eu pudesse evoluir com aluna e pesquisadora.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e por todo conhecimento que adquirir dentro do curso de Ciências Biológicas. Gostaria também de agradecer o auxílio financeiro com a bolsa do PIBIC/UFRPE.

Todos aqui citados foram extremamente importantes para a minha trajetória dentro da Universidade, e é com um sentimento agridoce que encerro esta etapa da minha vida, fico feliz por esta terminando, mas também me sinto nostálgica. Agradeço

a todos de coração e alma pelo o que me proporcionaram. Gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
Consumo de álcool e suas consequências.....	12
Metabolismo do álcool.....	14
Efeitos do Álcool nos Ovários.....	16
Receptores Androgênicos e Estrogênicos nos Ovários.....	18
Melatonina e seu Potencial Terapêutico.....	19
Efeitos da Melatonina nos Ovários.....	22
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias dos dados morfométricos dos ovários das ratas dos grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).....37

|

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia dos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. (A) – controle; (B) – Álcool e (C) – Álcool + mel. Setas curtas – folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Setas longas – folículos em formas de cistos no grupo B (Álcool).....32

Figura 2: Histoquímica para o colágeno nos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. (A) – Controle; (B) – Álcool e (C) – Álcool + mel. Em D quantificação do colágeno. Aumento significativo no grupo álcool e redução no grupo álcool + mel. Tricômico de Mallory. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).....33

Figura 3: Índice organossomático dos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. Redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).....34

Figura 4: Imunohistoquímica para receptor de andrógeno. (A) – Controle; (B) – Álcool e (C) – Álcool + mel. Marcação mais intensa em A e B, e menos intensa em C. Em D qualificação das células andrógeno positivas. Redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).....35

Figura 5: Imunohistoquímica para receptor de estrógeno. (A) – Controle; (B) – Álcool e C – Álcool + mel. Marcação mais intensa em A e B, e menos intensa em C. Em D quantificação das células estrógeno positivas. Redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).....36

RESUMO

O impacto do álcool na reprodução feminina é uma área em desenvolvimento, com estudos sugerindo anormalidades no ciclo menstrual, ausência de ovulação, menopausa precoce e infertilidade em mulheres alcólatras, e na gravidez traz sérias consequências, incluindo aborto espontâneo, baixo peso ao nascer e parto prematuro. A melatonina, conhecida por suas propriedades antioxidantes e benefícios anti-inflamatórios, está sendo estudada como um agente para reverter os efeitos prejudiciais do álcool, incluindo os relacionados à reprodução. Este trabalho tem como objetivo avaliar se a administração de melatonina durante a gravidez pode mitigar os efeitos negativos do álcool nos ovários. Foram utilizadas 15 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) prenhes, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente \pm 250g ratas prenhes da linhagem Wistar, divididas nos seguintes grupos: Controle – Ratas prenhes que não receberam álcool; Álcool - Ratas prenhes submetidas à ingestão de Álcool ; Álcool + Melatonina - Ratas prenhes submetidas à ingestão de Álcool em conjunto com administração de Melatonina . O estudo investigou parâmetros histológicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e morfométricos do ovário, incluindo receptores androgênicos e estrogênicos. A administração de álcool foi realizada via intragástrica, enquanto a melatonina foi administrada via intraperitoneal. Os resultados mostraram que o grupo Álcool apresentou folículos com desenvolvimento anormal, indicando disrupções no ciclo estral e retenção folicular. Em contraste, os grupos Controle e Álcool + Mel demonstraram ciclos normais. A análise histoquímica revelou maior produção de colágeno no grupo Álcool, ausente no grupo Álcool + Mel. A expressão de receptores androgênicos e estrogênicos foi reduzida no grupo Álcool, mas preservada no grupo Álcool + Mel. O índice organossomático mostrou redução significativa nos ovários do grupo Álcool, enquanto as alterações não foram observadas nos grupos Controle e Álcool + Mel. A análise morfométrica indicou menor número de folículos primários e corpos lúteos no grupo Álcool, mas um aumento no número de folículos secundários e terciários. Esses resultados não foram observados no grupo Álcool + Mel, destacando o efeito protetor da melatonina no desenvolvimento dos folículos. Portanto, a melatonina parece ter um efeito benéfico na mitigação dos efeitos adversos do álcool nos ovários de ratas prenhes, sugerindo seu potencial como intervenção para proteger a saúde reprodutiva em contextos de consumo de álcool.

Palavras chaves: Reprodução, pineal, imunohistoquímica, receptores de esteroides, ratas, alcoolismo.

ABSTRACT

The impact of alcohol on female reproduction is a developing field, with studies suggesting abnormalities in the menstrual cycle, absence of ovulation, early menopause, and infertility in alcoholic women. During pregnancy, alcohol can lead to serious consequences, including spontaneous abortion, low birth weight, and premature delivery. Melatonin, known for its antioxidant properties and anti-inflammatory benefits, is being studied as an agent to reverse the detrimental effects of alcohol, including those related to reproduction. This work aims to assess whether administering melatonin during pregnancy can mitigate the negative effects of alcohol on the ovaries. 15 pregnant albino rats (*Rattus norvegicus albinus*), aged 60 days and weighing approximately \pm 250g, from the Wistar lineage, were used and divided into the following groups: Control – Pregnant rats that did not receive alcohol; Alcohol – Pregnant rats subjected to alcohol intake; Alcohol + Mel. The study investigated histological, histochemical, immunohistochemical, and morphometric parameters of the ovaries, including androgen and estrogen receptors. Alcohol administration was done via intragastric route, while melatonin was administered intraperitoneally. The results showed that the Alcohol group exhibited follicles with abnormal development, indicating disruptions in the estrous cycle and follicular retention. In contrast, the Control and Alcohol + Mel groups demonstrated normal cycles. Histochemical analysis revealed higher collagen production in the Alcohol group, absent in the Alcohol + Mel group. Expression of androgen and estrogen receptors was reduced in the Alcohol group but preserved in the Alcohol + Mel group. The organosomatic index significantly decreased in the Alcohol group's ovaries, while no changes were observed in the Control and Alcohol + Mel groups. Morphometric analysis indicated a lower number of primary follicles and corpus luteum in the Alcohol group but an increase in secondary and tertiary follicles. These results were not observed in the Alcohol + Mel group, highlighting melatonin's protective effect on follicle development. Thus, melatonin appears to have a beneficial effect in mitigating alcohol's adverse effects on the ovaries of pregnant rats, suggesting its potential as an intervention to safeguard reproductive health in the context of alcohol consumption.

Keywords: Reproduction, pineal, immunohistochemistry, steroid receptors, rats, alcoholism.

1 **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

2

3 **Consumo de álcool e suas consequências**

4 O álcool (ou etanol) droga lícita, psicótica, de baixo custo, representa uma das
5 principais fontes de prazer e entretenimento nas interações humanas desde a
6 antiguidade, se mostrando presente em escrituras bíblicas em conjunto com as
7 problemáticas acerca do seu consumo abusivo, este sendo influenciado por aspectos
8 psicológicos, genéticos e morais (MARQUES, 2001). A princípio, as bebidas
9 alcoólicas apresentavam baixo teor de álcool, pois eram obtidas exclusivamente do
10 processo de fermentação. No entanto, com o surgimento das técnicas de destilação
11 introduzidas na idade média a partir da cultura árabe, compostos mais
12 sobrecarregados de álcool ganharam um espaço entre o público consumidor, sendo
13 chamado até mesmo de “remédios” para todas as doenças, já que acreditavam
14 causar um alívio nas dores e dissipar preocupações (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

15 Apesar de socialmente não ser categorizado como uma droga, o álcool é um
16 psicotrópico depressor do sistema nervoso central, pois obtém a capacidade de
17 provocar estados alterados de consciências e mudanças comportamentais nos
18 indivíduos que o consomem em grande quantidade (COSTARDI *et al.*, 2015).
19 Embora o consumo excessivo de álcool não classifique de imediato um indivíduo
20 como alcoólatra, é importante mencionar que a ingestão intensa desta substância
21 pode ocasionar quadros de dependência química, neste caso, o alcoolismo
22 (BECKER, 2008). De acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para
23 Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2021) o padrão de consumo de
24 18,4% da população brasileira é de bebedor abusivo.

25 O alcoolismo é uma doença crônica primária influenciada por fatores genéticos
26 e psicossociais, além do meio em que indivíduo está inserido para que a dependência
27 se desenvolva e conseqüentemente, se manifeste (MORSE; FLAVIN, 1992). De
28 acordo com a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) (2020) os fatores
29 ambientais são diversos, mas entre eles temos desenvolvimento econômico, cultura,

30 disponibilidade de álcool e a implantação e execução de políticas públicas sobre o
31 seu consumo.

32 Segundo a "The 3rd National Survey on Drug Use by Brazilians" lançada pela
33 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Aproximadamente 2.3 milhões de brasileiros
34 com idade entre 12 a 65 anos apresentaram sinais de dependência química, com
35 quadros de alcoolismo mais prevalentes entre os homens (4.6%) do que nas
36 mulheres (0.7%) (BASTOS *et al.*, 2017). Com isso, com seu uso constante e o seu
37 potencial danoso ao bem estar da população, o consumo de bebidas alcoólicas se
38 tornou uma grande questão de saúde pública mundial (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

39 O etanol é responsável por aproximadamente três milhões de mortes por ano
40 em todo mundo (5,3% de todas as mortes), sendo a faixa etária entre 20 e 39 anos a
41 mais afetada (FRANKLIN *et al.*, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde
42 (OMS) (2018) todas as mortes atribuídas ao consumo de bebidas alcólicas foram
43 devido a lesões (28.7%), problemas digestivos (21.3%) doenças cardiovasculares
44 (19%), doenças infecciosas (12.9%) câncer (12.6%), além disso, esses registros
45 superam as resultantes por doenças como tuberculose, HIV/AIDS e diabetes.

46 As consequências negativas para a saúde motivadas pelo consumo abusivo de
47 álcool são extensas. De acordo com Roerecke (2021), a ingestão crônica de etanol
48 está relacionada com diversos problemas cardiovasculares tais como doença
49 cardíaca isquêmica, hipertensão, acidente cardiovascular cerebral, fibrilação atrial e
50 cardiopatia. No trato gastrointestinal, o álcool provoca um desequilíbrio e modificação
51 na composição da microbiota gastrointestinal, fato que ocasiona um aumento na
52 produção de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), além de promover efeitos
53 adversos como perda do apetite, náusea e dores abdominais, sendo estes sintomas
54 contribuintes para redução de ingestão de alimentos e consequentemente a má
55 nutrição e perda de peso indesejável (BODE; BODE, 1997; PATEL *et al.*, 2015).

56 O etanol origina várias lesões hepáticas e desencadeia diversas complicações,
57 entre elas, esteatose, hepatite alcoólica, cirrose e hepatocarcinoma (DOMINGUES *et*
58 *al.*, 2009). Além disso, o álcool é responsável por promover a má absorção de
59 nutrientes, agrava a anorexia, estimula o hipermetabolismo, estresse oxidativo, maior
60 excreção urinária de micronutrientes hidrossolúveis, e como consequência destas

61 condições, o seu uso constante ocasiona quadros de anemia, aterosclerose, pelagra
62 e imunossupressão (DOMINGUES *et al.*, 2009).

63 Apesar de a droga ser utilizada muitas vezes no intuito de provocar
64 adormecimento, o consumo moderado de álcool diminui a quantidade de sono REM
65 durante a noite, além de, em doses mais altas, provocar a fragmentação do sono
66 (acordar mais vezes) fazendo com que assim em longo prazo se desenvolvam
67 distúrbios de sono, como a insônia (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

68 **Metabolismo do álcool**

69 O etanol é uma substância de estrutura química simples, constituída apenas
70 por dois carbonos associado a um grupo hidroxila (OH) (HENDRIKS, 2020). Tal
71 característica faz com que moléculas de etanol obtenham grande capacidade de
72 difusão e distribuição em todos tecidos e fluídos corporais, devido o balanço perfeito
73 que apresentam entre o seu carácter hidrofílico-hidrofóbico, além de baixo peso
74 molecular (COSTARDI *et al.*, 2015).

75 De acordo com POHANKA (2016) é um composto sensível a processos
76 oxidativos químicos e físicos, no entanto, seus principais meios de degradação são
77 realizados por reações bioquímicas guiadas por ações enzimáticas. A maior parte dos
78 tecidos constituintes do nosso corpo apresenta enzimas capacitadas para a oxidação
79 de etanol, porém, atividades metabólicas significativas ocorrem apenas no fígado e,
80 em menor quantidade, no estômago (LIEBER; ABITTAN, 1999). Sendo sua porta de
81 entrada, o etanol é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, onde apenas 2–
82 10% do que é ingerido é retido e eliminado através dos pulmões e rins, sendo a
83 porcentagem restante oxidada por outras regiões do organismo (LIEBER; ABITTAN,
84 1999).

85 Ao ser ingerida, esta substância é primeiramente absorvida pelas mucosas da
86 boca, e em seguida, é direcionada para o estômago, local onde é oxidada devido a
87 um processo extremamente importante para a concentração de álcool no sangue,
88 denominado metabolismo de primeira passagem (ZAKHARI, 1993). Neste processo,
89 uma parte do álcool ingerido não entra no sistema circulatório, e com isso, acaba

90 sendo oxidada por formas isomórficas das enzimas Álcool Desidrogenase (ADH),
91 fazendo com que ocorra uma modulação na toxicidade do etanol no organismo
92 (CEDERBAUM, 2012).

93 No entanto, apenas 10% do álcool é consumido pelo estômago, e para que seu
94 ciclo metabólico continue, ele precisa ser enviado para o intestino delgado (JUNG;
95 NAMKOONG, 2014). O intestino é responsável pela maior parte da absorção do
96 álcool, sendo consumido de forma rápida e intensa, especialmente em condições de
97 jejum (HOFFMAN; CARBONELL; MONTORO, 1996). Contudo, apesar da grande
98 contribuição destes órgãos na assimilação do álcool no organismo, o principal órgão
99 responsável pela metabolização do álcool é o fígado, sendo ele encarregado de
100 metabolizar 90% do que foi ingerido (JUNG; NAMKOONG, 2014).

101 No fígado, o organismo é desintoxicado e o etanol é eliminado através de uma
102 série de alterações metabólicas de reações oxidativas, onde a primeira reação é
103 realizada por uma enzima, a ADH (VIEIRA, 2012). Nesta via, o etanol é convertido em
104 acetaldeído, processo onde o NAD (dinucleotídeo de nicotinamida-adenina) atua
105 como acceptor de hidrogênio sendo reduzido a NADH (KACHANI *et al.*, 2008). Essa
106 reação apresenta um alto fornecimento de energia do NADH para a formação de 16
107 ATP/mol de etanol, e por conta disso, a disponibilidade de NAD e atividade
108 mitocondrial limitam esse método, fazendo com que seja ativada principalmente em
109 pessoas que consomem álcool esporadicamente (KACHANI *et al.*, 2008).

110 Existem outros sistemas enzimáticos responsáveis pela metabolização do
111 álcool, sendo eles via Sistema Microssomal de Oxidação de Etanol (MEOS) e as
112 catalases, todas essas também geram como produto acetaldeído e acetato (LIEBER;
113 ABITTAN, 1999). A via MEOS é responsável por 10% do metabolismo do etanol
114 (DARÉ *et al.*, 2019). Ela via está presente no retículo endoplasmático liso dos
115 hepatócitos, e utiliza o citocromo P-450, NADPH citocromo redutase, fosfolípidos e
116 possui o NADP como acceptor de hidrogênio (KACHANI *et al.*, 2008). É um meio de
117 extrema relevância para aqueles que consomem álcool cronicamente, pois consome
118 energia em forma de ATP, porém, não gerando componentes formadores de energia
119 como NADH e por isso, apenas consomem energia invés de gerar (VIEIRA, 2012).

120 A metabolização de álcool realizado por catalases, enzimas presentes nos
121 peroxissomos, é limitada pela produção endógena de água oxigenada. Sob
122 circunstâncias fisiológicas normais, a oxidação do etanol por catalases equivale
123 menos de 2%, no entanto, o consumo de etanol induz um aumento na atividade da
124 NADPH oxidases, o que faz com que ocorra um aumento na produção de água
125 oxigenada, e assim, resulte em uma maior contribuição dessa via metabólica no
126 processo de degradação do etanol (JÚNIOR *et al.*, 1998).

127 **Efeitos do Álcool nos Ovários**

128 O ovário é um pequeno órgão de morfologia ovóide, presente na cavidade
129 abdominal, localizado mais especificamente na região pélvica da anatomia feminina.
130 Além de ser responsável pela síntese de gametas femininos num processo
131 denominado de ovogênese, o ovário atua como uma glândula endócrina temporária a
132 partir da formação do corpo lúteo, estrutura essa derivada pós-ovulação que atua na
133 produção de progesterona, além de possuir organelas associadas à produção de
134 hormônios esteroides (ABRAHAMSOHN, 2016).

135 Normalmente, pesquisas realizadas para entender os efeitos do álcool na
136 reprodução feminina estão mais direcionadas a identificar malefícios do álcool na
137 puberdade e na gestação, mas não como afetam suas estruturas reprodutivas em si,
138 em especial o ovário. Entretanto, alguns poucos registros na literatura conseguiram
139 identificar anormalidades nas funcionalidades ovarianas humanas e de roedores
140 derivadas da ingestão de álcool, como ciclo menstrual irregular, ausência de ovulação
141 e até mesmo infertilidade (EMANUELE; WEZEMAN; EMANUELE, 2002).

142 Diferentemente das gônadas masculinas, as gônadas femininas apresentam
143 uma quantidade limitada de células germinativas ao longo da sua vida sexual. Esse
144 fato faz com que sejam extremamente sensíveis a toxinas de impacto reprodutivo,
145 gerando efeitos negativos como um decréscimo na fecundidade, interrupção da
146 gravidez, entre outros danos (FAUT *et al.*, 2009). Em um estudo realizado com ratas,
147 foi observado que o álcool ocasiona uma série de efeitos danosos na fisiologia e
148 morfologia dos ovários, como uma redução do seu peso, denso estroma,

149 anormalidades nos folículos ovarianos em desenvolvimento, além da ausência de
150 corpo lúteo em alguns casos (VAN THIEL; GAVALER; LESTER, 1978).

151 A carência de corpos lúteos acarreta uma redução nos níveis de progesterona
152 do organismo, hormônios de extrema importância para a gravidez devido ao seu
153 papel na formação do endométrio (ROBERTS, 2017). Outro estudo realizado com
154 roedores demonstrou que o etanol promove alterações nas organelas das células da
155 granulosa, tais como dilatações anormais no retículo endoplasmático rugoso,
156 deslocamentos de ribossomos, além de mitocôndrias disfuncionais (FAUT *et al.*,
157 2009) .

158 Em mulheres, existe uma relação direta entre a quantidade de álcool ingerida e
159 os problemas ocasionados por ela. Segundo Mendelson; Mello (1988), 60% mulheres
160 consumidoras abusivas de álcool e 50% daquelas que bebem de forma moderada
161 (ingerem mais de três doses por dia) apresentaram problemas reprodutivos
162 significativos, como encurtamento da fase luteal, atraso na ovulação e até mesmo a
163 ausência dela. Ademais, em casos de gravidez, o álcool aumenta os riscos de aborto
164 espontâneo devido seu impacto direto nos corpos lúteos (FAUT *et al.*, 2009).

165 Além disso, devido a sua metabolização do álcool ocasionar a formação de
166 espécies reativas de oxigênio (ROS), tal estresse oxidativo promove a deterioração de
167 membrana plasmáticas, apoptose e a inibição da fertilização (CHUFFA *et al.*, 2011).
168 Ademais, ROS incita danos no DNA dos ovócitos, além de ocasionar danos na divisão
169 celular, transportes metabólicos e provocar alterações na funcionalidade de
170 mitocôndrias (TAMURA *et al.*, 2012).

171 A quantidade de doses ingeridas também está relacionada a efeitos adversos
172 na reserva ovariana, termo utilizado para se referir á quantidade de oócitos
173 armazenados por uma mulher (LI *et al.*, 2013). O consumo de bebidas alcoólicas
174 moderado ou a longo prazo provoca a diminuição do volume do ovário , número de
175 folículos antrais, aumenta o níveis séricos do hormônio Folículo Estimulantes (FSH) e
176 anormalidades menstruais, todos esses fatores possuem impacto direto na
177 quantidade oócitos disponíveis no ovário (LI *et al.*, 2013).

178 Apesar de não ser considerado um agente carcinogênico direto, o etanol
179 também pode influenciar o surgimento de neoplasias no ovário devido elevação nos
180 níveis de hormônios estrógenos e andrógenos, esses possuindo um papel importante
181 na formação de cânceres ovarianos (CHANG *et al.*, 2007). Além disso, estudos
182 também mostraram que o acetaldeído, metabólito primário de etanol, pode alterar o
183 metabolismo de folato ou metionina no organismo, mecanismo esse que ocasiona
184 instabilidade no DNA e em sua expressão gênica, pois induz um desequilíbrio no
185 processo de metilação do DNA e no seu sistema de dano/reparo (SINGLETARY;
186 GAPSTUR, 2001).

187 **Receptores Androgênicos e Estrogênicos nos Ovários**

188 Os hormônios estrógenos são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e
189 funcionamento de tecidos que constituem diversos órgãos, como por exemplo, os que
190 compõem os testículos e os ovários, sendo estes também as principais fontes desses
191 hormônios no organismo (KUIPER *et al.*, 1997) . Estes hormônios possuem a
192 capacidade de circular para dentro e fora de todas as células com extrema facilidade.
193 No entanto, são formados por um grupo específico de proteínas ligante intracelular
194 que apresentam forte conexão e afinidade, os receptores estrogênicos (ER).

195 Os receptores estrogênicos (ER) são membros da superfamília de receptores
196 esteróides nucleares, junto com 60 tipos diferentes de receptores com tal
197 característica (KLINGE, 2001). Nos mamíferos, eles são encontrados em duas formas
198 diferentes, Alfa (ER α) e Beta (ER β), ambos atuantes como transdutores de sinais e
199 fatores de transcrição moduladora da expressão de genes alvo (COUSE; KORACH,
200 1999). Devido ao fato de ter sido identificado primeiramente, ER α é considerado o
201 receptor estrógeno clássico, enquanto o ER β foi estabelecido como um segundo
202 forma existente mais recentemente na literatura (DRUMMOUND; FINDLAY, 1999).

203 ER α e ER β apesar de serem isomórficos, são expressos de formas e
204 quantidades diferentes de acordo nos diferentes órgão e tecidos. Em relação á ER α ,
205 podemos encontrar de forma mais abundantes nas células do útero e seios, enquanto
206 ER β é expresso em maior quantidade no sistema cardiovascular e no sistema
207 reprodutor masculino (TANG *et al.*, 2019). Nos ovários, os dois subtipos de receptores

208 estrogênicos podem ser encontrados, ambos tendo impacto direto no processo
209 proliferativo e de diferenciação dos folículos ovarianos. No entanto, é importante
210 mencionar que estudos mostram que existe uma predominância de ER β nas células
211 da granulosa (BRITT; FINDLAY, 2002).

212 Em relação aos hormônios androgênicos, apesar de ganharem apenas
213 destaque em estudos voltados para a reprodução e outras funcionalidades da saúde
214 masculina, eles são importantes e necessários de forma equivalente para
215 regularidade e a vitalidade feminina, além de também em quesitos patológicos. Os
216 receptores androgênicos (AR), estes pelos quais estes hormônios se aderem, são
217 membros da superfamília de receptores nucleares, assim como os estrógenos
218 (QUIGLEY *et al.*, 1995).

219 A expressão de receptores androgênicos exerce um papel essencial nas ações
220 mediadas por hormônios androgênicos em todos os mamíferos em diversas
221 funcionalidades, no entanto, eles influenciam de forma crucial o desenvolvimento de
222 folículos ovarianos, em quase todas suas fases (WALTERS, 2015). Ao longo dos
223 ovários, AR são expressos nos oócitos, células da granulosa e células da teca, mas,
224 além disso, eles são temporariamente regulados durante o desenvolvimento folicular
225 (ASTAPOVA; MINOR; HAMMES, 2019).

226 **Melatonina e seu Potencial Terapêutico**

227 A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio pertencente à classe
228 das indolaminas e é sintetizada principalmente pela glândula pineal, estrutura
229 esférica, localizada na região central do cérebro sobre o terceiro ventrículo cerebral
230 (GUERRERO; CARRILLO-VICO; LARDONE, 2007). É um composto orgânico, de
231 coloração amarelo claro, altamente lipossolúvel, com vida média variando entre 30 a
232 60 minutos, sendo transportada no plasma principalmente aderida a proteínas, em
233 especial, a albumina (MAGANHIN *et al.*, 2008).

234 Anos de pesquisa dedicada a esse hormônio essencial revelam que sua
235 síntese não se limita à glândula pineal. Fontes extra pineais de produção de
236 melatonina também foram identificadas, incluindo a retina, intestino, pele, plaquetas e
237 a medula óssea, onde embora outras regiões possam contribuir para a produção, elas

238 não apresentam grande significância sistêmica comparada às principais
239 (CLAUSTRAT; LESTON, 2015).

240 A síntese de melatonina é iniciada em resposta a sinais foto periódicos que
241 seguem o ciclo claro/escuro. Esses sinais são transmitidos da retina por meio de um
242 oscilador endógeno localizado no núcleo supraquiasmático do cérebro, conhecido
243 como um dos relógios biológicos humanos. As projeções que atingem esse núcleo
244 estabelecem uma relação entre o ambiente cíclico externo e o relógio interno do
245 organismo (SOARES, 2019; PÉVET, 2002). Durante o dia, esse processo se mostra
246 quiescente, com a síntese e secreção sendo inibida com a luz. No entanto, a noite
247 obtém o seu ápice, motivo este pelo o qual a melatonina é chamada de
248 "demonstração química da escuridão" (REITER, 1991).

249 A sua biossíntese é derivada da serotonina, que por sua vez, apresenta o
250 aminoácido triptofano como seu precursor (MAGANHIN *et al.*, 2008). Primeiramente,
251 a reação se inicia quando o triptofano é hidroxilado á 5-hidrotriptofano por meio da
252 enzima triptofano hidroxilase, esse descarboxilado pela enzima l-amino, que por fim
253 formará a serotonina (SOARES, 2019). A serotonina é acetilada pela enzima N-
254 acetiltransferase (NAT), sendo ela responsável em converter a serotonina em N-
255 acetilserotonina, que em seguida é metilada através de outra enzima hidroxindol-O-
256 metil-transferase (HIOMT), tendo como produto final, a melatonina (MALHOTRA;
257 SAWHNEY; PANDHI, 2004; SOARES, 2019).

258 Uma vez sintetizada, a melatonina é liberada no sistema vascular, percorrendo
259 tecidos, fluidos e compartimentos celulares como o cérebro, folículos pré ovulatórios,
260 sêmen, líquido amniótico e leite materno (GUERRERO; CARRILLO-VICO; LARDONE,
261 2007). Interferências na produção endógena de melatonina impactam de maneira
262 negativa a progressão de fatores de riscos que promovem doenças cardiovasculares,
263 neurodegenerativas, hipertensão e câncer (TAN *et al.*, 2015; CHITIMUS *et al.*, 2020).

264 Apesar de a melatonina ter sido extensivamente estudada e detectada em no
265 reino animal, estudos mais recentes comprovaram sua presença em diferentes
266 estruturas de plantas (frutos, sementes, folhas), além disso, ela também foi
267 identificada em outros filós como bactérias, protozoários e fungos (HARDELAND;
268 PANDI-PERUMAL, 2005; CLAUSTRAT; LESTON, 2015). Posto que seres

269 unicelulares não apresentem órgãos e mecanismos de sinalização tão complexos, a
270 melatonina atua como um antioxidante para esses organismos, devido a sua atuação
271 na prevenção de radicais livres induzidos por ambientes estressores (REITER; TAN;
272 GALANO, 2014).

273 Os efeitos antioxidantes exercidos pela melatonina atuam por mecanismos
274 diretos e indiretos, sendo um incomparável protetor endógeno contra radicais livres
275 altamente tóxicos derivados do oxigênio e nitrogênio, onde seus principais
276 mecanismos de ação são a eliminação de radicais livres e a proteção de mitocôndrias
277 contra estresses oxidativos (CHITIMUS *et al.*, 2020). Em consequência da sua ação
278 antioxidante, a melatonina reduz a peroxidação de lipídeos, preservando a fluidez das
279 membranas, além de proteger as proteínas da degradação oxidativa (MAYO *et al.*,
280 2017). A melatonina consegue se distinguir de outros oxidantes clássicos devido a
281 sua reação em cascata, onde a mesma e seus metabólitos secundários e terciários
282 conseguem eliminar numerosos derivados tóxicos do oxigênio, com a capacidade de
283 até 10 espécies reativas de oxigênio (ROS), diferente de antioxidantes clássicos como
284 as vitaminas C, E, o NADH e a glutatona que eliminam um ou menos ROS (TAN *et*
285 *al.*, 2015).

286 Devido ao seu potencial antioxidante, a melatonina apresenta uma série de
287 benefícios cruciais para a homeostase do organismo. Essa indolamina desempenha
288 um papel protetor notável no trato gastrointestinal, onde demonstra a capacidade de
289 prevenir ulcerações. Ela alcança esse efeito ao reduzir a secreção do ácido
290 hidrocloreídrico e neutralizar as ações oxidativas dos ácidos biliares no epitélio
291 intestinal. Esse processo é facilitado pelo aumento da produção de bicarbonato na
292 região correspondente (TORDJMAN *et al.*, 2017). Para além de sua ação protetora no
293 trato gastrointestinal, a melatonina também exerce um papel importante na diminuição
294 de fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares, como hipertensão,
295 isquemia, hipertrofia cardíaca, que em alguns casos pode levar a falência cardíaca,
296 além disso, estudos a categorizam como uma potente inibidora de drogas de alta
297 toxicidade para o coração, sendo ela uma grande aliada deste órgão (YANG *et al.*,
298 2013).

299 Além de suas influências já mencionadas, a melatonina emerge como uma
300 parceira no tratamento de doenças metabólicas, incluindo a obesidade, dislipidemia,
301 hipertensão e pré-diabetes, desempenhando um papel significativo neste cenário por
302 meio de suas propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias
303 (CHITIMUS *et al.*, 2020). A melatonina atua como agente pró-apoptótico em uma
304 variedade de tipos de câncer, tais como neuroblastoma, hepatocarcinoma, glioma e
305 linfoma. Esse composto exhibe concentrações substanciais em células neoplásicas, o
306 que contribui para a inibição da proliferação e/ou indução da diferenciação,
307 particularmente em células neurais (BIZZARRI *et al.*, 2013).

308 **Efeitos da Melatonina nos Ovários**

309 Por muito tempo, as ações benéficas da melatonina se mostravam voltadas
310 apenas para o sistema nervoso central. No entanto, hoje sabe-se que a melatonina
311 apresenta um papel de extrema importância no ciclo reprodutivo dos mamíferos, uma
312 vez que atua como uma mediadora na percepção das condições ambientais,
313 sinalizando se estão propícias ou não para a cópula e o nascimento das crias
314 (ROCHA *et al.*, 2011).

315 Estudos focados na ação da melatonina na reprodução têm observado sua
316 influência no eixo hipotálamo hipófise. A melatonina possui a capacidade de regular a
317 secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH) de neurônios
318 hipotalâmicos, sendo este responsável por induzir a secreção do Hormônio
319 Luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (DUBOCOVICH *et al.*, 2003). Além
320 disso, a melatonina regula a maturação sexual, estro sazonal, comportamento
321 reprodutivo, homeostase redox, e também promove a proteção dos gametas (ZHANG
322 *et al.*, 2017).

323 Com a identificação de sítios de ligação e a caracterização de receptores de
324 melatonina nos ovários de ratas (MT1 e MT2), além da observação sua capacidade
325 de ligação ser alterada conforme os ciclos reprodutivos, o interesse pelo uso da
326 melatonina na reprodução feminina tem apresentado um substancial aumento
327 (MAGANHIN *et al.*, 2008; OTSUKA, 2018). Estudos também demonstraram a
328 presença de concentrações elevadas de melatonina em folículos pré-ovulatórios

329 humanos, além da caracterização de seus receptores nas células da granulosa,
330 trazendo evidências a respeito da influência melatonina das funcionalidades ovarianas
331 tanto de seres humanos como ratas (NILES *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2017).

332 Dados obtidos mais recentemente informam que a melatonina atua sim de
333 forma direta na fisiologia do ovário, se mostrando presente esteroidogênese,
334 produção de progesterona, maturação oócitos, ovulação, além de também estar
335 relacionada com a modulação do ciclo reprodutivo, desenvolvimento folicular e
336 implantação embrionária (MAGANHIN *et al.*, 2008; TAKAHASHI; OGIWARA, 2021; AL
337 SHAHAT *et al.*, 2022). Na maturação de oócitos, a melatonina atua em vias de
338 sinalização celular que afetam positivamente este processo, além de ativar enzimas
339 antioxidativas, promover a expansão de células cumulus, fatores de maturação do
340 oócito, metilação do DNA e acetilação de histonas (YONG *et al.*, 2021).

341 Devido a sua natureza lipofílica, a melatonina apresenta facilidade em penetrar
342 em qualquer membrana celular e tecidos, mas uma vez que entra no sistema, a
343 melatonina se concentra particularmente nos ovários (YONG *et al.*, 2021). Em
344 humanos, as concentrações de melatonina nos fluidos ovarianos apresentam maiores
345 concentrações do que no que encontramos no sangue, sendo estas intensificadas
346 pelo crescimento folicular e durante a ovulação (OTSUKA, 2018).

347 Não somente de forma endógena a melatonina se mostra aliada nos
348 mamíferos. A eficácia do uso da melatonina exógena na modificação em
349 particularidades de estruturas reprodutivas vem sendo amplamente observada em
350 diversas espécies, isso variando conforme a idade do animal e tempo de
351 administração da melatonina em relação aos ciclos claro/escuro ou fase do ciclo estral
352 (SRINIVASAN *et al.*, 2009)

353 De acordo com alguns estudos onde animais foram submetidos a
354 pinealectomia, a ausência de melatonina provocou um decréscimo na ovulação em
355 conjunto com diversas modificações histológicas, como uma redução nos números de
356 corpos lúteos, aumento das células da teca e das camadas de células intersticiais,
357 além dos ovários apresentaram formação de microcistos (CIPOLLA-NETO *et al.*,
358 2022). No entanto, de forma contrária a esse efeito, a administração de melatonina
359 em animais pinealectomizados demonstrou uma atenuação na proliferação de

360 estruturas ovarianas, como as células da teca, além de intensificar a produção de
361 corpos lúteos e progesterona (ROMEU *et al.*, 2010).

362 Sendo a ovulação um fenômeno reprodutivo que se assemelha a um processo
363 inflamatório, gerando ROS naturalmente com a ruptura folicular, o aumento na
364 formação desses radicais livres impacta negativamente a maturação de oócitos, a
365 fertilização e o desenvolvimento embrionário, além de causar atresia folicular e reduzir
366 a quantidade de oócitos (TAMURA *et al.*, 2020). A melatonina presente nos folículos
367 pré ovulatórios com seu potencial antioxidante, consegue reduzir tais danos,
368 promovendo a proteção dos oócitos e células da granulosa (TAMURA *et al.*, 2020).

369 De acordo com um estudo realizado por Zonta e colaboradores (2017), a
370 melatonina reduz a massa e volume de cânceres presentes no ovário, através de sua
371 ação apoptótica e antiproliferativa no desenvolvimento dessas neoplasias. Em adição,
372 o uso terapêutico da melatonina em longo prazo reduz fatores de crescimento
373 angiogênicos como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), em
374 carcinomas ovarianos, devido a sua ação redutora na densidade de microvasos,
375 provando ser um aliado na inibição da neovascularização em tecidos ovarianos.

376 Devido a todas as evidências de que o uso terapêutico da melatonina é de fato
377 promissor na reprodução feminina, esta indolamina é utilizada na reprodução humana
378 assistida. A administração de melatonina em mulheres com problemas de fertilidade
379 causa o aumento das concentrações foliculares deste hormônio, reduzindo assim o
380 estresse oxidativo, além de promover oócitos de melhor qualidade e quantidade de
381 oócitos maduros, de forma que melhore a taxa de fertilização e maiores chances de
382 gravidez (TAMURA *et al.*, 2020).

383

384 INTRODUÇÃO

385 O consumo de bebidas alcoólicas é uma prática existente desde os primórdios
386 da sociedade, e com isso, ao longo da sua existência carrega consigo impacto
387 econômico, social, religioso, mas principalmente, tem seu grande triunfo quando se
388 trata da saúde humana e seus efeitos colaterais. Sendo marcado como o melhor e
389 mais conhecido meio de atingir estados alterados de consciência (MARSHALL, 1979),
390 não há dúvidas que a ingestão exacerbada de álcool possa ocasionar dependência
391 química, além de doenças físicas como pancreatite crônica e cânceres (HENDRIKS,
392 2020). No entanto, pouco é discutido sobre os efeitos do álcool na reprodução,
393 especialmente a feminina.

394 Conforme os papéis de gênero foram se tornando menos restritivos, as
395 mulheres foram se inserindo cada vez mais em novos espaços, como o mercado de
396 trabalho, e com isso, o acesso ao álcool acompanhou esta mudança social. A taxa de
397 consumo de bebidas alcólicas entre mulheres ainda é menor do que a dos homens,
398 mas essa distância é um tanto estreita. Na última década, o alcoolismo entre o público
399 feminino teve um aumento de 84%, enquanto o masculino atingiu 35% (GRANT *et al.*,
400 2017). Este aumento progressivo é um tanto preocupante já que biologicamente, o
401 sexo feminino é mais vulnerável aos efeitos deletérios do álcool (SACCO *et al.*, 2009).

402 O organismo feminino apresenta diferentes reações ao consumo de álcool
403 devido a algumas características fisiológicas divergentes. As mulheres possuem um
404 menor volume de água distribuída pelo corpo, maior concentração de gordura
405 corporal, além disso, uma reduzida quantidade de enzimas responsáveis pela
406 metabolização do álcool (SIMÃO *et al.*, 2002). Essa característica única faz com que
407 atinjam níveis maiores de álcool no sangue que um homem, mesmo que consumam a
408 mesma quantidade de bebidas alcólicas (GABRIEL *et al.*, 1998). Fatos como esse
409 demonstram que as mulheres apresentam maior susceptibilidade de desenvolver
410 problemas de saúde relacionados ao alcoolismo, incluindo nisto transtornos
411 reprodutivos.

412 Apesar ainda existir muitas incógnitas acerca de quanto o álcool pode afetar a
413 reprodução feminina, o consumo moderado e exacerbado de bebidas alcólicas já se
414 mostra correlacionado com diversos transtornos reprodutivos, acarretando desde

415 anormalidades no ciclo menstrual como amenorreia, anovulação e insuficiência da
416 fase lútea, até condições como hiperprolactinemia e principalmente, doenças
417 ovarianas (HUGUES *et al.*, 1980). Sendo o ovário o órgão responsável pela produção
418 de gametas femininos, ele também atua de forma assídua na síntese e controle dos
419 hormônios sexuais andrógenos e estrógenos.

420 Para que atuem de forma eficiente, os ovários possuem receptores dos
421 hormônios andrógenos e estrógenos na sua morfologia, sendo estes de extrema
422 importância para as funcionalidades ovarianas. Os receptores estrogênicos (ER) são
423 fundamentais para a manutenção da diferenciação das células da granulosa,
424 crescimento e desenvolvimento de ovócitos e folículos ovarianos e a decorrência da
425 ovulação (TANG *et al.*, 2019). Já os receptores androgênicos (AR), apesar de serem
426 normalmente correlacionados com a sexualidade masculina, há evidência clínicas que
427 mulheres submetidas altos níveis de hormônios androgênicos podem desenvolver
428 algumas patologias como Síndrome do Ovário Policístico (WALTERS, 2015).

429 A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio conhecido principalmente
430 por sua atuação no ciclo sono vigília dos seres vivos, vem despertando interesse
431 nestes últimos anos em relação a sua ação no sistema genital feminino, devido a
432 identificação de sítios de ligação e receptores de melatonina no ovário de ratas, além
433 da correlação de níveis séricos deste hormônio com distúrbio de ovulação em
434 mulheres (MAGANHIN *et al.*, 2008). Levando em consideração os efeitos negativos
435 do álcool na reprodução feminina, a melatonina se torna um potencial terapêutico
436 para anormalidades causadas pelo álcool. No entanto, estudos como esse precisam
437 ser realizados para a obtenção de novos resultados.

438 **OBJETIVOS**

439 **Geral:**

440 Avaliar se a melatonina administrada durante a gestação pode prevenir os
441 efeitos deletérios produzidos pelo álcool no ovário

442 **Específicos:**

- 443 • Analisar o peso e o índice organossomático do ovário;
- 444 • Analisar histologicamente o ovário;
- 445 • Avaliar a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos;
- 446 • Avaliar morfometricamente o ovário;
- 447 • Avaliar histoquimicamente o ovário.

448

449 **MATERIAL E MÉTODOS**

450 Foram utilizadas 15 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), pesando
451 aproximadamente entre 200 ± 30 g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do
452 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da UFRPE com aprovação da
453 Comissão de Ética Institucional (CEUA) sob nº 5329121120. Os animais foram
454 mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*, permanecendo em
455 condições padrões de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ com período de luz entre 06:00 – 18:00 h, divididos
456 em três grupos da seguinte maneira:

457

- 458 • Controle - Ratas que não receberam álcool durante a gestação;
- 459 • Álcool - Ratas submetidas ao consumo de álcool durante a gestação;
- 460 • Álcool + mel - Ratas submetidas ao consumo de álcool e tratadas
461 simultaneamente com melatonina durante a gestação.

462

463 *Acasalamento dos Animais:*

464 As fêmeas dos experimentos foram colocadas para acasalar na proporção de
465 um macho para cada três fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). No dia

466 seguinte, foram realizados exames colpocitológicos, método onde hastes de algodão
467 umedecidas em soro fisiológico são introduzidas no canal vaginal do animal com
468 movimentos rotatórios. Com isso, o material coletado é transferido para lâminas
469 histológicas, onde são submetidos ao método de coloração de Shorr-Harris, sempre
470 no período da manhã (06:00h), para a confirmação do acasalamento, tomando se
471 com parâmetro a presença de espermatozoides. Se confirmado, este é considerado o
472 primeiro dia de prenhez.

473

474 *Indução do alcoolismo:*

475 Foi administrado, por gavagem intragástrica, a dosagem de 3 g/Kg de álcool
476 etílico em ratas durante a prenhez (VARLINSKAYA *et al.*, 2001; ARAÚJO-FILHO *et*
477 *al.*, 2007; SCHEIDT *et al.*, 2015; MARCO *et al.*, 2017).

478

479 *Tratamento melatonina:*

480 A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co., St. Louis,
481 USA) foi administrada em injeções diárias de 0,8 mg/Kg, por toda a gestação. Para
482 tanto, a melatonina foi dissolvida em 0,2 mL de etanol e diluída em 0,8mL NaCl a
483 0,9%. As injeções foram aplicadas via intraperitoneal, sempre no período das 18:00h
484 às 19:00h. (PAGET; BARNE, 1994; MOUSTAFA *et al.*, 1999; ABD-ALLAH *et al.*,
485 2003).

486

487 *Histopatologia e Histoquímica:*

488 Após 20 dias de tratamento, as fêmeas foram eutanasiadas com hidrocloreto
489 de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) associados a tiopental (100mg/kg) por
490 via intramuscular, para remoção dos ovários, que foram pesados e em seguida,
491 fixados em formol tamponado a 10% durante 48 horas . Após a fixação, o material foi
492 desidratado em álcool etílico, diafanizado pelo xilol e impregnado em parafina para
493 sua inclusão e posterior cortes no micrótomo ajustado em 5 µm por corte. Os cortes
494 foram colocados em lâminas histológicas e foram submetidos á técnica de coloração

495 pela Hematoxilina Eosina (H.E.) para análise de rotina histopatológica, e para
496 histoquímica foi utilizado Tricômico de Mallory para a quantificação de colágeno.

497

498 *Cálculo do Índice Organossomático:*

499 Foi utilizado para observação do aumento dos ovários como um indicativo da
500 ação do álcool. Para tanto foi calculado a razão entre os pesos dos órgãos e peso
501 corpóreo de cada animal para a obtenção de seus respectivos índices
502 organossomáticos como na figura abaixo:

503

$$504 \quad IO = \frac{PO}{PC} \times 100$$

505

506 Onde: IO: Índice Organossomático/ PO: Peso do órgão/ PC: peso corporal.

507

508 *Análise Morfométrica:*

509 Para determinar a percentagem da área ovariana ocupada pelos folículos, as
510 lâminas foram observadas em uma ocular de 10x, contendo no interior um retículo de
511 WEIBEL com 25 pontos. Foram utilizadas cinco lâminas nas quais foram contados os
512 pontos que incidiram sobre os folículos, com uma objetiva de 10x. Foram
513 determinados quatro campos no ovário, sendo contados 100 pontos por animal,
514 totalizando 500 pontos por grupo.

515

516 *Imunohistoquímica receptor de andrógeno e estrógeno:*

517 Foram utilizados os anticorpos ER β (B-3) SC-373853 e AR (441) SC-7305,
518 ambos da Santa Cruz Biotechnology, na proporção de diluição de 1: 100 em PBS 5%.
519 As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois, respectivamente. A
520 recuperação do antígeno foi realizada através da solução tampão de citrato (pH 6) em
521 alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida
522 pela solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação inespecífica
523 antígeno-anticorpo será bloqueada pela albumina de soro bovino a 5% (BSA) por 1

524 hora. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpos em câmara úmida a
525 temperatura ambiente por 1h. Em seguida, foram tratados com Histofine (Cod.
526 414191F, N- Nicherei Biosciences, Tóquio, Japão) por 30 min. A reação antígeno-
527 anticorpo nos cortes foi observada através da aplicação do cromógeno 3,3'-
528 diaminobenzidina por 4 min e contra-corado com hematoxilina. As imagens foram
529 capturadas por uma câmera de vídeo Sony acoplada ao microscópio OLYMPUS BX-
530 50. A contagem das células marcadas foi realizada usando um retículo WEIBEL de
531 25 pontos, seguido por uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas por grupo,
532 onde foram analisados quatro campos nos ovários com uma objetiva de 10x. Em cada
533 campo, 300 células dos folículos ovarianos foram contadas e transformadas em
534 porcentagem de células marcadas (Weibel 1963).

535 *Análise estatística:*

536 Para a análise estatística do peso dos ovários, índice organossomático,
537 morfometria, histoquímica, e dos receptores de andrógenos e estrógenos foi utilizado
538 o método não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).

539

540 **RESULTADOS**

541 A análise histopatológica dos ovários das fêmeas dos grupos controle e Álcool +
542 Mel apresentaram folículos em desenvolvimento, além de vários corpos lúteos
543 indicando que as ratas estavam ciclando normalmente. Porém, nos ovários de ratas
544 prenhes submetidos ao consumo crônico de álcool por toda sua gestação,
545 evidenciando-se a presença de folículos em forma de cistos, fato que sugere a quebra
546 da ciclicidade estral e retenção folicular destes animais (Figura 1A-C).

547 A análise histoquímica para as fibras colágenas nos ovários mostrou que estas
548 estavam e distribuídas no estroma ovariano, tanto na região cortical, como na região
549 medular, nas fêmeas dos grupos controle e álcool. Estas características foram
550 também observadas nos ovários das fêmeas do grupo álcool + mel, porém com
551 menor intensidade. A análise quantitativa do colágeno revelou aumento significativo
552 nos ovários do grupo álcool em relação aos demais grupos. Os ovários das fêmeas
553 do grupo álcool + mel apresentaram o menor teor de colágeno, diferindo do controle,
554 que apresentou níveis intermediários (Figura 2).

555 Houve redução do índice organossomático nos ovários das fêmeas que
556 receberam álcool em relação aos grupos controle e álcool + mel (Figura 3). A análise
557 imunohistoquímica revelou marcação positiva para os receptores de estrógeno e
558 andrógenos, entretanto, a análise quantitativa desses receptores mostrou redução
559 significativa, para ambos receptores, nas ratas que receberam álcool em relação aos
560 demais grupos (Figuras 4 e 5).

561 Após análise morfométrica observou-se no grupo álcool que os ovários
562 apresentaram menor número de folículos primários, terciários e corpos lúteos. Por
563 outro lado houve aumento no número de folículos secundários e folículos atrésicos
564 (Tabela 1).

565

566 |

567

568

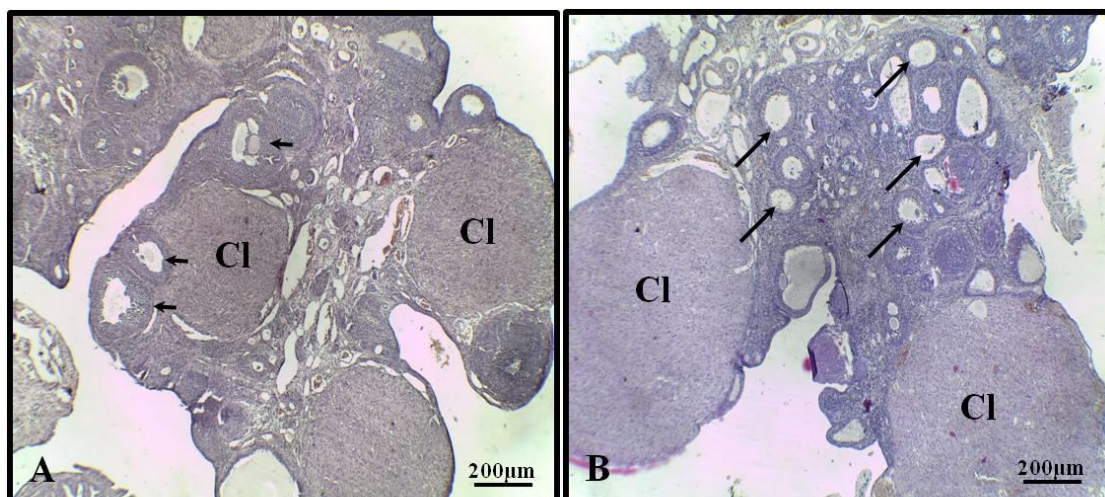
569

570

571

572

573



574

575

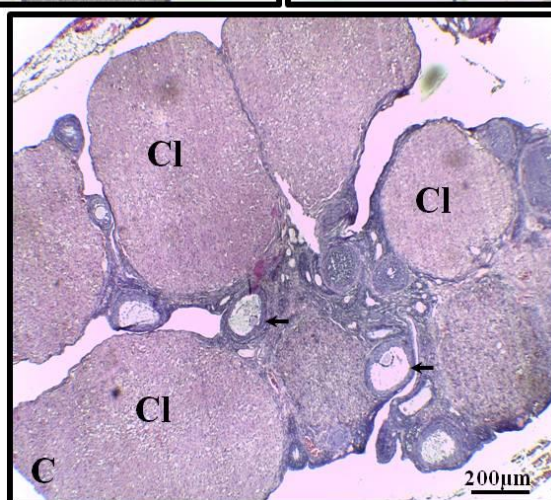
576

577

578

579

580



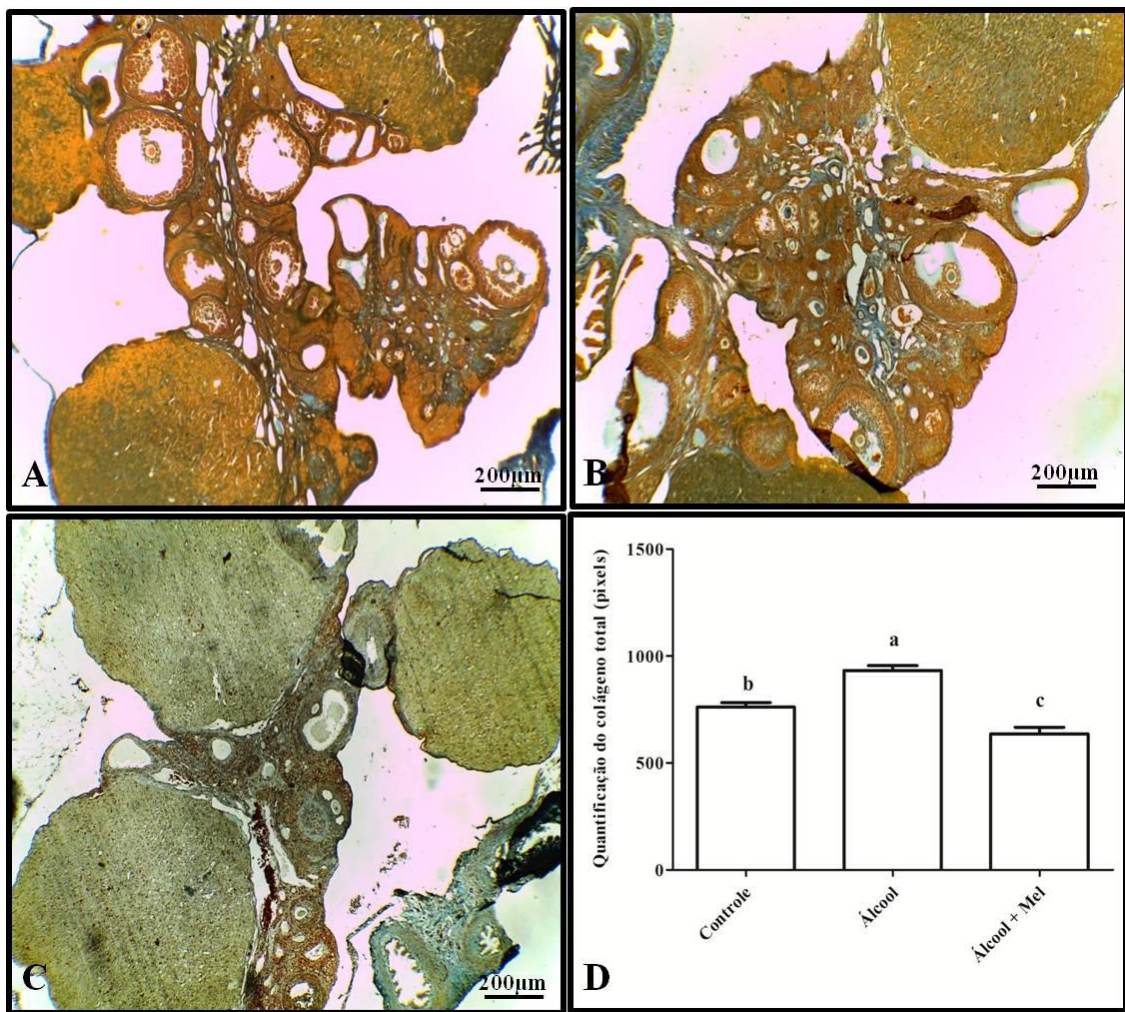
581

582 Figura 1: Fotomicrografia dos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. A –
583 controle; B – álcool e C – álcool + mel. Verificar em A e C corpos lúteos (CI), alguns
584 folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas curtas). Notar em B
585 folículos em forma de cistos (setas longas). Coloração H.E.

586

587

588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602



603 Figura 2: Histoquímica para o colágeno nos ovários das fêmeas dos grupos
604 experimentais. A – controle; B – álcool e C – álcool + mel. Observar marcação mais
605 intensa em A e B, e menos intensa em C. Em D quantificação do colágeno. Notar
606 aumento significativo no grupo álcool e redução no grupo álcool + mel. Coloração
607 Tricrômico de Mallory. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
608 significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum
609 ($p < 0,05$).

610
611

612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629

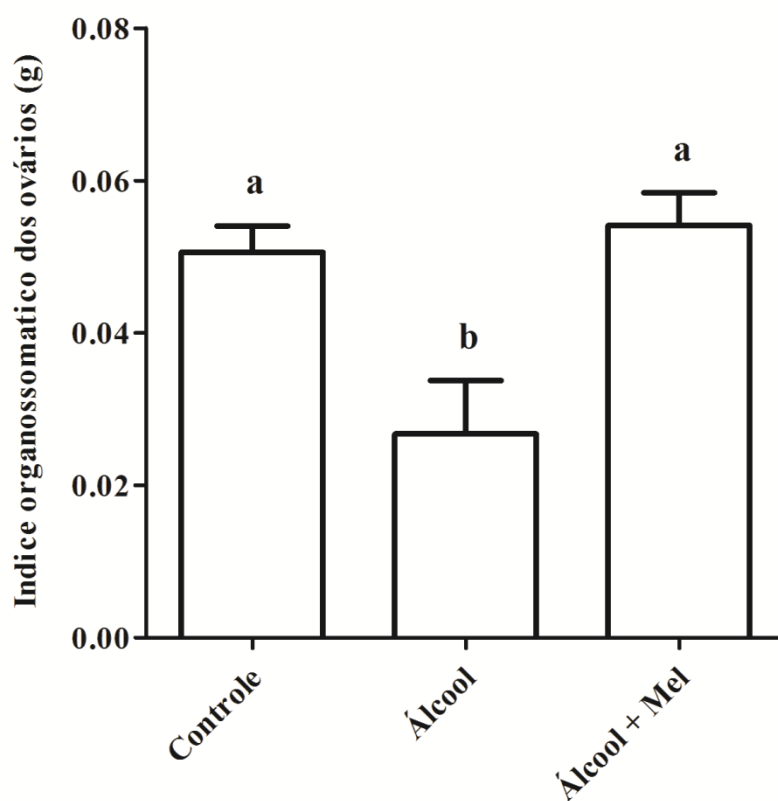


Figura 3: Índice organossomático dos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. Verificar redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).

630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650

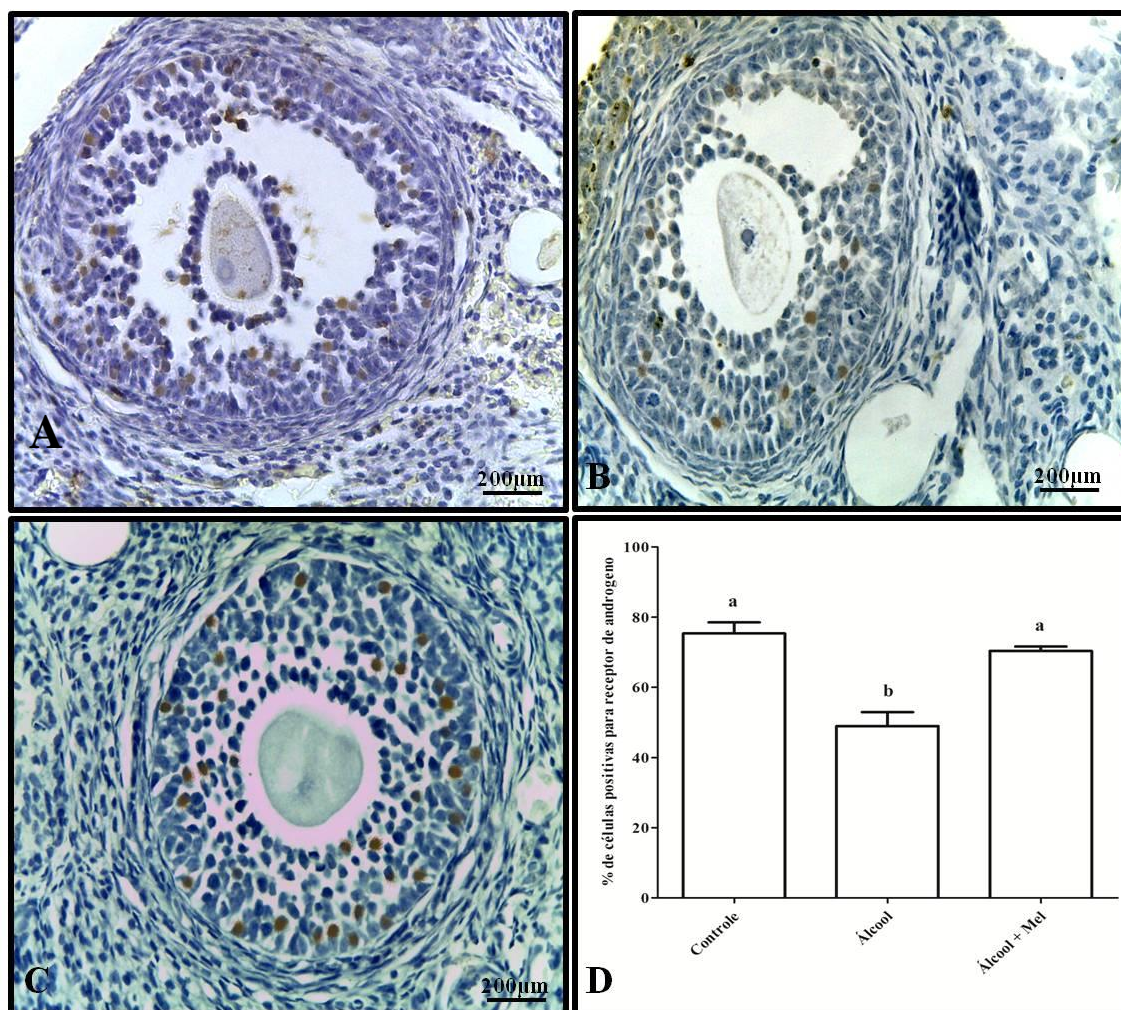


Figura 4: Imunohistoquímica para receptor de andrógeno. A – controle; B – álcool e C – álcool + mel. Observar marcação mais intensa em B. Notar que A e C apresentam marcações semelhantes. Em D quantificação das células andrógeno positivas. Notar redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).

651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671

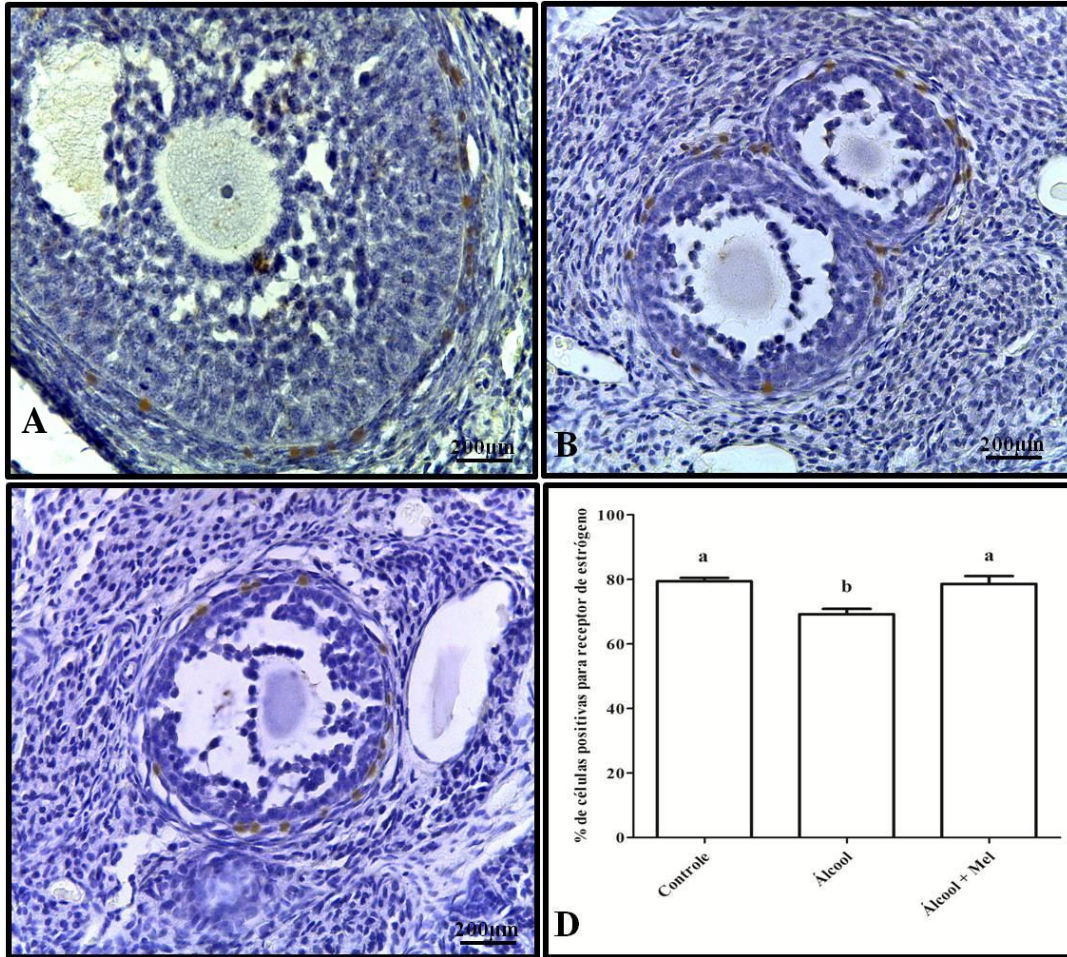


Figura 5: Imunohistoquímica para receptor de estrógeno. A – controle; B – álcool e C – álcool + mel. Observar marcação mais intensa em B, enquanto A e C apresentam marcações semelhantes. Em D quantificação das células estrógeno positivas. Notar redução significativa no grupo álcool. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).

672 **Tabela 1.** Medias dos dados morfométricos dos ovários das ratas dos grupos
673 experimentais.

%	Controle	Álcool	Álcool + Mel	p
Folículo primário	9,65 ± 1,21a	5,87 ± 1,73b	8,22 ± 1,01a	0,0112
Folículo secundário	13,65 ± 0,95b	38,54 ± 1,34a	12,85 ± 0,64b	0,0002
Folículo terciário	40,11 ± 3,20a	33,66 ± 1,50b	38,80 ± 1,46a	0,0342
Corpo lúteo	35,00 ± 2,09a	13,96 ± 1,61b	38,08 ± 3,40a	0,0265
Folículo atresico	1,59 ± 0,35b	7,97 ± 0,55a	1,73 ± 1,23b	0,0109

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em post-hoc de Dum ($p < 0,05$).

674

675 **DISCUSSÃO**

676 Devido os complexos feedbacks hormonais que regulam os ciclos menstruais,
677 alinhada com a rápida metabolização do álcool no organismo, entender como a
678 substância impacta a reprodução feminina, em especial a morfologia e fisiologia dos
679 ovários se torna um grande desafio, carecendo assim de estudos detalhados e
680 abrangentes acerca desta problemática (SCHLIEP *et al.*, 2015). No entanto, o
681 alcoolismo já foi correlacionado com alguns desequilíbrios nas funcionalidades
682 reprodutivas femininas como problemas de fertilidade, anormalidades no ciclo
683 menstrual e mudanças nas características sexuais secundárias (VAN THIEL;
684 GAVALER; LESTER, 1978).

685 No estudo em questão, foram observadas no grupo Álcool, alterações na
686 morfologia e desenvolvimento de folículos, como a formação de cistos, resultados
687 estes não formulados nos Controle e Álcool + mel, pois demonstram normalidade no
688 desenvolvimento folicular e ciclicidade dos animais. De acordo com Kukura *et al*
689 (2010), lesões ovarianas císticas representam falhas no fluído folicular de forma que
690 ocasiona o desenvolvimento incompleto dos folículos. Visto que o etanol suprime o
691 Eixo-Hipotálamo-Hipófise-Gonadal, as concentrações de LH e FSH sofrem um
692 decréscimo em conjunto com a produção de estradiol e progesterona, de tal forma
693 que a maturação de folículos e a ovulação sejam comprometidas, acarretando assim
694 quebra dos ciclos reprodutivos (ALFONSO; DURÁN; MARCÓ, 1992; EMANUELE *et*
695 *al.*, 2005).

696 Por sua vez, a melatonina associada ao álcool (Álcool+Mel), foi capaz de
697 prevenir as possíveis alterações ocasionadas pelos efeitos danosos do álcool,
698 mantendo a maturação de folículos semelhantes a do grupo controle, proporcionando
699 o desenvolvimento ideal para os folículos ovarianos e assim, a normalidade nos ciclos
700 das ratas. Resultado semelhante foi observado em estudo realizado por Tamura *et al.*
701 (2020), onde animais tratados com melatonina apresentaram um número significativo
702 de folículos ovarianos remanescentes em diferentes estágios de desenvolvimento,
703 além de uma grande quantidade de oócitos ovulados, sendo maior que no grupo
704 controle.

705 Na análise histoquímica para fibras colágenas, foi detectada no grupo Álcool
706 uma maior expressão de colágeno quando comparadas aos grupos Controle e Álcool
707 + Mel. Sendo o colágeno uma das moléculas que compõem a matriz extracelular
708 responsável por manter a integridade dos tecidos, o excesso em sua produção indica
709 que temos um possível desequilíbrio no processo de remodelação de tecidos
710 lesionados, gerando desconfigurações na arquitetura do tecido e o comprometimento
711 do funcionamento do órgão, características de um quadro de fibrose (BRILEY *et al.*,
712 2016). Considerando que no ovário já foram detectados metabólitos de etanol
713 responsáveis por ocasionar quadros de estresse oxidativo como o acetiladeido, ele se
714 torna suscetível a danos que causem modificações direta na sua ultraestrutura, além
715 de, conseqüentemente, reduzir a quantidade de ovócitos funcionais e a síntese de
716 hormônios responsáveis pelo desenvolvimento de células reprodutivas (FAUT *et al.*,
717 2009). Por outro lado, a melatonina associada ao álcool pode ter agido contra o
718 estresse oxidativo evitando o estabelecimento de uma fibrose ovariana (Zhang *et al.*,
719 2019).

720 O índice organossomático, análise crucial para o entendimento de como um
721 órgão está respondendo a mudanças ambientais, demonstrou uma redução
722 significativa no peso do ovário de ratas submetidas ao consumo de álcool em relação
723 ao peso seu corporal. Assim como demonstrou o estudo realizado por Moritiwon *et al*
724 (2021), onde as ratas albinas submetidas ao consumo bebidas alcólicas tradicionais
725 s apresentaram uma drástica diminuição no peso dos ovários, em conjunto com o
726 útero. Devido a sua capacidade de reduzir as concentrações de estradiol circulantes
727 por meio da produção e ativação de óxidos nítricos, o álcool ocasiona um decréscimo
728 no volume de órgãos alvo da ação de hormônios estrogênicos, desencadeando
729 apoptose (VAN THIEL; GAVALER; LESTER, 1978; LI *et al.*, 2013). Sabe-se que a
730 melatonina possui propriedades antiapoptóticas, o que pode ter prevenido os efeitos
731 do álcool. De fato, de acordo com Liu *et al.* (2022), este hormônio foi capaz de
732 prevenir a redução do peso do ovário e danos em sua morfologia, através da inibição
733 de apoptose nas células da granulosa, além da inibição das vias de autofagia celular
734 (PI3K/AKT/mTOR) nestes órgãos.

735 As análises morfométricas realizadas no presente estudo indicaram no grupo
736 álcool uma redução no número de folículos primários e corpos lúteos. Tais resultados
737 são consequências da intervenção negativa do álcool no desenvolvimento de
738 folículos, pois devido a sua capacidade gerar ROS no fluido folicular, o mesmo acaba
739 induzindo a apoptose das células da granulosa por meio de danos na membrana
740 celular e mitocôndria, ocasionando a fragmentação de DNA, sendo esses
741 mecanismos responsáveis por ocasionar a perda de folículos e causar
742 desregularidades na foliculogênese (MUSANEJAD *et al.*, 2021). A diminuição na
743 formação de corpos lúteos é uma indicação de que os folículos não estão
744 amadurecendo como deveriam, indicando uma redução na ovulação (KRUEGER; BO;
745 RUDEEN, 1983). Por outro lado, o grupo recebeu álcool e melatonina apresentou a
746 maior quantidade de corpos lúteos e uma quantidade menor de folículos atresícos que
747 o grupo álcool. Isso pode ser explicado pela falta da melatonina exógena contribuir
748 para o seu aumento no fluido folicular desempenhando um papel relevante na
749 prevenção da atresia folicular, através da redução da apoptose, capacitando os
750 folículos a amadurecerem completamente e promover a ovulação (GUO *et al.*, 2021).

751 Uma possível explicação para a redução observada na expressão de receptores
752 androgênicos e estrogênicos pode estar relacionada à complexa interação entre o
753 álcool e o sistema endócrino, uma vez que estudos prévios sugerem que a substância
754 é responsável por desregular o sistema endócrino além de interferir na sensibilidade
755 hormonal dos tecidos alvo (RONIS *et al.*, 2007). Além disso, a ativação de vias de
756 sinalização celular como a via de fator nuclear kappa B (NF-Kb), pode ser afetada
757 pelo consumo de álcool, este que por sua vez influencia expressão de receptores
758 estrogênicos, induzindo sua repressão, muito comum em quadros patológicos como
759 câncer de mama, neoplasia fortemente associada com a expressão destes
760 receptores, além de ser uma via mediadora na resistência das células do ovário a
761 estresses oxidativados (FRASOR *et al.*, 2015; HARRINGTON; ANNUNZIATA, 2019;).

762 Entretanto, de forma contrária a esses efeitos, o grupo Álcool+Mel apresentou
763 uma quantificação de receptores estrogênicos semelhante ao grupo controle,
764 mostrando que a melatonina apresentou um papel protetor sobre estes receptores.
765 Uma explicação para esse resultado, é que a melatonina regula negativamente a via

766 fator nuclear kappa (NF-kb), uma vez que esta via inflamatória é responsável por
767 suprimir receptores estrogênicos em situações estressoras (SHI *et al.*, 2012). Além de
768 tudo, com a presença de receptores de melatonina em células da granulosa, ela
769 regula o desenvolvimento de folículos diminuindo espécies reativas de oxigênio, o que
770 conseqüentemente contribui para a produção de hormônios esteroides de forma
771 positiva (MINGUINI *et al.*, 2019).

772 Estudos demonstram que um equilíbrio entre ações androgênicas através dos
773 seus receptores (AR), é crucial para a manutenção da taxa de ovulação e o
774 desenvolvimento folicular em níveis fisiológicos, uma vez que atua no aumento FSH,
775 este responsável por estimular P450 aromatase, enzima chave na biossíntese de 17β-
776 estradiol a partir de hormônios androgênicos (PRIZANT; GLEICHER; SEN, 2014;
777 SANTAMARÍA *et al.*, 2016). Segundo Ware (1982) e Chuffa *et al.* (2011) a melatonina
778 exógena regula a expressão dos receptores androgênicos indicando que para
779 ovulação é necessário um ambiente androgênico adequado.

780 **CONCLUSÃO**

781 Assim, os resultados deste estudo demonstram que a melatonina desempenha
782 um papel protetor na histofisiologia ovariana contra os efeitos prejudiciais do consumo
783 de etanol, principalmente sobre os impactos negativos na expressão dos receptores
784 androgênicos e estrogênicos.

785

786 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

787

788 ABRAHAMSOHN, P. **Histologia**. Rio de Janeiro: Grupo Gen - Guanabara Koogan,
789 2016.

790

791 ALFONSO, M.; DURÁN, R.; MARCÓ, J. Ethanol-induced alterations in gonadotrophins
792 secretion during the estrous cycle of rats. **Alcohol and alcoholism (Oxford,
793 Oxfordshire)**, v. 28, n. 6, 1993.

794

795 AL-SHAHAT, A.; HULAIL, M. A. E.; SOLIMAN, N. M. M.; KHAMIS, T.; FERICEAN, L.
796 M.; ARISHA, A. H.; MOAWAD, R. S. Melatonin Mitigates Cisplatin-Induced
797 Ovarian Dysfunction via Altering Steroidogenesis, Inflammation, Apoptosis,

798 Oxidative Stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK Signaling Pathway in
799 Female Rats. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2769, 2022.
800

801 ASTAPOVA, O.; MINOR, B. M. N.; HAMMES, S. R. “Physiological and Pathological
802 Androgen Actions in the Ovary”, **Endocrinology**, v. 160, n. 5, p. 1166–1174,
803 2019.
804

805 BASTOS, F. I. P. M.; VASCONCELLOS, M. T. L.; BONI, R. B.; REIS, N. B.;
806 COUTINHO, C. F. S. III National Survey on the use of drugs by the Brazilian
807 population. Rio de Janeiro: **Instituto de Comunicação e Informação**
808 **Científica e Tecnologia em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz**
809 (ICICT/FIOCRUZ), 2017; 528.
810

811 BECKER, H. C. Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse. **Alcohol Research &**
812 **Health**, v. 31, n. 4, p. 348–361, 2008.
813

814 BIZZARRI, M.; PROIETTI, S.; CUCINA, A.; REITER, R.J. Molecular mechanisms of
815 the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. **Expert Opinion on**
816 **Therapeutic Targets**, v. 17, n. 12, p. 1483–1496, 2013.
817

818 BRILEY, S. M.; JASTI, S.; MCCRAKEN, J. M.; HORNICK, J. E.; FEGLEY, B.;
819 PRITCHARD, M. T.; DUNCAN, F. E. Reproductive age-associated fibrosis in
820 the stroma of the mammalian ovary. **Reproduction**, v. 152, n. 3, p. 245–260,
821 2016.
822

823 BRITT, K.; FINDLAY, J. Estrogen actions in the ovary revisited. **Journal of**
824 **Endocrinology**, v. 175, n. 2, p. 269–276, 2002.
825

826 BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol’s Role in Gastrointestinal Tract Disorders. **Alcohol**
827 **Health and Research World**, v. 21, n. 1, p. 76–83, 1997.
828

829 CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 4, p. 667–
830 685, 2012.
831

832 CHAKRAVORTY, S.; CHAUDHARY, N. S.; BROWER, K. J. Alcohol Dependence and
833 its Relationship with Insomnia and Other Sleep Disorders. **Alcoholism, clinical**
834 **and experimental research**, v. 40, n. 11, p. 2271–2282, 2016.
835

836 CHANG, E. T.; CANCHOLA, A. J.; LEE, V. S.; CLARKE, C. A.; PURDIE, D. M.;
837 REYNOLDS, P.; BERNSTEIN, L.; STRAM, D. O.; ANTON-CULVER, H.;
838 DEAPEN, D.; MOHRENWEISER, H.; PEEL, D.; PINDER, R.; ROSS, R.K.;
839 WEST, D. W.; WRIGHT, W.; ZIOGAS, A.; HORN-ROSS, P. L. Wine and other
840 alcohol consumption and risk of ovarian cancer in the California Teachers Study
841 cohort. **Cancer Causes & Control**, v. 18, n. 1, p. 91–103, 2007.
842

843 CHITIMUS, D. M. POPESCU, M. R.; VOICULESCU, S. E.; PANAITESCU, A. M.;
844 PAVEL, B.; ZAGREAN, L.; ZAGREAN, A. M. Melatonin’s Impact on

- 845 Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and
846 Disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1211, 2020.
- 847
- 848 CHUFFA, L. G. A.; AMORIM, J. P.; TEIXEIRA, G.; MENDES, L. O.; FIORUCI, B. A.;
849 PINHEIRO, P. F. F.; SEIVA, F. R. F.; NOVELLI, E. L. B.; JUNIOR, W. M.;
850 MARTINEZ, M.; ALMEIDA, C. C. D.; MARTINEZ, F. E. Long-Term Exogenous
851 Melatonin Treatment Modulates Overall Feed Efficiency and Protects Ovarian
852 Tissue Against Injuries Caused by Ethanol-Induced Oxidative Stress in Adult
853 UChB Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, p. 1498-1508,
854 2011.
- 855
- 856 CHUFFA, L. G. A.; SEIVA, F. R. F.; FÁVARO, W. J.; AMORIM, J. P. A.; TEXEIRA, G.
857 R.; MENDES, L. O.; FIORUCI-FONTANELLI, B. A.; PINHEIRO, P. F. F.;
858 MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Melatonin and ethanol intake exert opposite
859 effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex
860 steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. **Reproductive**
861 **Toxicology**, v. 39, p. 40–49, 2013.
- 862
- 863 CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; SOARES, J. M.; GALLO, J. C. C.; FURTADO,
864 A.; CAVACO, J. E.; GONÇALVES, I.; SANTOS, C. R. A.; QUINTELA, T. The
865 Crosstalk between Melatonin and Sex Steroid Hormones.
866 **Neuroendocrinology**, v. 112, n. 2, p. 115–129, 2022.
- 867
- 868 CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neuro-**
869 **Chirurgie**, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, 2015.
- 870
- 871 COSTARDI, J. V. V.; NAMPO, R. A. T.; SILVA, G. L.; RIBEIRO, M. A. F.; STELLA, H.
872 J.; STELLA, M. B.; MALHEIROS, S. V. P. A review on alcohol: from the central
873 action mechanism to chemical dependency. **Revista Da Associacao Medica**
874 **Brasileira (1992)**, v. 61, n. 4, p. 381–387, 2015.
- 875
- 876 COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned
877 and Where Will They Lead Us? **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 3, p. 358–
878 417, 1999.
- 879
- 880 DARÉ, B.; LAGENTE, V.; GICQUEL, T. Ethanol and its metabolites: update on
881 toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. **Drug Metabolism**
882 **Reviews**, v. 51, n. 4, p. 545–561, 2019.
- 883
- 884 DOMINGUES, J. A.; TOLEDO, M. T.; MORAES, S. G. Análise histomorfológica do
885 fígado materno e fetal de ratas prenhes desnutridas submetidas á exposição ao
886 etanol. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 11, n. 3,
887 p. 9 - 17, 2009.
- 888
- 889 DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMUDEZ, M.A.; GERDIN, M. J.; MASANA, M. L.
890 Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin

- 891 receptors. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 8, p.
892 d1093-1108, 2003.
- 893
- 894 DRUMMOUND, A. E.; FINDLAY, J. K. The role of estrogen in
895 folliculogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 151, n. 1–2, p. 57–
896 64, 1999.
- 897
- 898 EMANUELE, M. A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N. V. Alcohol's Effects on Female
899 Reproductive Function. **Alcohol Research & Health**, v. 26, n. 4, p. 274–281,
900 2002.
- 901
- 902 EMANUELE, N.; LAPLAGIA, N.; KOVACS, E. J.; EMANUELE, M. A. Effects of
903 Chronic Ethanol (EtOH) Administration on Pro-Inflammatory Cytokines of the
904 Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis in Female Rats. **Endocrine
905 Research**, v. 31, n. 1, p. 9–16, 2005.
- 906
- 907 FAUT, M., CASTRO, C. R.; BIETTO, F. M.; CASTRO, J. A.; CASTRO, G. D.
908 Metabolism of ethanol to acetaldehyde and increased susceptibility to oxidative
909 stress could play a role in the ovarian tissue cell injury promoted by alcohol
910 drinking. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 8, p. 525–538, 2009.
- 911
- 912 FRANKLIN, T. A.; SANTANA, J. S.; SILVA, M. C. P.; SILVA, F. G.; SILVA, M. T. A.,
913 FERNANDES, J. D., VILELA, A. B. A. Alcoolismo e Estigma: uma análise da
914 produção científica / Alcoholism and Stigma: an analysis of scientific production.
915 **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 79257–79271, 2021.
- 916
- 917 FRASOR, J.; EL-SHENNAWY, L.; STENDER, J. D.; KASTRATI, I. NFκB affects
918 estrogen receptor expression and activity in breast cancer through multiple
919 mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 235–239,
920 2015.
- 921
- 922 GABRIEL, K.; HOFMANN, C.; GLAVAS, M.; WEINBERG, J. The Hormonal Effects of
923 Alcohol Use on the Mother and Fetus. **Alcohol Health and Research World**, v.
924 22, n. 3, p. 170–177, 1998.
- 925
- 926 GALANO, A.; TAN, D.-X.; REITER, R. Melatonin: A Versatile Protector against
927 Oxidative DNA Damage. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 530, 2018.
- 928
- 929 GRANT, B. F.; CHOU, S. P.; SAHA, T. D.; PICKERING, R. P.; KERRIDGE, B. T.;
930 RUAN, W. J.; HUANG, B.; JUNG, J.; ZHANG, H.; FAN, A.; HASIN, D. S.
931 Prevalence of 12-Month Alcohol Use, High-Risk Drinking, and DSM-IV Alcohol
932 Use Disorder in the United States, 2001-2002 to 2012-2013: Results From the
933 National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **JAMA
934 psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 911–923, 2017.
- 935
- 936 GUERRERO, J. M.; CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P. J. La Melatonina. 1041
937 Investigación y Ciencia, Barcelona, p.30-38, 2007.

938
939 GUO, Y. M.; SUN, T. C.; WANG, H. P.; CHEN, X. Research progress of melatonin
940 (MT) in improving ovarian function: a review of the current status. *Aging*, v. 13,
941 n. 13, p. 17930–17947, 2021.
942
943 HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. Melatonin, a potent agent in antioxidative
944 defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and
945 prodrug. **Nutrition & Metabolism**, v. 2, n. 1, p. 22, 2005.
946
947 HARRINGTON, B. S.; ANNUNZIATA, C. M. NF-κB Signaling in Ovarian Cancer.
948 **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1182, 2019.
949
950 HENDRIKS, H. F. J. Alcohol and Human Health: What Is the Evidence? **Annual**
951 **Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 1–21, 2020.
952
953 HOFFMANN, M. H.; CARBONELL, E.; MONTORO, L. Álcool e segurança –
954 Epidemiologia e efeitos. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 16, n. 1, p. 28-37,
955 1996.
956
957 HUGUES, J. N.; PERRET, G.; JAYLE, M. F.; SEBAOUN, J.; MODIGLIANI, E.
958 Hypothalamo-Pituitary Ovarian Function in Thirty-One Women with Chronic
959 Alcoholism. **Clinical Endocrinology**, v. 12, n. 6, p. 543–551, 1980.
960
961 JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H.
962 Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E.
963 **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 3, p. 434–449, 1998.
964
965 JUNG, Y.C.; NAMKOONG, K. Alcohol: intoxication and poisoning - diagnosis and
966 treatment. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 125, p. 115–121, 2014.
967
968 LI, N., FU, S.; ZHU, F.; DENG, X.; SHI, X. Alcohol intake induces diminished ovarian
969 reserve in childbearing age women: Alcohol induces diminished ovarian
970 reserve. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 39, n. 2, p.
971 516–521, 2013.
972
973 LIEBER, C. S.; ABITTAN, C.S. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its
974 metabolic effects and interactions with other drugs. **Clinics in Dermatology**, v.
975 17, n. 4, p. 365-379, 1999.
976
977 LIU, Y.; ZHU, X.; WU, C.; LANG, Y.; ZHAO, W.; LI, Y. Melatonin protects against
978 ovarian damage by inhibiting autophagy in granulosa cells in rats. **Clinics**, v.
979 77, p. 100119, 2022.
980
981 KACHANI, A. T.; BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P. B. O impacto do consumo
982 alcoólico no ganho de peso. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v.
983 35, p. 21–24, 2008.
984

- 985 KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response
986 elements. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 14, p. 2905–2919, 2001.
987
- 988 KUKURA, V., KRIVAK-BOLANA, I., SENTIJA, K., KATALENIC-SIMON, S. Alcohol
989 Sclerosing Ovarian Cystic Lesions, 20 Years' Experience. **Coll. Antropol**, v.30,
990 n. 1, p. 37- 40, 2010.
991
- 992 KRUEGER, W. A.; BO, W. J.; KEVIN RUDEEN, P. Estrous cyclicity in rats fed an
993 ethanol diet for four months. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.
994 19, n. 4, p. 583–585, 1983.
995
- 996 KUIPER, G. G. J. M. *et al.* Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript
997 Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . **Endocrinology**, v. 138, n.
998 3, p. 863–870, 1997.
999
- 1000 MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHUS, L. F. P.;
1001 OLIVEIRA-JUNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.;
1002 SOARES-JR, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: Uma
1003 breve revisão bibliográfica. **Revista da Associação de Médica Brasileira**, v.
1004 54, n. 3, p. 261-71, 2008.
1005
- 1006 MALHOTRA, S.; SAWHNEY, G.; PANDHI, P. The Therapeutic Potential of Melatonin:
1007 A Review of the Science. **Medscape General Medicine**, v. 6, n. 2, p. 46, 2004.
1008
- 1009 MARQUES, A. C.P. R. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de
1010 álcool e outras drogas e tratamento. **Revista Instituto de Medicina Social e**
1011 **Criminologia**. n.3, p. 73-86, 2001.
1012
- 1013 MARSHALL, M. **Beliefs, Behaviors, & Alcoholic Beverages: A Cross-cultural**
1014 **Survey**. [s.l.] Mac Marshall, 1979.
1015
- 1016 MAYO, J. C.; SAINZ, R.M.; GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, P. G.; HEVIA, D.; CERNUDA-
1017 CERNUDA, R. Melatonin transport into mitochondria. **Cellular and Molecular**
1018 **Life Sciences**, v. 74, n. 21, p. 3927–3940, 2017.
1019
- 1020 MENDELSON, J. H.; MELLO, N. K. Chronic alcohol effects on anterior pituitary and
1021 ovarian hormones in healthy women. **The Journal of Pharmacology and**
1022 **Experimental Therapeutics**, v. 245, n. 2, p. 407–412, 1988.
1023
- 1024 MINGUINI, I. P.; LUQUETTI, C. M.; BARACAT, M. C. P.; MAGANHIN, C. C.; NUNES,
1025 C. O.; SIMÕES, R. S.; VEIGA, E. C. A.; NETO, J. C.; BARACAT, E. C.;
1026 JUNIOR, J. M. S . Melatonin effects on ovarian follicular cells: a systematic
1027 review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 8, p. 1122–1127,
1028 2019.
1029
- 1030 MORITIWON, O.; OGUNDEKO, T. O.; BRITUS, J.; OYEBODE, D.; ABOBARIN, O. I.
1031 Effect of some Nigerian traditional alcoholic bevarages on the estrous cycle and

1032 histological assessment of the ovaries and uterus of albino rats. *GSC Biological*
1033 *and Pharmaceutical Sciences*, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 027–036, 2021.

1034

1035 MORSE, R. M.; FLAVIN, D. K. The definition of alcoholism. The Joint Committee of
1036 the National Council on Alcoholism and Drug Dependence and the American
1037 Society of Addiction Medicine to Study the Definition and Criteria for the
1038 Diagnosis of Alcoholism. *JAMA*, v. 268, n. 8, p. 1012–1014, 1992.

1039

1040 MUSANEJAD, E.; HAGHPANAH, T.; MIRZAI, V.; EZZATABADIPOUR, M. Effects of
1041 ethanol and nicotine co-administration on follicular atresia and placental histo-
1042 morphology in the first-generation mice pups during intrauterine development
1043 and lactation periods. *Toxicology Reports*, v. 8, p. 793–803, 2021.

1044

1045 NILES, L. P., WANG, J., SHEN, L., LOBB, D. K., YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor
1046 mRNA expression in human granulosa cells. *Molecular and Cellular*
1047 *Endocrinology*, v. 156, n. 1–2, p. 107–110, 1999.

1048

1049 OLIVEIRA, G. C.; DELL'AGNOLO, C. M.; BALLANI, T. S. L., CARVALHO, M. D. B.,
1050 PELLOSO, S. M. Consumo abusivo de álcool em mulheres. *Revista Gaúcha*
1051 *de Enfermagem*, v. 33, p. 60–68, jun. 2012.

1052

1053 OMS (Organização Mundial de Saúde). **Relatório Global sobre Álcool e Saúde**,
1054 Genebra, 2018.

1055

1056 PAGET, G. E.; BARNE, J. M. Evaluation of results: quantitative application in
1057 different species. In: LAURANCE, D. R.; BACHARACH, A. L. editors. Evaluation of
1058 drug activities: pharmacometrics, vol. 1. 9th ed. New York: Academic Press; 1994.
1059 p.161.

1060

1061 PATEL, S.; BEHARA, R.; SWANSON, G. R.; FORSYTH, VOIGT, R. M.;
1062 KESHAVARZIAN, A. Alcohol and the Intestine. *Biomolecules*, v. 5, n. 4, p.
1063 2573–2588, 2015.

1064

1065 PÉVET, P. Melatonin. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 4, n. 1, p. 57–72, 31
1066 mar. 2002.

1067

1068 POHANKA, M. Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current
1069 view. *Biomedical Papers*, v. 160, n. 1, p. 54–63, 2016.

1070

1071 PRIZANT, H.; GLEICHER, N.; SEN, A. Androgen actions in the ovary: balance is key.
1072 *Journal of Endocrinology*, v. 222, n. 3, p. R141–R151, 2014.

1073

1074 OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). Washington D.C., 2020.

1075

1076 OTSUKA, F. Modulation of bone morphogenetic protein activity by melatonin in
1077 ovarian steroidogenesis. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 17, n. 3, p.
1078 228–233, 2018.

- 1079
1080 QUIGLEY, C. A.; BELLIS, A.; MARSCHKE, K. B.; EL AWADY, M. K.; WILSON, E. M.;
1081 FRENCH, F. S. Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular
1082 Perspectives*. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 3, p. 271–321, 1995.
1083
1084 REITER, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Molecular and**
1085 **Cellular Endocrinology**, v. 79, n. 1–3, p. C153-158, 1991.
1086
1087 REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: exceeding expectations.
1088 **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 29, n. 5, p. 325–333, 2014.
1089
1090 ROBERTS, D. “The Effect of Chronic Alcohol Consumption on Ovarian
1091 Function/Morphology” .**Undergraduate Honors Theses**, p. 425, 2017.
1092
1093 ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M.
1094 C. V.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Melatonina e a reprodução
1095 animal: implicações na fisiologia ovariana. *Acta Veterinária Brasilica*, v. 5, n. 2,
1096 p. 147-157, 2011.
1097
1098 ROERECKE, M. Alcohol’s Impact on the Cardiovascular System. **Nutrients**, v. 13, n.
1099 10, p. 3419,2021.
1100
1101 ROMEU, L. R. G. et al. Effects of melatonin on histomorphology and on the expression
1102 of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female
1103 rats. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, p. 1379–1384, 2011.
1104
1105 RONIS, M. J. J.; WANDS, J. R.; BADGER, T. M.; LA MONTE, S. M.; LANG, C. H.;
1106 CALISSENDORFF. Alcohol-Induced Disruption of Endocrine Signaling.
1107 **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 8, p. 1269–1285,
1108 2007.
1109
1110 SACCO, P.; BUCHOLZ, K. K.; SPITZNAGEL, E. L. Alcohol Use Among Older Adults
1111 in the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions: A
1112 Latent Class Analysis. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 70, n. 6,
1113 p. 829–838, 2009.
1114
1115 SANTAMARÍA, C.; DURANDO, M.; TORO, M. M.; LUQUE, E. H.; RODRIGUEZ, H. A.
1116 Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally
1117 exposed to low doses of bisphenol A. **The Journal of Steroid Biochemistry**
1118 **and Molecular Biology**, v. 158, p. 220–230, 2016.
1119
1120 SCHLIEP, K. C., ZAREK, S. M, SCHITERMAN, E. F., WACTASKI-WANDE, J.,
1121 TREVISAN, M., SJAARDA, L. A., PERKINS, N. J., MUMFORD, S. L. Alcohol
1122 intake, reproductive hormones, and menstrual cycle function : a prospective
1123 cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 102, n. 4, 934-942,
1124 2015.
1125

- 1126 SHI, D.; XIAO, X.; WANG, J.; LIU, L.; CHEN, W.; FU, L.; XIE, F.; HUANG, W.; DENG,
1127 W. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-
1128 stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF- κ B, c/EBP β , and p300
1129 signaling: Melatonin suppresses proinflammatory mediators. **Journal of Pineal**
1130 **Research**, v. 53, n. 2, p. 154–165, 2012.
- 1131
- 1132 SIMÃO, M. O.; KERR-CORRÊA, F.; DALBEN, I.; SMAIRA, S. I. Alcoholic women and
1133 men: a comparative study of social and familial aspects and outcome. **Brazilian**
1134 **Journal of Psychiatry**, v. 24, n. 3, p. 121–9, 2002.
- 1135
- 1136 SINGLETARY, K. W.; GAPSTUR, S. M. Alcohol and Breast Cancer Review of
1137 Epidemiologic and Experimental Evidence and Potential Mechanisms. **JAMA**, v.
1138 286, n. 17, p. 2143–2151, 2001.
- 1139
- 1140 SOARES, M. T. F. **Síntese e caracterização da fluoroetil melatonina**. Mestrado em
1141 Tecnologia Nuclear - Aplicações—São Paulo: Universidade de São Paulo,
1142 2019.
- 1143
- 1144 SRINIVASAN, V.; SPENCE, W. D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.;
1145 BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction:
1146 Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**, v.
1147 25, n. 12, p. 779–785, 2009.
- 1148
- 1149 TAKAHASHI, T.; OGIWARA, K. Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of
1150 the current status. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A:**
1151 **Molecular & Integrative Physiology**, v. 254, p. 110907, 2021.
- 1152
- 1153 TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.;
1154 TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGIRO, N. The
1155 role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian**
1156 **Research**, v. 5, n. 1, p. 5, 2012.
- 1157
- 1158 TAMURA, H.; JOZAKI, M.; TANABE, M.; SHIRAFUTA, Y.; MIHARA, Y.; SHINAGAWA,
1159 M.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; SATO, S.; TAKETANI, T.; TAKASAKI, A.;
1160 REITER, R. J.; SUGINO, N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive
1161 Technology and Ovarian Aging. **International Journal of Molecular**
1162 **Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1135, 2020.
- 1163
- 1164 TAN, D.-X.; MANCHESTER, L. C., ESTEBAN-ZUBERO, E.; ZHOU, Z.; REITER, R.J.
1165 Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and
1166 Metabolism. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18886–18906, 2015.
- 1167
- 1168 TANG, Z. R.; ZHANG, R.; LIAN, Z. X.; DENG, S. L.; YU, K. Estrogen-Receptor
1169 Expression and Function in Female Reproductive Disease. **Cells**, v.8, n.10, p.
1170 11-23, 2019.
- 1171

- 1172 TORDJMAN, S.; CHOKRON, S.; DELORME, R.; CHARRIER, A.; BELLISANT, E.;
1173 JAAFARI, N.; FOUGEROU, C. Melatonin: Pharmacology, Functions and
1174 Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 434–443,
1175 2017.
- 1176
1177 VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E. Acute effects of ethanol on
1178 behavior of adolescent rats: Role of social context. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 25, n.3,
1179 p. 377–385, 2001.
- 1180
1181 VAN THIEL, D. H.; GAVALER, J. S.; LOSTER, R. Alcohol- Induced Ovarian Failure in
1182 the Rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 61, n. 3, p. 624-632, 1978.
- 1183
1184 VIEIRA, J. M. F. **METABOLISMO DO ETANOL**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado
1185 1192 em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- 1186
1187 VIGITEL 2021: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas em
1188 Inquérito Telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2021.
- 1189
1190 WALTERS, K. A. Role of androgens in normal and pathological ovarian function.
1191 **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 149, n. 4, p. R193-218, 2015.
- 1192
1193 WARE, V. C. The role of androgens in follicular development in the ovary. I. A
1194 quantitative analysis of oocyte ovulation. **Journal of Experimental Zoology**, v.
1195 222, n. 2, p. 155–167, 1982.
- 1196
1197 ZAKHARI, S. **Alcohol and the Endocrine System**. [s.l.] National Institutes of Health,
1198 National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 1993.
- 1199
1200 YANG, Y.; DUAN, W.; JIN, Z.; YI, W.; YAN, J.; ZHANG, S.; WANG, N.; LIANG, Z.; LI,
1201 Y.; CHEN, W.; YI, D.; YU, S. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates
1202 the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial
1203 ischemia/reperfusion injury. **Journal of pineal research**, v. 55, n. 3, p. 275–
1204 286, 2013.
- 1205
1206 YONG, W., MA, H., NA, M., GAO, T., ZHANG, Y., HAO, L., YU, H., YANG, H., DENG,
1207 X. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. **Biomedicine &
1208 Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112001, 2021.
- 1209
1210 ZHANG, L, ZHANG, Z., WANG, F., TIAN, X., JI, P., LIU, G. Effects of melatonin
1211 administration on embryo implantation and offspring growth in mice under
1212 different schedules of photoperiodic exposure. **Reproductive Biology and
1213 Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 78, 2017.
- 1214
1215 ZHANG, L.; ZHANG, Z.; WANG, J.; LV, D.; ZHU, T.; WANG, F.; TIAN, X.; YAO, Y.; JI,
1216 P.; LIU, G. Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility
1217 decline in female animals via MT1/AMPK pathway. **Journal of Pineal
1218 Research**, v. 66, n. 3, p. e12550, 2019.

1219

1220 ZONTA, Y., MARTINEZ, M., CAMARGO, I. C. C., DOMENICONI, R. F., JÚNIOR, L.

1221 A. P., PINHEIRO, P. F., REITER, R. J., MARTINEZ, F. E., CHUFFA, L. G.

1222 Melatonin Reduces Angiogenesis in Serous Papillary Ovarian Carcinoma of

1223 Ethanol-Preferring Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18,

1224 n. 4, p. 763, 2017.

1225

1226

1227

1228