



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

PROJETO DE MONOGRAFIA

**“ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DOS OVÁRIOS PARA
AVALIAR SE A MELATONINA EXÓGENA PROTEGE DOS EFEITOS
OCASIONADOS PELA DIABETES GESTACIONAL”**

PAULO ROBERTO ALVES DE LIMA JÚNIOR

RECIFE

2021

PAULO ROBERTO ALVES DE LIMA JÚNIOR

**“ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DOS OVÁRIOS PARA
AVALIAR SE A MELATONINA EXÓGENA PROTEGE DOS EFEITOS
OCASIONADOS PELA DIABETES GESTACIONAL”**

Projeto de monografia apresentado por **Paulo Roberto Alves de Lima Júnior** ao Colegiado de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Valéria Wanderley
Teixeira

RECIFE

2021

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)

P732e Lima Júnior, Paulo Roberto Alves de
Estudos morfológicos e morfométricos dos ovários para avaliar se a melatonina exógena protege dos efeitos ocasionados pela diabetes gestacional / Paulo Roberto Alves de Lima Júnior. - 2021
48 f. : il.

Orientadora: Valeria Wanderley Teixeira.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. Ratas. 2. Reprodução. 3. Diabetes. 4. Hormônio. 5. Morfologia. I. Teixeira, Valeria Wanderley, orient.
II. Título

CDD 574

PAULO ROBERTO ALVES DE LIMA JÚNIOR

**“ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DOS OVÁRIOS PARA
AVALIAR SE A MELATONINA EXÓGENA PROTEGE DOS EFEITOS
OCACIONADOS PELA DIABETES GESTACIONAL”**

Comissão Avaliadora:

Prof^a Dr^a Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Orientadora

Prof^o Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Supervisor

PNPD Dr^a. Ismaela Maria Ferreira de Melo - UFRPE

Titular

Msc. Erique Ricardo Alves - UFRPE

Suplente

“Atuação da melatonina exógena sobre os parâmetros histofisiológicos e morfométricos nos ovários de ratas com diabetes gestacional”

1. RESPONSÁVEL: Paulo Roberto Alves de Lima Júnior

2. CURSO: Bacharelado em Ciências Biológicas

3. COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

3.1. Orientadora:

- Valéria Wanderley Teixeira; Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife/PE, CEP 52171-900; CPF 640581904-34; E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br; Data de nascimento: 17/11/1966; Titulação: Doutor; Ano de titulação: 1998.

3.2. Supervisor:

- Álvaro Aguiar Coelho Teixeira; Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife/PE, CEP 52171-900; CPF 360559134-53; E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br; Data de nascimento: 10/03/1961; Titulação: Doutor; Ano de titulação: 2004.

5. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

- Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE).

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos são para meus generosos pais, que apostaram suas fichas em mim desde cedo e ainda hoje não deixam de acreditar no meu potencial, sempre buscando me motivar para um maior desenvolvimento pessoal e profissional.

Uma imensa gratidão também possuo pela minha companheira, Izadora, que durante minha vida acadêmica e pessoal foi a minha melhor companhia nos momentos mais difíceis e em momentos de descontração. Sem ela, certamente a minha caminhada acadêmica seria mais cinza e sinceramente, talvez eu nem tivesse chegado até aqui.

Agradeço também imensamente a minha professora orientadora, Valéria. Que foi minha orientadora em todas as experiências laboratoriais que tive na UFRPE, em estágio, monitoria e agora no TCC. Uma pessoa muito querida e valiosa na minha caminhada.

Agradeço também ao professor Álvaro e a Ismaela, pessoas presentes diretamente também em minhas experiências acadêmicas, que agregaram muito valor ao meu desenvolvimento profissional.

Não poderia deixar de citar os companheiros de classe, que estiveram presentes em momentos conturbados e alegres na universidade, em especial a Lorena, que se tornou uma grande amiga além dos limites da UFRPE. Mas não poderia deixar de citar Stephanie, Esdras, Jonas, João, Isac, Dennys, Isabelle, Jair, que também são colegas da qual guardarei momentos marcantes.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
1.1 Diabetes mellitus	11
1.2 Diabetes mellitus gestacional.....	12
1.3 Diabetes mellitus e seus efeitos no ovário.....	14
1.4 Melatonina.....	16
1.5 Atuação da melatonina no tecido ovariano.....	18
2. INTRODUÇÃO	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção dos animais.....	22
3.2 Acasalamento dos animais.....	23
3.3 Indução ao Diabetes Gestacional.....	23
3.4 Tratamento com melatonina.....	24
3.5 Microscopia de luz.....	24
3.6 Análise morfométrica.....	24
3.7 Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia dos ovários das matrizes dos grupos experimentais.	26
Figura 2: Percentual dos elementos ovarianos.....	27
Figura 3: Quantificação do colágeno total no ovário das matrizes.....	27
Figura 4. Dosagem hormonal do estradiol e progesterona nas matrizes dos grupos experimentais.	28

1 RESUMO

2 O diabetes mellitus gestacional (DMG) é uma alteração metabólica
3 representada pela intolerância à glicose em graus variáveis e isso está
4 associado ao aumento de complicações para a mãe e para o feto durante a
5 gestação, devido ao aumento do estresse oxidativo, desencadeando paradas
6 nos ciclos celulares, suprimindo a foliculogênese ovariana. Tem-se estudado
7 nos últimos anos a relação entre diabetes, metabolismo da glicose e
8 melatonina, cuja ação antioxidante já foi demonstrada tanto *in vivo* como *in*
9 *vitro*. Assim, analisamos o efeito da melatonina sobre a histofisiologia dos
10 ovários de ratas induzidas ao diabetes gestacional. Foram utilizadas 15 ratas
11 albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com 90 dias de idade,
12 virgens, pesando aproximadamente 250 ± 20g. Após acasalamento as fêmeas
13 foram divididas em três grupos. GC - ratas prenhes não diabéticas; GD - ratas
14 prenhes diabéticas, GDM - ratas prenhes diabéticas e tratadas
15 simultaneamente com melatonina. O diabetes foi induzido com injeção de dose
16 única de 60 mg/kg de estreptozotocina. A melatonina foi administrada em
17 injeções diárias de 0,8 mg/Kg, por toda a gestação. A eutanásia foi realizada no
18 20º dia de gestação. As fêmeas do grupo GD apresentaram ovários com
19 predominância de folículos secundários, congestão vascular na região medular,
20 aumento do colágeno, redução dos folículos primários, terciários e corpos
21 lúteos, além de redução dos níveis de estradiol e progesterona. O tratamento
22 com melatonina preveniu essas alterações. Desta maneira, o presente estudo
23 demonstrou uma ação benéfica da melatonina contra alterações e danos no
24 ovário causados pelo diabetes mellitus gestacional.

25

26 **Palavras – chave:** Ratas, reprodução, diabetes, morfologia, morfometria,
27 hormônio.

28

29

30 **ABSTRACT**

31 Gestational diabetes mellitus (GDM) is a metabolic disease represented
32 as glucose intolerance of variable degree and its related with the
33 increase of complications to the mother and to the fetus during the pregnancy
34 due to the increase of oxidative stress oxidative stress, causing pauses in
35 cell cycles, suppressing ovarian folliculogenesis. In the past years, the
36 relation between diabetes, glucose metabolism and melatonin has been
37 studied: melatonin, which is a hormone secreted by the pineal gland, has an
38 antioxidant action that has already been proven in vivo and in vitro. In this
39 experiment, an analysis of the effect of melatonin on the histophysiology of the
40 ovaries of rats induced to gestational diabetes was performed Fifteen Wistar
41 rats (*Rattus norvegicus albinus*) with ninety days old, virgin, weighing
42 approximately 250 ± 20 g were used in the present study. After mating, the
43 females were divided into three groups. GC - non-diabetic pregnant rats; GD -
44 diabetic pregnant rats; GDM - diabetic pregnant rats treated simultaneously
45 with melatonin. Diabetes was inducted with an single dose injection of
46 streptozotocin (60mg/kg). Melatonin was administered in daily injections of
47 0,8mg/kg, during all pregnancy. Euthanasia was performed on the 20th day of
48 pregnancy. The females on the GD group presented a predominance of
49 secondary (antral) follicles, vascular congestion in the medullary region,
50 collagen increase, reduction of corpus luteum, primary and tertiary follicles, in
51 addition to reduced levels of estradiol and progesterone. The treatment with
52 melatonin avoided these damages. Thus, the present study concluded a
53 positive action of melatonin against changes and damage to the ovary caused
54 by gestational diabetes mellitus.

55

56 **Keywords:** rats, reproduction, diabetes, morphology, morphometry, hormone.

57

58

59 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

60 1.1 Diabetes Mellitus

61 O diabetes mellitus é uma doença que causa níveis elevados de açúcar
62 no sangue, exigindo cuidados médicos constantes com alto custo no
63 tratamento levando a complicações graves (ÇITIL; ÖZTÜRK; GÜNAY, 2010).
64 Atualmente destaca-se como uma importante causa de morbidade e
65 mortalidade. Estimativas globais indicam que 382 milhões de pessoas vivem
66 com DM (8,3%), e esse número poderá chegar a 592 milhões em 2035
67 (GUARIGUATA, *et al.*, 2014). Acredita-se, ainda, que aproximadamente 50%
68 dos diabéticos desconhecem que têm a doença (BEAGLEY *et al.*, 2014). Em
69 2015, aproximadamente 5,0 milhões de mortes foram atribuídas ao diabetes,
70 embora no mesmo ano, mais de 12% da saúde global despesas foram
71 dedicadas ao enfrentamento da doença e suas complicações
72 (PAPATHEODOROU, 2018). O envelhecimento da população, a crescente
73 prevalência da obesidade e do sedentarismo, e os processos de urbanização
74 são considerados os principais fatores responsáveis pelo aumento da
75 incidência e prevalência do DM em todo o mundo (MOURA, 2012).

76 A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia,
77 perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem
78 levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar
79 hiperglicêmica não cetótica. A hiperglicemia crônica está associada a dano,
80 disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos,
81 coração e vasos sanguíneos. Estudos de intervenção demonstraram que a
82 obtenção do melhor controle glicêmico possível retardou o aparecimento de
83 complicações crônicas microvasculares, embora não tenha tido um efeito
84 significativo na redução de mortalidade por doença cardiovascular (UK
85 PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998). A longa duração da doença, a
86 hiperglicemia prolongada, a dislipidemia, os hábitos de fumar e ingerir bebida
87 alcoólica, a presença de neuropatia, de doença arterial obstrutiva periférica e
88 de lesões ulcerativas prévias são alguns dos fatores de risco para amputação
89 de membros inferiores em pessoas com essa patologia (MATHEUS; PINHO
90 2006; NUNES, 2006). Segundo a American Diabetes, designam-se quatro tipos
91 de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2, “outros tipos específicos” e diabetes
92 gestacional (DIABETES CARE, 2015).

93 No diabetes tipo 1 ocorre destruição das células beta do pâncreas,
94 usualmente por processo autoimune (forma autoimune; tipo 1A) ou menos
95 comumente de causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B) (ATKINSON;
96 MACLAREN 1994; IMAGAWA *et al.*, 2000). Na forma autoimune há um
97 processo de insulite e estão presentes autoanticorpos circulantes (anticorpos
98 antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina) (GROOP.;
99 BOTAZZO; DONIACH, 1986). A consequência da perda das células beta é a
100 deficiência absoluta da secreção de insulina, o que por sua vez deixa os
101 pacientes suscetíveis à ocorrência de cetoacidose, muitas vezes a primeira
102 manifestação da doença. O quadro de cetoacidose é a expressão máxima da
103 deficiência de insulina e pode também ocorrer na presença de estresse
104 infeccioso, ou de qualquer etiologia ou ser decorrente do uso inadequado da
105 insulina. O diabetes tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de
106 90% dos casos de diabetes. É uma entidade heterogênea, caracterizada por
107 distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro
108 componente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). O diabetes mellito
109 tipo 2 clássico se caracteriza pela combinação de resistência à ação da insulina
110 e à incapacidade da célula beta em manter uma adequada secreção de
111 insulina (ZIMMET,1992). A resistência à ação da insulina (RI) é uma
112 anormalidade primária e precoce no curso da doença. Esta se caracteriza pela
113 diminuição da habilidade da insulina em estimular a utilização da glicose pelo
114 fígado, músculo e tecido adiposo, prejudicando a supressão da lipólise
115 mediada por esse hormônio (BODEN, 1997). O diabetes mellitus gestacional
116 (DMG) é definido como uma intolerância à glicose que se inicia ou é detectada
117 pela primeira vez durante a gestação. Como outras formas de hiperglicemia, o
118 DMG é caracterizado pela insuficiência das células beta-pancreáticas ao suprir
119 a demanda corporal de insulina (BUCHANAN *et al.*, 2007). O tipo MODY
120 engloba um grupo heterogêneo de diabetes sem predisposição para a
121 cetoacidose e sem obesidade, com hiperglicemia leve, com início antes dos 25
122 anos de idade (FAJANS; BELL; POLONSKY, 2001).

123123

124 **1.2 Diabetes Mellitus gestacional**

125 O DMG é definido como intolerância à glicose em graus variáveis com o
126 início ou reconhecimento primeiramente durante a gravidez (METZGER;

127 COUSTAN, 1998). Na segunda metade da gestação, um estado fisiológico de
128 resistência à insulina é necessário para direcionar os nutrientes armazenados
129 na mãe para a unidade fetoplacentária e dar ao feto um crescimento adequado,
130 entretanto, quando as mulheres desenvolvem a DMG, a resistência à insulina é
131 mais pronunciada, o que modifica o ambiente intrauterino e acelera o
132 crescimento do feto, com alto risco de macrosomia. Embora existam vários
133 fatores considerados de risco para esse transtorno, os mais importantes são:
134 maior idade da mãe, parentes de primeiro grau com diabetes e maior índice de
135 massa corporal pré-gestacional (GARCÍA, 2008). As anormalidades
136 metabólicas subjacentes ao DMG incluem aumento da resistência à insulina e
137 defeitos das células beta pancreáticas. No entanto, esses defeitos são quase
138 totalmente assintomáticos e geralmente são detectados apenas por causa de
139 testes generalizados de níveis de glicose durante a gravidez. (CATALANO;
140 TYZBIR; SIMS, 1990)

141 O diagnóstico do DMG é associado com o aumento do risco de
142 complicações tanto para a mãe como para o feto, durante a gestação e, até
143 mesmo, anos após o parto. Esse risco pode ser diminuído com uma dieta
144 apropriada concomitante à atividade física, possivelmente em combinação com
145 a administração de drogas orais ou insulina (SOKUP *et al.*, 2013). Os
146 desfechos adversos relacionados ao DMG incluem anomalias fetais, recém-
147 nascidos grandes para a idade gestacional, sofrimento fetal, desequilíbrio no
148 crescimento e outras complicações em longo prazo, incluindo obesidade e
149 danos ao desenvolvimento neuropsicomotor (SILVERMAN *et al.*, 1991). Além
150 disso, gestantes com DMG possuem maior risco de desfechos desfavoráveis
151 durante a gestação, como parto prematuro e distúrbios hipertensivos
152 (METZGER, 2008).

153 Para compreender a fisiopatologia do GDM, é necessário reconhecer as
154 alterações metabólicas que ocorrem em uma gravidez normal. Para atender às
155 necessidades de energia de jejum da gravidez, produção de glicose endógena
156 basal (principalmente hepática) aumenta em 30% em mulheres grávidas
157 saudáveis até o final da gestação, apesar de um substancial aumento nos
158 níveis de insulina em jejum (CATALANO *et al.*, 1992). No entanto, as
159 concentrações circundantes de glicose em jejum diminuem durante a gravidez,
160 provavelmente devido a um aumento no volume plasmático no início da

161 gravidez e ao aumento da utilização posterior de glicose na gestação pela
162 unidade feto-placentária (CATALANO *et al.*, 1991).

163 As manifestações fisiopatológicas do diabetes gestacional estão
164 relacionadas às adaptações metabólicas ocorridas na gravidez, decorrentes da
165 solicitação contínua de glicose e de aminoácidos essenciais pelo concepto
166 acrescentando-se as necessidades de ácidos graxos e colesterol e as
167 modificações hormonais (principalmente as determinadas pelo glucagon,
168 somatomotropina coriônica, estrogênios, progesterona e glicocorticóides)
169 (BERTINI, 2001). No primeiro trimestre gestacional as modificações
170 provocadas por hormônios placentários, como a gonadotrofina coriônica
171 humana (hCG), tem pouco efeito direto sobre o metabolismo dos carboidratos.
172 Em paralelo ao crescimento da placenta, ocorre gradualmente um aumento na
173 produção de hormônios que antagonizam a ação da insulina, como o
174 estrógeno, a progesterona e, principalmente, a somatotrofina coriônica
175 humana. Por isso, no segundo e terceiro trimestre da gestação, é característico
176 um aumento da resistência à insulina, resultando em aumento na concentração
177 desta. Quando a demanda na produção de insulina é maior que a capacidade
178 das células β pancreáticas de produzir a insulina, pode ocorrer a instalação do
179 DMG (KITZMILLE; DAVIDSON, 2001).

180180

181 **1.3 Diabetes Mellitus e seus efeitos no ovário**

182 Nas mulheres, o diabetes causa uma diminuição na qualidade nuclear e
183 citoplasmática do ovócito, levando a redução da fertilidade. O diabetes materno
184 causa disfunção mitocondrial e defeitos meióticos em oócitos murinos, bem
185 como diminuição da captação de glicose nas células do *cumulus oophorus*
186 (WANG *et al.*, 2009, 2012). A condição diabética afeta negativamente o padrão
187 de distribuição do retículo endoplasmático durante a maturação de oócitos de
188 camundongos e o seu desenvolvimento embrionário inicial.

189 A deficiência no controle glicêmico resulta em perturbações no eixo
190 hipotálamo-hipófise-ovariano (SHARPLESS, 2005). Os órgãos-alvo clássicos
191 para a ação da insulina são o músculo, o fígado e o tecido adiposo. No entanto,
192 expressão de receptores de insulina, nos ovários de humanos e animais
193 demonstram um papel para a ação da insulina. Receptores de insulina são
194 amplamente distribuídos em todos os componentes ovarianos, incluindo as

195 células da granulosa, compartimentos da teca e estroma (PORETSKY *et al.*,
196 1984; PORETSKY, 1985). Estudos sugerem que a insulina atua como uma co-
197 gonadotrofina ao nível do ovário. Isto aumenta as respostas esteroidogênicas
198 às gonadotrofinas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GARZO; DORRINGTON, 1984;
199 WILLIS, 1996; DAVOREN; HSUEH, 1984; WILLIS *et al.*, 1996). A insulina
200 também estimula o crescimento ovariano induzido pela gonadotrofina coriônica
201 humana (hCG) (BENITO, 2011).

202 Estudos revelaram que estresse oxidativo elevado, estresse no retículo
203 endoplasmático, e a consequente apoptose celular excessiva são os eventos
204 causais para complicações relacionadas ao diabetes (WU *et al.*, 2015; 2016). O
205 diabetes induziu significativamente apoptose de células da granulosa
206 desencadeando danos ao DNA e estresse ao retículo endoplasmático durante
207 o desenvolvimento folicular ovariano e formação do corpo lúteo,
208 consequentemente levando a desenvolvimento folicular anormal. Estudos
209 anteriores demonstraram que o sistema vascular no ovário se origina da teca
210 interna e se divide em uma rica rede de capilares que constroem uma rede
211 semelhante a uma cesta em torno do estrato granuloso avascular (TAMANINI;
212 DE AMBROGI, 2004; ROBINSON *et al.*, 2009). O movimento de nutrientes e
213 pequenas macromoléculas dos vasos sanguíneos da teca para o fluido folicular
214 é essencial para o desenvolvimento do óvulo e do folículo. A angiogênese é
215 necessária em todos os processos de desenvolvimento folicular, incluindo ciclo
216 ovulatório e formação do corpo lúteo (WULFF *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et*
217 *al.*, 2011). Estudos recentes relataram que o fator de crescimento endotelial
218 vascular tem um papel crítico no processo de angiogênese tecal durante o
219 desenvolvimento folicular (QIU *et al.*, 2012; FU 2013). Exposição crônica à
220 hiperglicemia suprime significativamente o fator de crescimento endotelial
221 vascular (ZHANG *et al.*, 2017).

222222

223 1.4 Melatonina

224 A N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) foi isolada da glândula pineal
225 de mamíferos e caracterizada quimicamente por Lerner *et al.* (1959). Sua
226 produção ocorre em todas as espécies de mamíferos, incluindo humanos,
227 regulado pelo ambiente fotoperiódico com o período diário de luz sendo
228 associada à produção mínima de melatonina, enquanto durante a escuridão a

229 síntese e secreção da molécula aumentam. Por causa deste mecanismo
230 regulatório dependente da luz, a melatonina é produzida e liberada em ritmo
231 circadiano em todos os vertebrados (REITER, 1991). Estudos histológicos da
232 glândula pineal revelam a presença de um tipo celular específico, denominado
233 pinealócito, cuja função é traduzir as informações do ciclo claro-escuro
234 ambiental (ZHDANOVA; TUCCI, 2003). Os pinealócitos são células
235 neuroendócrinas, responsáveis pela síntese e liberação de melatonina na fase
236 de escuro. A melatonina também pode ser secretada em menor quantidade
237 pela retina, ossos, pele, intestino, plaquetas, bile (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*
238 *2014*) timo, baço, coração, músculo esquelético, fígado, estômago, intestino,
239 placenta, testículos, ovários, córtex cerebral e corpo estriado (STEFULJ *et al.*
240 *2001*, SANCHEZ-HIDALGO *et al.* *2009*).

241 Inicialmente, a melatonina estava associada sobretudo à reorganização
242 do sistema circadiano endógeno, promoção do sono e regulação dos ciclos
243 reprodutivos sazonais (ARENDR, 1998). Hoje sabe-se que é uma molécula
244 mais versátil, apresentado um papel neuroprotector, antioxidante, anti-
245 inflamatório, anti-envelhecimento, anticancerígeno e também estão
246 documentadas funções importantes na gênese e agregação de plaquetas, na
247 composição do sangue, no endotélio dos vasos, na atividade sexual, na
248 temperatura corporal, entre outras (RODRIGUES *et al.*, *2014*; VIELMA *et al.*,
249 *2014*). Ultimamente, também tem sido estudada como uma possível ferramenta
250 no tratamento de infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas (VIELMA
251 *et al.*, *2014*). Distúrbios neurológicos que foram relatados como melhorados
252 pela administração de melatonina são os seguintes: Parkinsonismo (THOMAS;
253 MOHANAKUMAR, *2004*), doença de Alzheimer (SRINIVASAN *et al.*, *2006*),
254 edema cerebral e lesão cerebral traumática (DEHGHAN *et al.*, *2013*),
255 alcoolismo (BAYDAS; YASAR; TUZCU, *2005*), depressão (WEIL *et al.*, *2006*),
256 isquemia cerebral (LEE, *2005*), glioma (MARTIN *et al.*, *2006*) e fenilcetonúria
257 (MARTINEZ; OSUNA; GUERRERO, *2006*).

258 Quando a melatonina passa pelas membranas celulares, ela se localiza,
259 principalmente em posição superficial nas bicamadas lipídicas, próxima à
260 cabeça polar dos fosfolípidos da membrana. Nessa posição, ela é capaz de
261 funcionar como um “removedor” (*scavenger*) de radicais livres e também
262 promover meios indiretos pelos quais as membranas podem resistir ao dano

263 oxidativo, estabilizando a fluidez da membrana e preservando sua eficiência
264 (REITER, 2000). Por se localizar em várias regiões dentro da célula, a
265 melatonina se torna um potente antioxidante endógeno (MARTÍN, 2000). Ela
266 pode, ainda, estimular a atividade das enzimas antioxidantes superóxido
267 dismutase, catalase, glutaciona peroxidase e glutaciona redutase
268 (KARBOWNIK; REITER, 2000). Numerosos estudos demonstraram *in vitro* e *in*
269 *vivo* que concentrações fisiológicas e farmacológicas da melatonina proteger
270 contra o dano oxidativo de radicais livres (REITER *et al.*, 2003). Estudos *in vitro*
271 (TAN; POEGGELER; REITER, 1993 b) e *in vivo* (TAN; CHEN; POEGGELER,
272 1993 a) basearam seus resultados antioxidantes em uma potente atividade
273 neutralizante de radicais livres da melatonina, uma atividade que é
274 especificamente direcionada contra os radicais hidroxila e peroxila (TAN;
275 CHEN; POEGGELER, 1993 a; PIERI *et al.*, 1994). A capacidade de eliminação
276 do radical hidroxila é devido à sua estrutura química; especificamente, ele
277 reside no grupo metil na posição 5-OH do anel indol, enquanto o grupo N-acetil
278 exerce uma ação sinérgica (TAN; CHEN; POEGGELER, 1993 a) com vitaminas
279 C e E. Também foi possível mostrar uma ação antioxidante da melatonina
280 contra outros radicais, especificamente radicais peróxidos (PIERI *et al.*, 1994),
281 (SCAIANO, 1995) e oxigênio singletto (REITER, 1995), (ACUÑA-
282 CASTROVIEJO, 1996).

283 Segundo a revisão feita por Reiter em 1998, após os setenta anos de
284 idade o chamado relógio biológico perde a sua eficiência em produzir
285 melatonina, propiciando o aparecimento de patologias como doenças
286 cardiovasculares, cânceres, doenças neurodegenerativas, diminuição da
287 resistência a infecções, diabetes mellitus, dentre outras. Talvez, essa
288 diminuição na produção de melatonina pela pineal associado à outros fatores
289 predominantes como o envelhecimento da glândula e do próprio organismo,
290 possibilite a formação dessas patologias. Níveis diminuídos de melatonina, que
291 superam aqueles observados durante o envelhecimento normal, foram
292 descritos repetidamente em doenças neurodegenerativas, especialmente na
293 doença de Alzheimer e outros tipos de demência senil (SKENE, 1990;
294 FERRARI, 2000). Em muitos indivíduos afetados, o ritmo da melatonina é
295 praticamente abolido. Esses declínios parecem ser, em muitos casos,
296 consequência da degeneração do sistema nervoso central ou na glândula

297 pineal que leva à redução da secreção da melatonina e distúrbios do sono
298 também foram observados em outros casos. Isso foi relatado, por exemplo,
299 para menores hamartomas, que causam puberdade precoce (COMMENT;
300 HELMKE, 1995), e para craniofaringiomas (MULLER *et al.*, 2002; LIPTON *et*
301 *al.*, 2009).

302

303 **1.5 Atuação da Melatonina no Tecido Ovariano**

304 Por muito tempo, o conhecimento da ação da melatonina esteve restrito
305 ao sistema nervoso central. Contudo, o interesse da melatonina diretamente
306 nas gônadas aumentou muito nos últimos anos com a identificação de sítios de
307 ligação desta molécula (SIROTKIN; SCHAEFFER, 1997) e da caracterização
308 de receptores da mesma em ovários de ratas (DUBOCOVICH, 2003). Além
309 disso, alterações nos níveis séricos de melatonina estão relacionados com
310 distúrbios da ovulação em mulheres (LUBOSHITZKY *et al.*, 2003), bem como
311 em ratas (DAIR *et al.*, 2007). Em ratas e no ser humano há evidências da sua
312 ação direta sobre a função ovariana e na modulação da sua esteroidogênese
313 (MASANA; SOARES; DUBOCOVICH, 2005), principalmente na produção de
314 progesterona (ADRIAENS *et al.*, 2006). Além disso, há presença de altas
315 concentrações deste hormônio no líquido do folículo pré-ovulatório
316 (RÖNNBERG, 1990) e de receptores de melatonina do tipo I (MT1) e do tipo II
317 (MT2) nos folículos ovarianos humanos (VIJAYALAXMI, 2002).

318 Os radicais livres funcionam nos microambientes de oócitos,
319 espermatozoides e no fluido folicular (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005).
320 Mudanças nesses microambientes têm uma influência direta no
321 desenvolvimento folicular, ovulação, qualidade dos oócitos, interação
322 espermatozoide-oócito, implantação e desenvolvimento inicial embrionário. Os
323 radicais livres mediam suas ações por meio de uma variedade de citocinas pró-
324 inflamatórias com esses processos tendo sido proposto como um fator
325 subjacente comum para endometriose, câncer de ovário, síndrome do ovário
326 policístico, e várias outras patologias que afetam o trato reprodutivo da mulher
327 (AGARWAL; GUPTA.; SIKKA, 2006). Os efeitos da melatonina na fisiologia
328 reprodutiva feminina são mediados por meio de seus receptores em locais
329 hipotalâmicos, hipofisários e ovarianos (REITER *et al.*, 2009). A melatonina
330 também é um potente eliminador de radicais livres que exerce efeitos

331 protetores nos órgãos reprodutores femininos; por exemplo, está envolvido na
332 proteção do oócito contra o estresse oxidativo, particularmente no momento da
333 ovulação. Também pode ser usado para proteger o feto em desenvolvimento
334 do estresse oxidativo (TAN; CHEN; POEGGELER, 1993 a; TAN, 2003). Os
335 níveis de melatonina no fluido folicular são mais elevados do que seus níveis
336 no sangue (ITOH *et al.*, 1997). A concentração de melatonina no fluido folicular
337 aumenta significativamente à medida que os folículos tornar-se maduro
338 (REITER *et al.*, 2014).

339 A regulação do eixo reprodutivo tem sido relatada a partir da maturação
340 sexual. Em humanos, tem sido sugerido que o padrão de secreção noturno de
341 melatonina durante a infância inibe a secreção hipotalâmica de GnRH. Antes
342 da puberdade, as concentrações de melatonina são muito altas para permitir a
343 ativação hipotalâmica (BUCHANAN *et al.*, 2001). Porém, aos nove ou dez anos
344 de idade, um declínio na melatonina sérica sinaliza o hipotálamo e o início da
345 puberdade. O mecanismo pelo qual a melatonina inibe o eixo reprodutivo até a
346 puberdade não é claro. Porém há evidências de que a melatonina esteja
347 envolvida no controle da secreção pulsátil de LH (CAVALLO, 1993). A partir da
348 puberdade, a melatonina irá apresentar efeitos estimulatórios ou inibitórios
349 sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) dependendo da espécie. Em
350 roedores de laboratório, o efeito da melatonina sobre o eixo HHG é
351 predominantemente inibitório. Em células liberadoras de GnRH com expressão
352 de receptores para melatonina (MT1 e MT2), observou-se que a melatonina
353 reduziu a expressão do mRNA para o GnRH (ROY *et al.*, 2001). Isso sugere a
354 possibilidade de um efeito direto da melatonina na secreção de GnRH em
355 neurônios hipotalâmicos. Por outro lado, estudos recentes sugerem um efeito
356 indireto na regulação do eixo HHG através do estímulo da secreção de
357 proteínas denominadas de kisseptinas (BERLINGUER *et al.*, 2009).
358 Considerando que as kisseptinas potencialmente influenciam a secreção de
359 FSH/LH, a ativação dessa via endócrina pela melatonina poderia gerar um
360 ambiente hormonal mais propício para o crescimento folicular e a maturação
361 oocitária.

362 A presença da serotonina, um precursor da melatonina, nas células da
363 granulosa e oócitos é consistente com a síntese local de melatonina (CRUZ,
364 2014). No fluido folicular, a melatonina atua eliminando os radicais livres,

365 estimulando enzimas antioxidantes e promovendo a produção de hormônios
366 esteróides sexuais pelas células da granulosa (REITER, 2013). Diversos
367 estudos também descreveram os efeitos da melatonina em folículos antrais,
368 como regulação da produção de esteróides sexuais, Expressão de mRNA de
369 LH, fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento
370 transformador beta (TAMURA 2009; TAMURA, 2008; TAMURA 2012).
371 Acredita-se que o aumento na concentração de melatonina no folículo humano
372 em crescimento seja um fator importante para evitar a atresia (TAMURA,
373 2009), porque a melatonina neste fluido reduz a apoptose de células críticas,
374 permite que folículos pré-ovulatórios se desenvolvam completamente, e
375 propicia maturidade para oócitos ovularem (TAMURA, 2008).

376376

377 2. INTRODUÇÃO

378 O DM é uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizada por
379 hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina.
380 A hiperglicemia crônica é o fator primário desencadeador das complicações
381 dessa enfermidade. É comum o desenvolvimento das macroangiopatias, que
382 comprometem as artérias coronarianas, dos membros inferiores e as cerebrais.
383 Outras complicações também são conhecidas no DM e englobam as
384 microangiopatias, afetando, especificamente, a retina, o glomérulo renal e os
385 nervos periféricos. O DM é classificado em tipo 1 e 2, diabetes gestacional e
386 outros tipos. No DM tipo 1 ocorre a destruição crônica das células β
387 pancreáticas, por meio de mecanismos autoimunes. No DM tipo 2, o principal
388 fenômeno fisiopatológico é a resistência a ação da insulina, diminuindo a
389 captação de glicose em tecidos insulina dependentes. O DMG é determinado
390 pela diminuição de tolerância à glicose, quando o início ou o reconhecimento
391 acontece durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto
392 (FERREIRA *et al.*, 2011).

393 O DMG está associado ao aumento de complicações para a mãe
394 durante a gestação e na vida do feto, recém-nascido, jovem e adulto. A
395 gestante com esta alteração tem aumento no risco de doenças hipertensivas
396 na gravidez e morbidades associadas ao diabetes. As consequências
397 perinatais estão relacionadas com o tempo de aparecimento do diabetes, com
398 as concentrações de glicose materna e com a duração, onde pode haver

399 macrossomia fetal, hipoglicemia neonatal, hiperbilirrubimemia, trauma fetal
400 durante o nascimento e morte fetal neonatal (VIGIL-DE GRACIA; OLMEDO,
401 2017). São considerados fatores de risco associados ao DMG: histórico familiar
402 de diabetes, mãe portadora de DM tipo 2, histórico de macrossomia,
403 obesidade, antecedentes de glicosúria gestacional, ganho de peso excessivo
404 na gestação, síndrome dos ovários policísticos, entre outros (BEZERRA;
405 CARLOTTO, 2019).

406 O diabetes gestacional desencadeia significativamente o aumento do
407 estresse oxidativo, que por sua vez ocasiona danos ao DNA. Além disso,
408 propõe-se que o DM induz significativamente a apoptose de células da
409 granulosa, desencadeando danos ao desenvolvimento folicular ovariano e a
410 formação do corpo lúteo (WU *et al.*, 2017).

411 A exposição a hiperglicemia crônica suprime significativamente o fator
412 de crescimento endotelial vascular, que tem um papel crítico no processo de
413 angiogênese tecal durante o desenvolvimento folicular. A angiogênese é
414 necessária em todos os processos de desenvolvimento folicular, incluindo ciclo
415 ovulatório e formação do corpo lúteo (WU *et al.*, 2017).

416 A melatonina é um hormônio produzido principalmente pela glândula
417 pineal, que atua nos ciclos de sono-vigília, (MAGANHIN, 2008). Age sobre a
418 maturação fetal e homeostase placentária, exercendo uma proteção nos
419 folículos ovarianos, auxiliando no desenvolvimento do oócito, reduzindo dano
420 oxidativo e sua concentração pode aumentar durante a gestação. (TAMURA *et al.*,
421 2012; REITER *et al.*, 2014) A melatonina é uma molécula anfifílica com
422 capacidade de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica, atuando
423 assim como agente neuroprotetor durante o período natal e em condições de
424 neurodegeneração (JAHNKE *et al.*, 1999; VOICULESCU *et al.*, 2014; MILLER
425 *et al.*, 2015). Portanto essa substância pode ajudar preventivamente em
426 gravidezes de risco, uma vez que atua em mecanismos epigenéticos,
427 antioxidantes e antiapoptóticos (BAYDAS *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2013). A
428 melatonina é um poderoso agente antioxidante não enzimático, devido a sua
429 capacidade de detoxificar as espécies reativas de oxigênio e reduzir o estresse
430 oxidativo. (PRÉVIDE, 2011). Segundo Reiter *et al.* (2003), a ação antioxidante
431 da melatonina parece agir e três vias: (1) como neutralizador direto de radicais
432 livres, (2) como antioxidante indireto via estimulação de enzimas antioxidantes,

433 (3) amentando a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial e reduzindo
434 vazamento de elétrons e (4) aumentando a eficiência de outros antioxidantes.

435 Além da atividade sistêmica da melatonina, estudos têm sugerido uma
436 atuação deste hormônio sobre a fisiologia ovariana, uma vez que foram
437 detectadas altas concentrações de melatonina no fluido folicular (RÖNNBERG
438 *et al.*, 1990). Sua atuação bem documentada como antioxidante pode estar
439 associada ao desenvolvimento folicular e à qualidade oocitária, interferindo em
440 processos como ovulação (TAMURA *et al.*, 2008). Baseado nisso, o presente
441 trabalho objetiva a uma análise histofisiológica e morfométrica das alterações
442 nos ovários no diabetes gestacional e do mesmo sob ação da melatonina
443 exógena.

444444

445 3. MATERIAIS E MÉTODOS

446 O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos Morfológicos em
447 Vertebrados e Invertebrados do Departamento de Morfologia e Fisiologia
448 Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

449449

450 3.1 Obtenção dos Animais

451 Foram utilizadas 15 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), da
452 linhagem Wistar, com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente
453 250 ± 20 g, procedentes do Biotério do mesmo Departamento, aprovado pelo
454 comitê de ética institucional sob o Nº 7692280420. Os animais foram
455 confinados em gaiolas e mantidos com alimentação e água *ad libitum*,
456 permanecendo no biotério a temperatura de $22\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial,
457 produzida por lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40W),
458 estabelecendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro,
459 considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas.

460 Após um período de adaptação de sete dias, foram realizados
461 esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As fêmeas que
462 apresentaram três ciclos estrais consecutivos regulares foram selecionadas
463 para o experimento, os quais constaram dos seguintes grupos experimentais
464 com 5 animais cada:

465465

466 **Grupo I** – ratas prenhes não diabéticas, mantidas em ciclo claro/escuro de
467 12/12 horas e eutanasiadas no 20º dia de gestação para análises dos ovários;

468 **Grupo II** – ratas prenhes diabéticas, mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12
469 horas e eutanasiadas no 20º dia de gestação para análises dos ovários;

470 **Grupo III** – ratas prenhes diabéticas, tratadas simultaneamente com
471 melatonina, mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e eutanasiadas no
472 20º dia de gestação para análises dos ovários;

473473

474 **3.2 Acasalamento dos Animais**

475 As fêmeas dos experimentos foram acasaladas na proporção de um
476 macho para cada três fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). No dia
477 seguinte foram realizados exames colpocitológicos, sempre no período da
478 manhã (06:00h), para a confirmação do acasalamento, tomando-se com
479 parâmetro a presença de espermatozoides. Este dia foi considerado como o
480 primeiro dia gestacional.

481481

482 **3.3 Indução do Diabetes Gestacional**

483 Foi induzido, após confirmação do acasalamento, por meio
484 administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical
485 Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas. A estreptozotocina foi diluída em
486 tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de
487 peso do animal. Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam da
488 mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos
489 da administração todos os animais serão alimentados normalmente
490 (DALL'AGO *et al.*, 2002). Foram incluídos no estudo apenas as fêmeas que
491 apresentarem glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-
492 Chek Activ), para início do tratamento com a melatonina no grupo diabético. Os
493 animais do grupo I receberam o placebo (citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5
494 i.p.).

495

496 **3.4 Tratamento com Melatonina**

497 A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co., St.
498 Louis, USA) foi administrada em injeções diárias de 0,8 mg/Kg, por toda a
499 gestação. Para tanto, a melatonina foi dissolvida em 0,2 mL de etanol e diluída

500 em 0,8mL NaCl a 0,9%. As injeções foram aplicadas via intraperitoneal, sempre
501 no período das 18:00 às 19:00h. Esta dose é comparável a dosagem humana
502 (9 mg/kg), a qual foi convertida com base na área de superfície do corpo
503 (PAGET; BARNE, 1994; MOUSTAFA *et al.*, 1999; ABD-ALLAH *et al.*, 2003).

504504

505 **3.5 Microscopia de Luz**

506 Para coleta dos ovários as ratas foram anestesiadas com
507 hidrocloreto de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via
508 intramuscular. A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal para a
509 remoção dos ovários. Após a coleta dos órgãos foi realizada a eutanásia
510 utilizando-se câmara de CO₂.

511 Os ovários foram mergulhados em formol tamponado, permanecendo
512 no mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos foram desidratados em
513 álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados
514 e incluídos em parafina e historesina (morfometria). Os blocos de parafina
515 foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para
516 5µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente
517 untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura
518 de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em sequência, os cortes
519 foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina - eosina (H. E),
520 corados com Tricrômico de Mallory para quantificação das fibras colágenas e
521 analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados
522 em microscópio OLYMPUS BX-50.

523 **3.6 Análise Morfométrica**

524 Para determinar a percentagem da área ovariana ocupada pelos
525 folículos, as lâminas foram observadas em uma ocular de 10x, contendo no
526 interior um retículo de WEIBEL com 25 pontos. Foram utilizadas cinco lâminas
527 nas quais foram contados os pontos que incidiram sobre os folículos, com uma
528 objetiva de 10x. Foram determinados quatro campos no ovário, sendo contados
529 100 pontos por animal, totalizando 500 pontos por grupo.

530530

531 **3.7 Dosagem hormonal**

532 Foram coletadas, no vigésimo dia de gestação, amostras de 1mL de
533 sangue, as quais foram centrifugadas sob refrigeração e armazenadas a -20°C

534 até o momento das dosagens. Foram dosados o estradiol e progesterona
535 utilizando-se kit ELISA, seguindo o protocolo do fabricante.

536536

537 **3.8 Análise Estatística**

538 Para a análise dos dados morfométricos e hormonais foram realizadas
539 a Análise de Variância, quando significativa esta será complementada pelo
540 teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer. Foi adotado o nível de
541 significância de 0,05 ($P < 0,05$).

542542

543 **4. RESULTADOS**

544544

545 **a) Análise histopatológica**

546 Os ovários das ratas dos grupos GC e GDM apresentaram-se revestidos
547 por epitélio simples cúbico, repousando sobre a albugínea ovariana, com a
548 região cortical e medular bem definidas. Na região cortical foram observados
549 vários folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, além de
550 grande quantidade de corpos lúteos (Fig. 1A, 1B, 1E e 1F). Nas matrizes do
551 grupo GD, os ovários mostraram-se também revestidos por epitélio simples
552 cúbico, apoiado na túnica albugínea, apresentando as regiões cortical e
553 medular bem definidas, no entanto, na região cortical, observou-se a
554 predominância de folículos secundários, além de raros corpos lúteos. Na região
555 medular notamos congestão vascular (Fig. 1C, 1D).

556556

557 **b) Análise morfométrica do ovário de ratas com diabetes gestacional**

558 A análise do percentual dos elementos ovarianos revelou que no grupo
559 GD houve redução do número de folículos primários, terciários e corpos lúteos.
560 Em contrapartida, foi observado de aumento do número de folículos
561 secundários, atresícos e do estroma, quando comparado aos demais grupos
562 (Fig. 2).

563

564 **c) Quantificação de colágeno no ovário de ratas com diabetes gestacional**

565 Os resultados mostraram que houve diferenças estatísticas entre o grupo
566 GD e os demais grupos experimentais na quantificação de colágeno,
567 caracterizado pelo aumento expressivo no grupo diabético (Fig. 3).

568

569 **d) Dosagens hormonais**

570 A análise das dosagens hormonais revelou, no vigésimo dia de prenhez,
571 redução significativa nos níveis de estradiol e da progesterona nas matrizes do
572 grupo GD, em relação aos demais grupos experimentais (Fig.4).

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

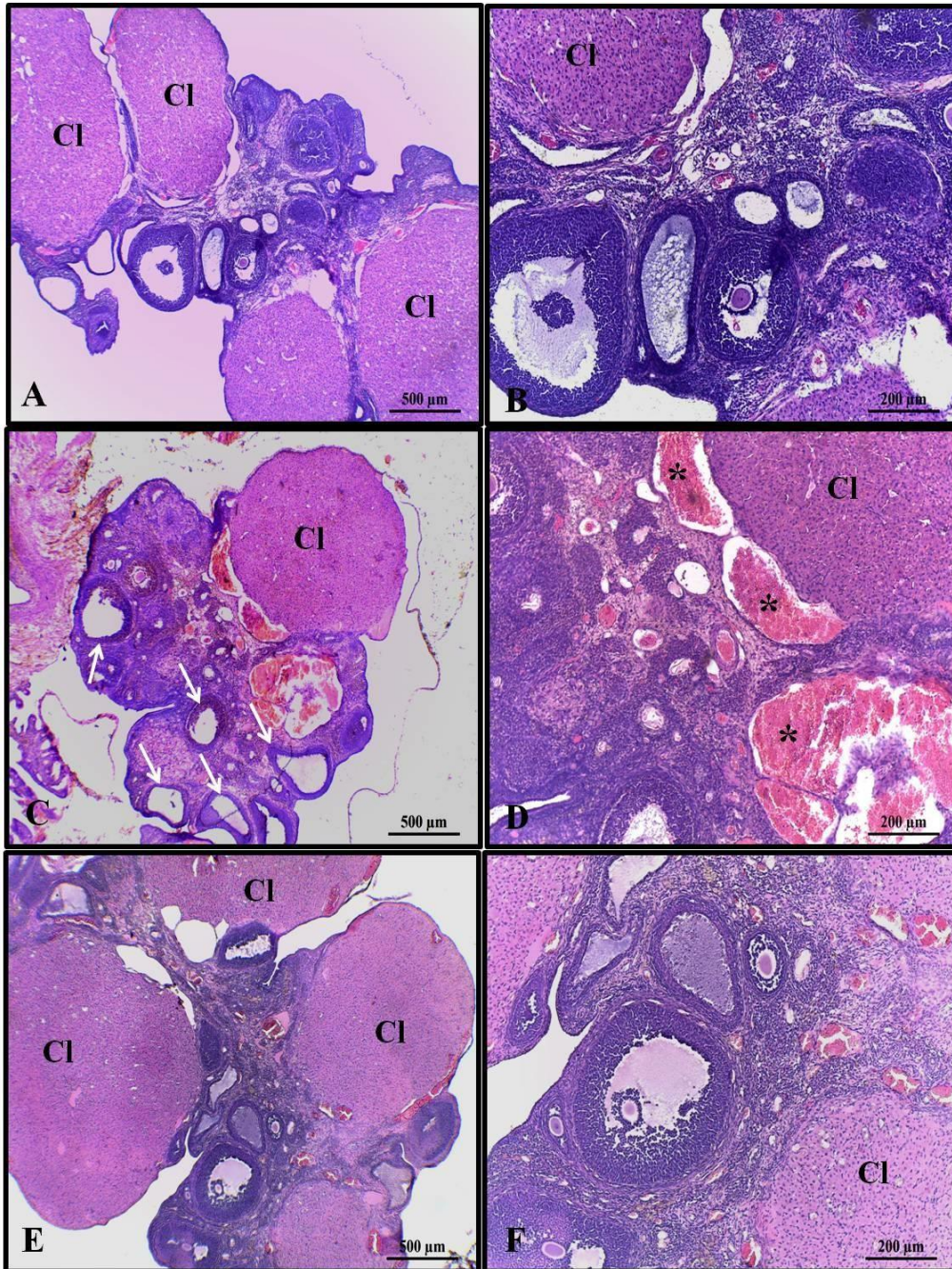
589

590

591

592

593



594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606 **Figura 1.** Fotomicrografia dos ovários das matrizes dos grupos experimentais.

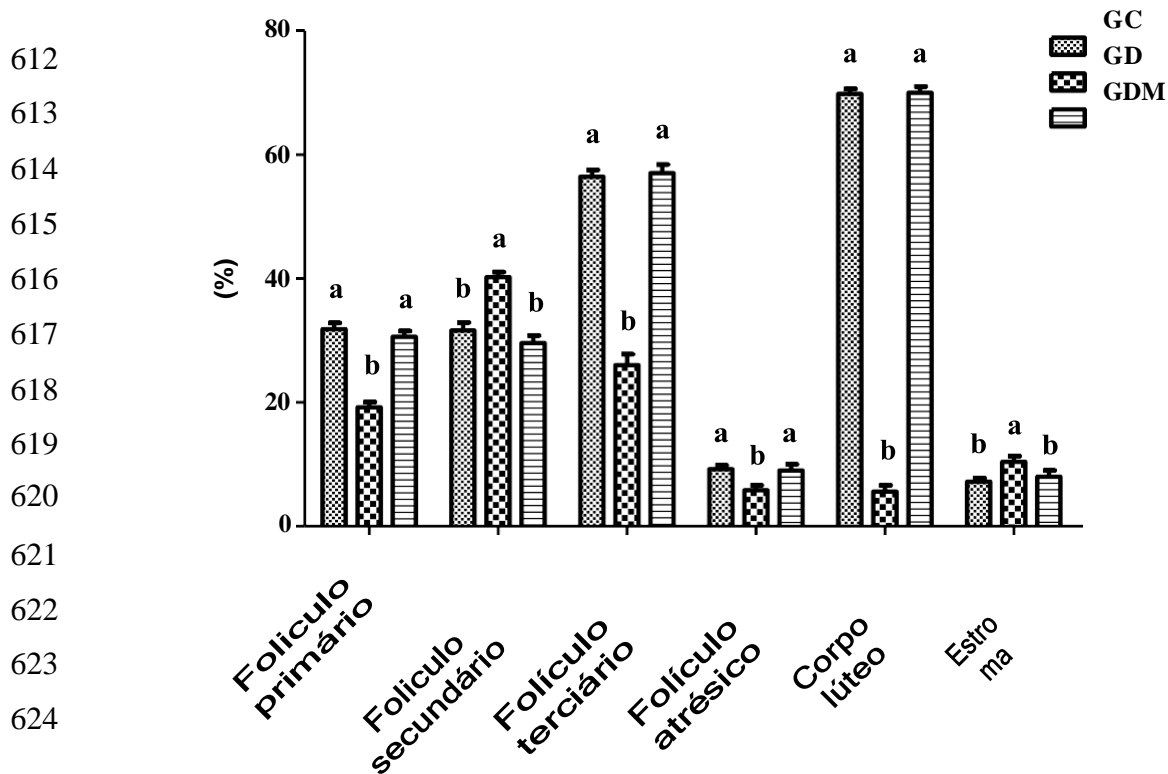
607 A-B) GC; C-D) GD e E-F) GDM. Cl - corpo lúteo; setas - folículos secundários;

608 asterisco - congestão vascular. H.E.

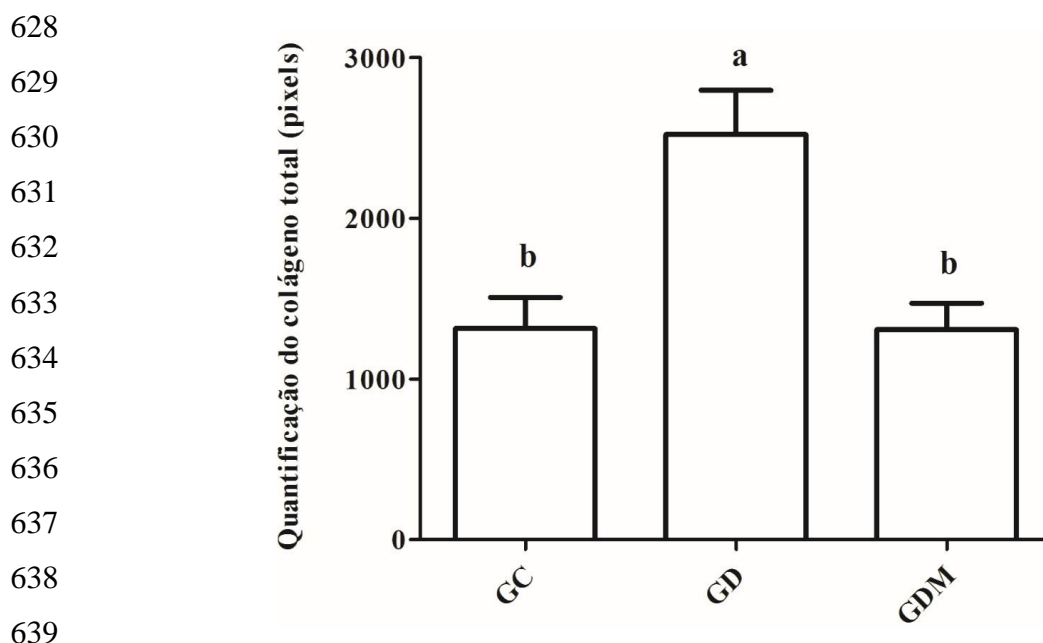
609

610

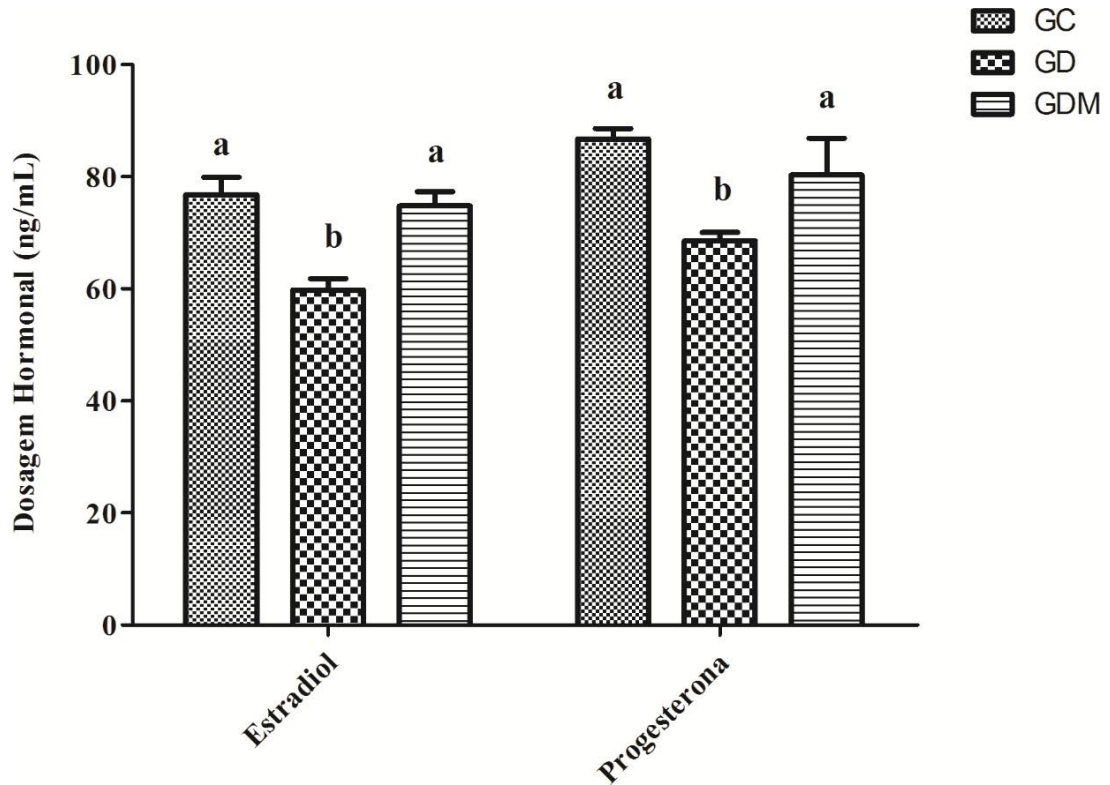
611



625 **Figura 2.** Percentual dos elementos ovarianos nas matrizes dos grupos 626
627 experimentais. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem 627
628 significativamente entre si pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).



640 **Figura 3.** Quantificação do colágeno total no ovário das matrizes dos grupos 641
642 experimentais. GC: grupo controle, GD: grupo diabético, GDM: grupo diabético 642
643 tratado com melatonina. * Médias seguidas pela mesma letra não diferem 643
644 significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn 644
($p < 0,05$).



646

647 **Figura 4.** Dosagem hormonal do estradiol e progesterona nas matrizes dos
 648 grupos experimentais. GC: grupo controle, GD: grupo diabético, GDM: grupo
 649 diabético tratado com melatonina. * Médias seguidas pela mesma letra não
 650 diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc
 651 Dunn ($p < 0,05$).

652

653 5. DISCUSSÃO

654 Pesquisas têm demonstrado que o diabetes mellitus afeta adversamente
655 a função reprodutiva feminina, podendo promover vários efeitos nos ovários,656
tais como: atraso na maturação do ovócito, aumento da apoptose nas células 657 da
granulosa e diminuição da reserva ovariana (Colton *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 658
2005; Kim *et al.*, 2016). O desenvolvimento dos folículos ovarianos requer 659 um
complexo conjunto de interações célula-célula, que envolvem vias 660
endócrinas, autócrinas, parácrinas. Para isso é essencial que o ovócito e as661
células da granulosa do folículo desenvolvam uma comunicação bidirecional 662
(Eppig *et al.*, 2002).

663 Colton *et al.* (2003) demonstraram que a perda de comunicação 664
metabólica entre as células da granulosa e ovócitos em camundongos 665
diabéticos, está associada ao ambiente hiperglicêmico. Além disso, o diabetes 666
promove o estresse oxidativo, que por sua vez leva a danos ao DNA667
ocasionando a parada do ciclo celular, desencadeando a apoptose, suprimindo 668
assim, a maturação dos ovócitos (Hamdan *et al.*, 2016). Em nosso estudo, a 669 análise
morfométrica revelou uma predominância dos folículos secundários,670 sugerindo
um atraso na maturação folicular. Entretanto, o tratamento 671 simultâneo com
melatonina preveniu esse efeito, o que pode estar associado a 672 sua ação
antioxidante, pois segundo Deb *et al.* (2020), este hormônio restaurou 673 as enzimas
antioxidantes superóxido dismutase e catalase no ovário de 674 camundongos
diabéticos.

675 Nos ovários dos animais diabéticos foi observada presença de congestão
676 vascular, caracterizando uma vasculopatia. A disfunção endotelial é fator vital 677
para as complicações vasculares induzidas pelo diabetes, onde a hiperglicemia 678 é
o principal fator de risco para o desenvolvimento de vasculopatia (CADE679 2008),
por regular positivamente a produção de espécies reativas de oxigênio 680 (ROS) nas
células endoteliais (Yu *et al.*, 2011; Batchuluun *et al.*, 2014) e, 681
consequentemente, levando a disfunção endotelial (Yang *et al.*, 2016). Estudos 682
demonstraram que a administração de melatonina previne a disfunção 683
endotelial em ratos induzidos a hipóxia, melhorando os níveis de óxido nítrico 684 (NO)
e a expressão de eNOS (óxido nítrico sintase), envolvida na regulação do 685 endotélio
vascular (Hung *et al.*, 2013), o que poderia explicar a ausência da686 vasculopatia
nos ovários das fêmeas do grupo GDM.

687 Na análise morfométrica verificou-se no grupo GD redução do número de
688 folículos primários e aumento da atresia folicular, isso poderia estar associado 689
a condição hiperglicêmica das fêmeas, pois segundo Okan *et al.* (2021) a 690
hiperglicemia parece estar associada a alterações no desenvolvimento do 691
ovócito e atraso na maturação meiótica, além de promover níveis mais 692
elevados de expressão de proteínas sinalizadoras de morte celular 693
desencadeando a apoptose, principal mecanismo molecular da atresia folicular 694
(Palumbo; Yeh 1995; Alonso-Pozos *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2015). Entretanto 695
evidenciamos uma predominância dos folículos secundários nas fêmeas 696
diabéticas, que pode estar relacionado ao fato de que, em ovários de humanos, 697
roedores, bovinos, suínos e aves, indícios de apoptose só foram detectados em 698
folículos antrais pré-ovulatórios (Fenwick; Hurst 2002; Glamoclija *et al.*, 2005). 699
Neste estudo, todos os folículos secundários apresentavam-se na fase pré- 700
antral.

701 A redução dos folículos terciários e corpos lúteos pode ser em 702
decorrência do não desenvolvimento dos folículos secundários, em virtude do 703
déficit do IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I) o qual tem 704
papel fundamental no controle do crescimento folicular na fase pré-antral 705
(Woad *et al.*, 2000). De fato, estudos clínicos têm mostrado que níveis baixos 706
de IGF-I estão associados à intolerância à glicose, diabetes e resistência à 707
insulina (Sandhu *et al.*, 2002; Sesti *et al.*, 2005; Succurro *et al.*, 2009; Aleidi *et al.*, 2019).
Nos ovários esse fator de crescimento aumenta a interação entre as 709
células da granulosa e o ovócito tendo efeito direto no desenvolvimento 710
folicular (Monget *et al.*, 2002).

711 Durante a gestação ocorre um aumento nos hormônios estradiol e 712
progesterona. O estradiol é produzido principalmente pela placenta, através da 713
enzima aromatase placentária. A atividade da aromatase foi correlacionada 714
com a produção de estrogênio na placenta durante a gravidez. Entretanto, 715
níveis plasmáticos de estradiol durante a gestação são mais baixos em 716
mulheres diabéticas do que em mulheres normais, em virtude da condição 717
hiperglicêmica (Takeda *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2017), que reduz 718
consideravelmente a expressão gênica da aromatase placentária (Inadera *et al.*, 2010), promovendo
assim, redução dos níveis de estradiol, como o 720 observado neste estudo. A
redução da progesterona pode estar associada à

721 redução dos corpos lúteos verificados na análise morfológica e também pela 722
ação do diabetes no eixo hipotálamo hipófise e gonada, diminuindo a produção 723 de
progesterona.

724 Pesquisas têm demonstrado que ovários de ratas diabéticas se observam
725 fibrose estromal, por meio da via do NF- κ B, um fator de transcrição envolvido 726
na expressão de genes ligados à resposta inflamatória e a fibrose do tecido 727
após a inflamação, refletindo de forma consistente em uma diminuição de 728
elementos ovarianos e um maior percentual da área estromal (Nayki *et al.*, 729
2016), fato por nós observados na análise morfológica nos ovários das 730
fêmeas diabéticas.

731 A análise morfológica e hormonal nas fêmeas que receberam 732
melatonina mostraram valores similares aos observados no controle. Isso 733
provavelmente está relacionado ao efeito inibitório da melatonina sobre os 734
níveis de glicose no sangue, reduzido a hiperglicemia induzida pela 735
estreptozotocina (Mabley *et al.*, 2003) ou a sua ação antioxidante nos folículos 736
ovarianos, minimizando o estresse oxidativo induzido pelo diabetes (Tamura *et al.*,
737 Deb *et al.*, 2020).

738

739 **6. CONCLUSÃO**

740 Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, entende-se que o 741
uso da melatonina exógena em ratas possui um efeito positivo sobre o tecido 742
ovariano, minimizando as alterações e danos causados pelo diabetes mellitus 743
gestacional nas mães, protegendo o ovário para futuras gestações e evitando 744
possíveis complicações fetais.

745

746 **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

747 ABD-ALLAH, A. R. A. *et al.* Effect of melatonin on estrogen and progesterone 748
receptors in relation to uterine contraction in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 749 349-
354, 2003.

750

751 ACUÑA-CASTROVIEJO, D. *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation,
752 and potential functions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 71, n. 17, p. 2997-3025, 2014.

753

754 ACUÑA-CASTROVIEJO, D. *et al.* Potenciales efectos de la melatonina en el
755 envejecimiento. **Rev Med**, v. 3, p. 27-35, 1996
756

757 ADRIAENS, I. *et al.* Melatonin has dosedependent effects on folliculogenesis, 758
oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2-3, p. 759 333-
43, 2006.
760

761 AGARWAL, A.; GUPTA S.; SHARMA R. K. Role of oxidative stress in female
762 reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 3, 2005.
763

764 AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA ,S. The role of free radicals and antioxidants
765 in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, p. 325-32, 2006.
766

767 ALEIDI, S. M. *et al.* Serum level of insulin-like growth factor-I in type 2 diabetic
768 patients: impact of obesity. **HMBCI**, v. 39, n. 1, p. 2019-0015, 2019.
769

770 ALONSO-POZOS, I. *et al.* Mechanism of granulosa cell death during follicular
771 atresia depends on follicular size. **Theriogenology**, v. 60, p. 1071-81, 2003.
772

773 ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal
774 and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 1, p 13-22, 1998.
775

776 ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin dependent
777 diabetes. **N Engl J Med.**, v. 331, p. 1428-36, 1994.
778

779 BATCHULUUN, B. *et al.* Metformin and liraglutide ameliorate high glucose- 780
induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in781
human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 232, p. 156-64, 2014.
782

783 BAYDAS, G. *et al.* Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal 784
brains of hyperhomocysteinemic rat dams. **J Pineal Res**, v. 43, p. 225-31, 785
2007.
786

787 BAYDAS, G.; YASAR, A.; TUZCU, M. Comparison of the impact of melatonin 788
on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young789 and
aged rats. **J Pineal Res**, v. 39, p. 346-52, 2005.

790

791 BEAGLEY, J. *et al.* Global estimates of undiagnosed diabetes in adults.
792 **Diabetes Res Clin Pract**, v. 103, n. 2, p 150-60, 2014.

793

794 BENITO, M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent
795 mechanisms. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 201, n 3, p. 297, 2011.

796

797 BERLINGUER, F. *et al.* Exogenous melatonin positively influences follicular798
dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat 799
model. **J. Pineal Res.**, v. 46, p. 383-391, 2009.

800

801 BERTINI, A. M. Diabetes mellitus. In: GUARIENTO, A.; MAMEDE, J. A. V.
802 **Medicina materno-fetal** São Paulo: Atheneu, 2001

803

804 BEZERRA, J. S.; CARLOTTO, M. S.; Diabetes Mellitus Gestacional: dos 805
Fatores De Risco à Terapia - Revisão Qualitativa. **Revista Saberes da 806**
Faculdade São Paulo - FSP, Rolim de Moura, v. 9, n. 1, 2019.

807

808 BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulinresistance and
809 NIDDM. **Diabetes**, v. 46, p. 3-10, 1997.

810

811 BUCHANAN, T. W. Exogenous cortisol exerts effects on the startle reflex 812
independent of emotional modulation. **Pharmacol Biochem Behav**, V. 68, n. 2, 813 p.
203-210, 2001.

814

815 BUCHANAN, T.A. *et al.* What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n.
816 2, p 105-11, 2007

817

818 CADE, W.T. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in
819 the Physical Therapy Setting. **PT**. v. 88, n. 11, p. 1322-35, 2008.

820

821 CATALANO, P. M. *et al.* Longitudinal changes in basal hepatic glucose 822
production and suppression during insulin infusion in normal pregnant women. 823 **Am.**
J. Obstet., Gynecol. v. 167, p. 913-919, 1992.

824

825 CATALANO, P. M. *et al.* Longitudinal changes in insulin release and insulin 826
resistance in nonobese pregnant women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, V. 165, p 827 1667-
1672, 1991.

828

829 CATALANO, P. M.; TYZBIR, E. D.; SIMS, E. A. Incidence and significance of 830
islet cell antibodies in women with previous gestational diabetes. **Diabetes** 831
Care, v. 13, p. 478-482, 1990.

832

833 CAVALLO, A. The pineal gland in human beings: relevance to pediatrics.
834 **Journal of Pediatrics**, V. 123, n. 6, p. 843-851, 1993.

835

836 CHANG, A. S.; DALE, A. N.; MOLEY, K. H. Maternal diabetes adversely affects 837
preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. 838
Endocrinology, v. 146, p. 2445-2453, 2005.

839

840 CHEN, Y. C *et al.* Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised
841 Pregnancies. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 5380-5401, 2013.

842

843 ÇITIL R.; ÖZTÜRK Y.; GÜNAY, O. Metabolic regulation and related factors in 844
diabetic patients referred to a primary health center in provincial center of 845
Kayseri. **Erciyes Tip Dergisi (Erciyes Med J)**, 2010, v. 32, n. 2, p.111-122.

846

847 COLTON, S. A.; PIEPER, G. M.; DOWNS, S. M. Altered meiotic regulation in
848 oocytes from diabetic mice. **Biol. Reprod.** v. 67, n. 1, p. 220-231, 2002.

849

850 COLTON, S.A. *et al.* Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes 851
from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. **Biol. Reprod.** v. 852 69,
v. 761-770, 2003.

853

854 COMMENTZ, J. C.; HELMKE K., "Precocious puberty and decreased melatonin 855
secretion due to a hypothalamic hamartoma," **Hormone Research**, v. 44, n. 6, 856 pp.
271-275, 1995.

857

858 CRUZ, M. H. Role of melatonin on production and preservation of gametes and
859 embryos: a brief review. **Anim Reprod Sci**, v. 145, p. 150-60, 2014.

860

861 DAIR, E. L. *et al.* Effects of melatonin on the endometrial morphology and
862 embryo implantation in rats. **Fertil Steril**, v. 89, n. 5, 2007.

863

864 DALL'AGO, P. *et al.* Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-865
term streptozotocin diabetic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 843-849, 866 2002.

867

868 DAVOREN, J. B; HSUEH, A. J. Insulin enhances FSH-stimulated 869
steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 35, p. 870 2-3,
n. 97, 1984.

871

872 DEB, A.; SUTRADHAR, S.; SINGH, S. Melatonin protects ovary from diabetes 873
induced oxidative damages in laboratory mice. **Indian J. Appl. Res.** v. 10, n. 874 10,
p. 1-4, 2020.

875

876 DEHGHAN, F. *et al.* Effect of melatonin on intracranial pressure and brain 877
edema following traumatic brain injury: role of oxidative stresses. **Arch Med** 878
Res., v. 44, p. 251-8, 2013.

879

880 DIABETES CARE. Classification and Diagnosis of Diabetes. v. 38, p. 8-16,
881 2015

882

883 EPPIG J.J.; WIGGLESWORTH K.; PENDOLA F.L. The mammalian oocyte
884 orchestrates the rate of ovarian development. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 99,
885 p. 2890-2894, 2002.

886

887 FAJANS, S. S; BELL, G. I; POLONSKY, K. S. Molecular mechanisms and 888
clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. **N Engl J** 889
Med., v. 345, p. 971-80, 2001.

890

891 FENWICK M.A.; HURST P.R. Immunohistochemical localization of active 892
caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. **Reprod.** v. 893 124,
p. 659-665, 2002.

894

895 FERRARI, E. M. "Variability of interactions between neuroendocrine 896
immunological functions physiological aging and dementia of the Alzheimer's 897 type,"
Ann N Y Acad Sci, v. 917, p. 582-596, 2000.

898

899 FERREIRA, L. T. *et al.* Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic
900 complications. **Arq. bras. ciênc. saúde**, v.36, n. 3, p. 182-8, 2011.

901

902 FU, Y. Overexpression of clusterin promotes angiogenesis via the vascular 903
endothelial growth factor in primary ovarian cancer. **Mol. Med. Rep**, v. 7, p.904
1726, 2013.

905

906 GARCÍA, G. C. Diabetes mellitus gestacional. **Med Int Mex.**, v. 24, n. 2, p.148-
907 156. 2008.

908

909 GARZO, V. G.; DORRINGTON, J. H. Aromatase activity in human granulosa 910
cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating 911
hormone and insulin. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 148, n. 5, p. 657, 1984.

912

913 GLAMOCLIJA, V. *et al.* Apoptosis and active caspase-3 expression in human
914 granulosa cells. **Fertil Steril** v. 83, p. 426-431, 2005.

915

916 GROOP, L.; BOTAZZO, G. F.; DONIACH, D. Islet cell antibodies identify latent 917
type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. **Diabetes**, v. 35, p. 918 237-
41. 1986.

919

920 GUARIGUATA, L, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and
921 projections for 2035. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 103, n. 2, p. 137-49, 2014.
922

923 HAMDAN, M. *et al.* The sensitivity of the DNA damage checkpoint prevents
924 oocyte maturation in endometriosis. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 36994, 2016.
925

926 HUNG, M. W. *et al.* Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular
927 inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent
928 hypoxia. **J. Pineal Res.**, v. 55, n. 3, p. 247-256, 2013.
929

930 IMAGAWA, A. *et al.* A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized
931 by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **N Engl J Med.**,
932 v. 342, p. 301-7, 2000.
933

934 INADERA, H. *et al.* Hyperglycemia perturbs biochemical networks in human
935 trophoblast BeWo cells. **Endocr. J.**, v. 57, n. 7, p. 567-577, 2010.
936

937 INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 6th ed.
938 Bruxelles, Bélgica: International Diabetes Federation; 2013.
939

940 ITOH, M. T. *et al.* Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and
941 hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. **Mol Cell Endocrinol.**,
942 v. 136, p. 7-13, 1997.
943

944 JAHNKE G. *et al.* Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin
945 administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. **Toxicol Sci.** 1999
946 Aug;50(2):271-9
947

948 KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection
949 against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**,
950 v.225, p.9-22, 2000.
951

952 KIM, C. *et al.* Antimullerian hormone among women with and without type 1
953 diabetes: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study

954 and the Michigan Bone Health and Metabolism Study. **Fertil Steril**, v. 106, p.
955 1446-1452, 2016.

956

957 KITZMILLE, J. L.; DAVIDSON, M. B. Diabetes e gravidez. In: DAVIDSON, M. B.
958 Diabetes Mellitus: diagnóstico e tratamento. **Rio de Janeiro: Revinterr**, P. 277-
959 303,. 2001.

960

961 LEE, E. J. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse
962 model of transient focal cerebral ischemia. **J Pineal Res.**, v. 38, p. 42-52, 2005. 963

964 LERNER, A. *et al.* Melatonin in Peripheral Nerve. **Nature** 183, 1821 (1959).

965

966 LIPTON, J. *et al.*, "Melatonin deficiency and disrupted circadian rhythms in
967 pediatric survivors of craniopharyngioma," **Neurology**, v. 73, n. 4, pp. 323-325,
968 2009.

969

970 LUBOSHITZKY, R. *et al.* Evaluation of the pituitaryadrenal axis in
971 hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. **Neuro Endocrinol Lett**,
v. 24, n. 3-4, p. 249-54, 2003.

973

974 MABLEY, J.G. *et al.* Inosine protects against the development of diabetes in
975 multiple-low-dose streptozotocin and nonobese diabetic mouse models of type
976 1 diabetes. **Mol Med**. v. 9, p. 96-104, 2003.

977

978 MAGANHIN, Carla C. *et al.* Efeitos da melatonina no sistema genital feminino:
979 breve revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 54, n.3, p. 267-271, 2008.

980

981 MARTÍN, M. *et al.* Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione
982 homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. 983
FASEB J., v.14, p.1677-1679, 2000.

984

985 MARTIN, V. *et al.* Intracellular signaling pathways involved in the cell growth
986 inhibition of glioma cells by melatonin. **Cancer Res.**, v. 66, p. 1081-8, 2006.

987

988 MARTINEZ-CRUZ, F.; OSUNA, C.; GUERRERO, J. M. Mitochondrial damage
989 induced by fetal hyperphenylalaninemia in the rat brain and liver: its prevention
990 by melatonin, Vitamin E, and Vitamin C. **Neurosci Lett.**, v. 392, p. 1-4, 2006.
991
992 MASANA, M. I.; SOARES, J. M JR.; DUBOCOVICH, M. L. 17Beta-estradiol
993 modulates hMT1 melatonin receptor function. **Neuroendocrinology.**, v. 81, n. 2,
994 p. 87-95, 2005.
995
996 MATHEUS, M. C. C; PINHO, F. S. Buscando mobilizar-se para a vida apesar
997 da dor ou da amputação. **Acta Paul Enferm.**, v. 19, n. 1, p. 49-55, 2006.
998
999 METZGER, B. E. *et al* and HAPO Study Cooperative Research Group.
1000 Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. **N Engl J Med.**, v. 358, n. 19,
1001 p. 1991-2002, 2008
1002
1003 METZGER, B. E.; COUSTAN, D. R. Organising Committee. Summary and
1004 recommendations of the Fourth International Workshop Conference on
1005 Gestational Diabetes. **Diabetes Care**,;(Suppl 2): p161-167, 1998.
1006
1007 MILLER, E. *et al*. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Applications in
1008 Neurodegenerative Disorders. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 15, p. 163-169, 2015.
1009
1010 MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian
1011 pineal gland. **Cell and Tissue Res, Berlin.**, v.309, n.1, p.139- 50, 2002.
1012
1013 MONGET, P. *et al*. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP
1014 system in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrin.** v. 23, p. 139-154, 2002.
1015
1016 MOURA E.C., *et al*. Research on chronic noncommunicable diseases in Brazil:
1017 meeting the challenges of epidemiologic transition. **Rev Panam Salud Publica**
1018 2012; 31(3): 240-5.
1019
1020

1021 MOUSTAFA, A. M. *et al.* Effect of bromocriptine on uterine contractility in near
1022 term pregnant rats. **Pharmacol. Res.**, v. 39, n. 2, p. 89-95, 1999.

1023

1024 MULLER, H. L. *et al.*, "Melatonin secretion and increased daytime " sleepiness
1025 in childhood craniopharyngioma patients," **Journal of Clinical Endocrinology
1026 and Metabolism**, v. 87, n. 8, p. 3993-3996, 2002.

1027

1028 NUNES, M. A. P. Fatores predisponentes para amputação de membro inferior
1029 em pacientes diabéticos internados com pés ulcerados no estado de Sergipe.
1030 **J. Vasc. Bras.**, v. 5, n. 2, p. 123-30, 2006.

1031

1032 NAYKI, U. *et al.*, The Effects of Diabetes Mellitus on Ovarian Injury and Reserve:
1033 An Experimental Study. **Gynecol Obstet Invest**, v. 81, n. 5, p. 424- 429, 2016.

1034

1035 OKAN, A.; DEMIR, N.; SOZEN, B. Unfolded protein response triggers differential
1036 apoptotic mechanisms in ovaries and early embryos exposed to maternal type 1
1037 diabetes. **Sci Rep.** v. 11, p. 12759, 2021.

1038

1039 PAGET, G. E.; BARNE, J. M. Evaluation of results: quantitative application in
1040 different species. In: Laurance, D. R.; Bacharach, A. L. editors. Evaluation of drug
1041 activities: pharmacometrics, vol. 1. 9th ed. **New York: Academic Press**;p. 161.
1042 1994.

1043

1044 PALUMBO, A., YEH, J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle:
1045 follicular atresia and luteal regression. **Reprod Sci.** v. 2, n. 3, p. 565-73, 1995.

1046 PIERI C. *et al.*: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life
1047 Sci.**, v. 55, P. 271-6, 1994.

1048

1049 PAPTAEODOROU, K. *et al.* Complications of Diabetes. **J. of Diabetes Res.**
1050 v. 2018, p. 1-4, 2018.s

1051

1052

1053 PORETSKY L. *et al.* Distribution and characterization of insulin and insulin-like
1054 growth factor I receptors in normal human ovary. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 61,
1055 v. 4, p. 728-34, 1985.

1056

1057 PORETSKY L. *et al.* Specific insulin binding sites in human ovary. **J Clin**
1058 **Endocrinol Metab.**, v 59, n. 4, p. 809, 1984.

1059

1060 PRÈVIDE, R. M. Efeito da pinealectomia na expressão e atividades de enzimas
1061 antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e sóleo. 2011, 46 f. Dissertação
1062 (Mestrado em Fisiologia Humana) – **Instituto de Ciências Biomédicas da**
1063 **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

1064

1065 QI, X. *et al.* Decreased cord blood estradiol levels in related to mothers with
1066 gestational diabetes. **Medicine**, v. 96, n. 21, 2017.

1067

1068 QIU, Y. *et al.* Ovarian VEGF(165)b expression regulates follicular development,
1069 corpus luteum function and fertility. **Reproduction.**, v. 143, p. 501-11, 2012.

1070

1071 REITER R J. *et al.* A review of the evidence supporting melatonin as antioxidant.
1072 **J Pineal Res.**, , v. 18, p. 1-11, 1995.

1073

1074 REITER R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by
1075 melatonin. **Prog. Neurobiol.**, v.56, p.359-384, 1998.

1076

1077 REITER, J. R. Melatonin: clinical relevance. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol.**
1078 **Metab.** v. 17, n 2, p. 273-285, 2003.

1079

1080 REITER, R, J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and
1081 pathophysiological implications in humans. **Acta Biochim Pol.**, v. 50, n. 4, p.
1082 1129-46, 2003.

1083

1084 REITER, R. J. *et al.* Melatonin and reproduction revisited. **Biol Reprod.**, v. 81,
1085 p. 445-456, 2009.

1086

1087 REITER, R. J. *et al.* Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready
1088 for prime time. **Int J Mol Sci.**, , v. 14, p. 7231-72, 2013.

1089

1090 REITER, R. J. *et.* Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal,
1091 placental and fetal physiology. **Human Reprod Update.**, v. 20, p. 293-307, 2014.

1092

1093 REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **Physiology**,
1094 v.15, p. 246- 250, 2000.

1095

1096 REITER, R. J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its
1097 physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v 12, p. 151-180, 1991.

1098

1099 ROBINSON, R. S. *et al.* Angiogenesis and vascular function in the ovary.
1100 **Reproduction.**, v. 138, p. 869-81, 2009.

1101

1102 RODRIGUES, P. *et al.* Ação da melatonina no tecido cartilaginoso. **Reprod. e**
1103 **Clim.**, v. 8, n. 1, p. 24-29. 2014.

1104

1105 RÖNNBERG, L. *et al.* Circadian and seasonal variation in human preovulatory
1106 follicular fluid melatonin concentration. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 71, p. 493-
1107 496, 1990.

1108

1109 ROY, D. *et al.* Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-
1110 secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, v. 142, p. 4711-4720, 2001.

1111

1112 SANCHEZ-HIDALGO, M. *et al.* Age-related changes in melatonin synthesis in rat
1113 extrapineal tissues. **Exp. Gerontol.**, v. 44, n. 5, p. 328-334, 2009.

1114

1115 SANDHU, M.S. *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and
1116 development of glucose intolerance: a prospective observational study. **Lancet.**
1117 v. 359, p. 1740-5, 2002.

1118

1119

1120 SCAIANO, J. C. Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions
1121 and magnetic field effects in melatonin chemistry. **J Pineal Res.**, v. 19, p. 189-
1122 95, 1995.

1123

1124 SESTI, G. *Et al.* Plasma concentration of IGF-I is independently associated with
1125 insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance.
1126 **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 120-5, 2005.

1127

1128 SHARPLESS, J. L. Women's health issues in diabetes mellitus. In: Kahn CR,
1129 Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, eds. Joslin's diabetes
1130 mellitus. **LWW**, v. 14, p. 747-764, 2005.

1131

1132 SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence
1133 of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract** ., v. 87, n. 1, p. 4-14,
1134 2010.

1135

1136 SILVERMAN, B. L. *et al.* Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic
1137 mothers. **Diabetes**. v. 40, n. 2, p. 121-5, 1991.

1138

1139 SIROTKIN, A.V; SCHAEFFER, H. J. Direct regulation of mammalian reproductive
1140 organs by serotonin and melatonin. **J Endocrinol.**, v. 154, n. 1, p. 1-5, 1997.

1141 SKENE, D. J. *et al.*, "Daily variation in the concentration of melatonin and 5-
1142 methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's
1143 disease," **Brain Research.**, v. 528, n. 1, p. 170-174, 1990.

1144

1145 SOKUP, A. *et al.* Insulin resistance as estimated by the homeostatic method at
1146 diagnosis of gestational diabetes: estimation of disease severity and therapeutic
1147 needs in a population-based study. **BMC Endocr Disord.**, v. 13, p. 21, 2013.

1148

1149 SRINIVASAN, V. *et al.* Melatonin in Alzheimer's disease and other
1150 neurodegenerative disorders. **Behav Brain Funct.**, v. 2, p. 15, 2006.

1151

1152

1153 STEFULJ, J. *et al.* Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis
1154 in extrapineal tissues of the rat. **J. Pineal Res.** v. 30, n. 4, p. 243-247, 2001.
1155
1156 SUCCURRO, E. *et al.* Low plasma insulin-like growth factor-1 levels are
1157 associated with reduced insulin sensitivity and increased insulin secretion in
1158 nondiabetic subjects. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 19, p. 713-719, 2009.
1159
1160 TAKEDA, K. *et al.* Progressive development of insulin resistance phenotype in
1161 male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. **J Endocrinol** v. 176,
1162 p. 237-46, 2003.
1163
1164 TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus
1165 luteum. **Reprod. Domest. Anim.** v 39, p. 206, 2004.
1166
1167 TAMURA, H. *et al.* Melatonin and pregnancy in the human. **Reprod Toxicol.**, v.
1168 25, p. 291-303, 2008.
1169
1170 TAMURA, H. *et al.* Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological
1171 implication. **Fertil Steril.**, v. 92, p. 328-43, 2009.
1172
1173 TAMURA, H. *et al.* Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects
1174 oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **J. Pineal Res.**,
1175 2008 Apr;44(3):280-7.
1176
1177 TAMURA, H. *et al.* The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **J**
1178 **Ovarian Res.**, v.5, p.1757-2215, 2012.
1179
1180 TAN, D. X. *et al.* Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid,
1181 and an antioxidant vitamin. **J Pineal Res.**, v. 34, p. 75-78, 2003.
1182
1183 TAN, D. X.; CHEN, L.D, POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous
1184 hydroxyl radical scavenger. **Endocr J.**, v. 1, p. 57-60, 1993 a
1185

1186 TAN, D. X.; POEGGELER, B.; REITER, R. J. The pineal hormone melatonin
1187 inhibits DNAadduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo.
1188 **Cancer Lett.**, Jun 15;70(1-2):65-71, 1993.

1189

1190 THOMAS, B.; MOHANAKUMAR, K. P. Melatonin protects against oxidativestress
1191 caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse
1192 nigrostriatum. **J Pineal Res.**, v. 36, p. 25-32, 2004.

1193

1194 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control
1195 with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of
1196 complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet.**, v. 352, p.
1197 837-53, 1998.

1198

1199 VIELMA, J. R. *et al.* 2014. Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance
1200 to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. **Acta Tropica**, v. 137, p. 31-
1201 38. doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.021.

1202

1203 VIGIL-DE GRACIA, P.; OLMEDO, J.; Diabetes gestacional: conceptos actuales.
1204 **Ginecol Obstet Mex**, v 85, n. 6, p. 380-390, 2017.

1205

1206 VIJAYALAXMI. *et al.* Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics.
1207 **J Clin Oncol.** 2002 May 15;20(10):2575-601. doi: 10.1200/JCO.2002.11.004.
1208 PMID: 12011138.

1209

1210 VOICULESCU, S. E. *et al.* Role of melatonin in embryo fetal development. **J Med**
1211 **Life**, v. 7, p. 488-492, 2014.

1212

1213 WANG, Q. *et al.* Live Imaging Reveals the Link Between Decreased Glucose
1214 Uptake in Ovarian Cumulus Cells and Impaired Oocyte Quality in Female Diabetic
1215 Mice, **Endocrinology**, v 153, n 4, p. 1984-1989, 2012.

1216

1217 WANG, Q. *et al.* Maternal Diabetes Causes Mitochondrial Dysfunction andMeiotic
1218 Defects in Murine Oocytes, **Molecular Endocrinology**, v. 23, n 10, P. 1603-1612,
1219 2009.

1220

1221 WEIL, Z. M. *et al.* Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depressionlike
1222 behaviors and deficits in sensorimotor gating. **Brain Res Bull.**, v. 68, p. 425-9,
1223 2006.

1224

1225 WILLIS, D. *et al.* Modulation by insulin of folliclestimulating hormone and
1226 luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic
1227 ovaries. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 81, n. 1, p. 302, 1996.

1228

1229 WOAD, K.J. *et al.* Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and
1230 II and type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the
1231 oestrous cycle. **J. Reprod. Fertil**, v. 120, p. 293-302, 2000.

1232

1233 WORLD HEALTH ORGANIZATION. DEFINITION, diagnosis and classification of
1234 diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva,
1235 **World Health Organization**, 1999.

1236

1237 WU, Y. *et al.* Cellular stress, excessive apoptosis and the effect of metformin in
1238 a mouse model of type 2 diabetic embryopathy. **Diabetes**. v. 64, p. 2526-36,
1239 2015.

1240

1241 WU, Y. *et al.* Diabetes Induces Abnormal Ovarian Function via Triggering
1242 Apoptosis of Granulosa Cells and Suppressing Ovarian Angiogenesis. **Int. J.**
1243 **Biol. Sci.**, v. 13, p 1297-1308, 2017.

1244

1245 WU, Y. *et al.* High Fat Diet Triggers Cell Cycle Arrest and Excessive Apoptosis of
1246 Granulosa Cells during the Follicular Development. **Biochem. Biophys. Res.**
1247 **Commun.**,v, 466, p. 599-605, 2015.

1248

1249 WU, Y. *et al.* Type 2 diabetes mellitus induces congenital heart defects in murine
1250 embryos by increasing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and
1251 apoptosis. **Am J Obstet Gynecol** v. 215, p. 366, 2016.

1252

1253 WULFF, C. *et al.* Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and
1254 ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap
1255 R1R2. **Endocrinology**. v. 143, n. 7: p. 2797-807, 2002.

1256

1257 YANG, C. *et al.* Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3
1258 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. **J. Mol. Med.**,
1259 v. 94, n. 12, p. 1-13, 2016.

1260

1261 YU, T.; JHUN, B.S.; YOON, Y. High-Glucose Stimulation Increases Reactive
1262 Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein
1263 Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission. **Antioxid Redox Signal**, v.
1264 14, n. 3, p. 425-37, 2011.

1265

1266 ZHANG, B. *et al.* Overexpression of lncRNA ANRIL up-regulates VEGF
1267 expression and promotes angiogenesis of diabetes mellitus combined with
1268 cerebral infarction by activating NF- κ B signaling pathway in a rat model.
1269 **Oncotarget**, Mar 7;8(10):17347-17359, 2017.

1270

1271 ZHDANOVA I.V; TUCCI V. Melatonin, Circadian Rhythms, and Sleep. **Curr Treat**
1272 **Options Neurol**. May;5(3):225-229, 2003

1273

1274 ZIMMERMANN, R. C. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2-
1275 mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle
1276 development. **J. Clin. Investig.** v. 112, p. 659, 2011.

1277

1278 ZIMMET, P. Hyperinsulinaemia in youth is a predictor of type 2 (non-insulin-
1279 dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 35, p. 534-41, 1992,