

AVALIAÇÃO RENAL DE RATAS INDUZIDAS A SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E TRATADAS COM MELATONINA E METFORMINA

José Anderson da Silva Gomes¹
Maria Eduarda da Silva²
Geovanna Hachyra Facundo Guedes³
Marcos Aurélio Santos da Costa⁴
Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório⁵

INTRODUÇÃO

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) foi descrita pela primeira vez na década de 30 e vem sendo considerada como uma das desordens endocrinológicas mais frequentes em mulheres com idade reprodutiva (EHRMANN, 2005). Estima-se que no mundo, cerca de 5 a 20% da população feminina entre 15 e 49 anos de idade apresente a SOP, já no Brasil, esse distúrbio pode chegar a acometer 13% da população (AZZIS et al., 2016; CRISOTO et al., 2012; YAO et al., 2017). Essa síndrome caracteriza-se por oligoamenorréia associada a hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial. Pela elevada prevalência e frequente associação com situações clínicas diversas, a SOP tem merecido especial atenção devido as potenciais repercussões sobre a saúde da mulher, não apenas relacionadas ao sistema reprodutivo.

As mulheres com SOP exibem um perfil metabólico característico, que se apresenta frequentemente associado à resistência aumentada à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia, além da obesidade (DUNAIF et al, 1989; LAWS & REAVEN, 1993; PIATTI et al, 2000; BARBER et al, 2006). A resistência à insulina integra o elenco de adversidades do que denominamos de “síndrome metabólica”, uma condição que agrega diversos outros constituintes, tais como obesidade, hiperlipidemia pós-prandial, hiperandrogenismo, hipofibrinólise e alterações da função renal (REAVEN, 1993; BLOOMGARDEN, 2005a).

Estudos apontam que a resistência à insulina favorece a instauração e manutenção da SOP, estando presente em mais de 50% dos casos (DUNAIF et al, 1989; CARMINA & LOBO, 2004). Tendo em vista isso, considerando que a resistência à insulina participa dos aspectos fisiopatológicos envolvidos tanto na SOP quanto na síndrome metabólica, pode ser estabelecida uma ligação entre as duas condições (BLOOMGARDEN, 2005b).

Além das desordens da função ovariana e do quadro metabólico, a hiperinsulinemia em mulheres com SOP tem sido correlacionada com disfunção endotelial (DIAMANTI-

¹ Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, andy_silvacarte@outlook.com;

² Graduado pelo Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, mariaeduardaufpe@gmail.com;

³ Graduando pelo Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, geovannafacundo@gmail.com;

⁴ Mestrando do Curso de Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, marcosxp17@gmail.com;

⁵ Professor orientador: Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2007), mestrado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2010), Doutora em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2014), fcas14@hotmail.com.

KANDARAKIS et al, 2001; LAKHANI et al, 2005; LOWENSTEIN, 2007). Resultados de estudos envolvendo pacientes com diabetes tipo 2 apontam para a ocorrência de anormalidades da função renal como sendo um achado bastante significativo nos pacientes em estágio avançado da doença (RITZ & ORTH, 1999; ROSSING et al, 2004; TARCHINI et al, 2005), mas que também pode estar presente nos estágios precoces de alteração da tolerância à glicose (ROSENBAUM et al, 2004).

Devido a tais características, além de reduzir a taxa de ovulação, a SOP aumenta o risco de complicações durante a gestação, como o desenvolvimento de diabetes gestacional, hipertensão, riscos de pré-eclampsia, nascimentos prematuros e abortos (POLAK et al., 2017). Estima-se que na população em geral a taxa de diabetes gestacional é cerca de 3,25%, enquanto que nas mulheres portadoras da SOP, ocorre um aumento para 20-41% (JOHAM et al., 2014; MIKOLA et al., 2001).

Dentre os tratamentos disponíveis para SOP, a metformina, uma biguanida utilizada para tratar pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se o agente mais utilizado (McGRATH et al., 2018; SIVALINGAN et al., 2014). Parte da eficácia da metformina pode estar relacionada a suas ações diretas na esteroidogênese, devido a seus efeitos insulinosensibilizantes (MANSFIELD et al., 2003). Vários estudos têm indicado que a manutenção do tratamento com metformina durante a gravidez, principalmente nas portadoras de diabetes tipo 2, reduz o risco de abortos no primeiro trimestre (JAKUBOWICZ et al., 2002), e nascimentos prematuros, melhorando os resultados da gestação, (GLUECK et al., 2013). Conseqüentemente, muitas pacientes com ovários policísticos continuam o tratamento com a metformina durante a gravidez. Assim, o número de pacientes que utilizam esta biguanida durante o período gestacional vem aumentando consideravelmente (JOHNSON, 2011; MORIN-PAPUNEN et al., 2012).

Por outro lado, a metformina pode afetar diretamente o desenvolvimento embriológico, uma vez que tem a capacidade de atravessar a barreira materno/fetal livremente sendo encontrada no sangue da placenta e do cordão umbilical com as mesmas concentrações do sangue venoso materno (KOVO et al., 2008). Em estudo recente, observaram-se efeitos abortivos e malformações dos neonatos decorrentes da utilização da metformina (PANCHAUD et al., 2018), além de resultados controversos a nível renal e hepático, com a presença de acidose láctica, alterações enzimáticas e diversos efeitos gastrointestinais (LAUTATZIS; GOULIS; VRONTAKIS, 2013), como também alterações nas células testiculares dos neonatos (TARTARIN et al., 2012) e diminuição da massa corporal desses (HANEM et al., 2018; KOVO et al., 2008).

Com o objetivo de amenizar possíveis danos decorrentes da utilização da metformina, alguns estudos vêm associando esta biguanida a outras substâncias, como a melatonina, para o tratamento de algumas patologias (LE MOS et al., 2014). Lemos et al (2014), em estudos com ratas prenhes, induzidas à SOP, observaram melhoras a nível hepático e renal, tanto histopatologicamente quanto bioquimicamente, e na defesa antioxidante dos animais que foram tratados com a associação das drogas.

Além disso, sabe-se que a melatonina atua na liberação de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), do eixo pituitário-gonadal, regulando assim a secreção pituitária de Hormônio Luteinizante (LH) e Folículo Estimulante (FSH) para o controle do estro e ovulação. Atua também na produção de estrógeno e progesterona, na atividade funcional e crescimento ovariano, e devido as suas funções antioxidantes, reduz o estresse oxidativo nos folículos, protegendo assim os oócitos contra radicais livres (DEVOTO et al., 2002). Essa indolamina lipofílica também atravessa a placenta livremente sem ser alterada, atingindo a circulação fetal com facilidade, fornecendo informações fotoperiódicas para o feto, mediando diversas interações fisiológicas (GOLDMAN, 2003).

Assim, avaliar o efeito da metformina e da melatonina durante o período gestacional para o tratamento da SOP se faz necessário, bem como seus possíveis efeitos sobre os neonatos.

METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 32 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente $200g \pm 20g$, procedentes do Biotério do mesmo Departamento. Este experimento foi aprovado pelo CEUA, com a licença 19/2017. As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “ad libitum”, na temperatura de $22 \pm 1^\circ C$ e iluminação artificial que estabelecem o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, ao acaso, em quatro grupos, cada um, constituído por 8 animais; Grupo I- Animais sem indução da SOP (Controle); Grupo II- Animais induzidos à SOP (SOP); Grupo III- Animais induzidos a SOP e tratados com Metformina (SOP + Met); Grupo IV- Animais induzidos a SOP e tratados com Melatonina (SOP+ Mel).

A indução da Síndrome dos ovários Policísticos foi realizada em todos os animais dos grupos II, III e IV. Foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos. Para confirmação da indução, esfregaços vaginais foram realizados para identificação da aciclicidade estral das ratas.

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos, na dosagem de 50 mg/100g diluído em 0,05 mL de água destilada segundo a metodologia de Elia et al., dez dias antes e durante o período gestacional. O grupo II recebeu apenas água destilada.

O tratamento com melatonina foi realizado após aferição do peso das ratas, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima, nas ratas do grupo IV. A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal do animal, dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída na água de beber, durante a noite (18:00). Para garantir a ingestão, os animais passaram diariamente por um período de restrição hídrica de cerca de 4h. A melatonina foi administrada dez dias antes e durante o período gestacional.

Após o diagnóstico da SOP, e 10 dias de tratamento, as fêmeas foram pesadas e ao final do experimento as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular para remoção dos rins. Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. Os órgãos coletados foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente os órgãos foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) para análise de rotina histopatológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histopatológica renal demonstrou que no grupo controle (GI), a cápsula que reveste os rins encontra-se bem conservada estruturalmente, a região cortical apresentou os glomérulos renais, túbulo contorcido distal e proximal histologicamente preservados, com a presença de epitélio simples cúbico e vasos sanguíneos. A análise da região medular desse grupo também demonstrou que os vasos sanguíneos e o tubo coletor estão morfológicamente preservados. Os animais induzidos a síndrome do ovário policístico (GII) apresentaram uma região cortical com glomérulos preservados, porém o espaço capsular encontra-se completamente preenchido, demonstrando dessa forma uma grande congestão renal. Os túbulos contorcidos distais e proximais apresentaram significativa diminuição do lúmen tubular e tanto

a região medular quanto a cortical apresentaram uma intensa vascularização, muito provavelmente do processo congestivo. Os animais induzidos a SOP e tratados com metformina (GIII) apresentaram uma região cortical e glomérulos com um acentuado processo de renovação histológica e o espaço capsular com menor congestão quando comparados aos animais induzidos a SOP (GII). Além disso, o lúmen dos túbulos contorcidos proximais e distais estão semelhantes ao grupo controle (GI) com intensa vascularização. Além disso, os animais induzidos a SOP e tratados com melatonina (GIV) foi o que apresentou melhor reestruturação, mostrando características histológicas muito semelhantes ao grupo controle (GI) indicando dessa forma uma melhora substancial do quadro da SOP quando tratada com melatonina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A SOP como descrito é uma das desordens endocrinológicas mais frequentes em mulheres com idade reprodutiva, ela se caracteriza pela elevada prevalência e frequente associação com situações clínicas diversas, dentre elas, resistência aumentada à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia, além da obesidade. Esse quadro clínico é o principal responsável pelas alterações renais encontradas na prole das ratas induzidas a SOP. Tendo em vista isso, o objetivo do presente estudo foi buscar novas formas de tratamento para essas alterações renais focando no papel protetor da melatonina frente a lesões renais e fazendo um comparativo com a metformina que é o fármaco convencional utilizado no tratamento. Assim, o presente estudo demonstrou que os animais induzidos a SOP e tratados com melatonina (GIV), apresentaram um efeito ainda melhor na proteção e reversão das alterações renais quando comparados com os animais induzidos a SOP e tratados com metformina (GIII) que é o fármaco convencional utilizado no mercado. Além do presente estudo, faz-se a necessidade de buscar avaliar a atuação da melatonina e metformina em conjunto e da interação delas nos mais diversos sistemas orgânicos, correlacionando toxicidade e valores de dosagem dessas substâncias.

Palavras-chave: SOP; Metformina, Melatonina, Lesão Renal.

REFERÊNCIAS

AZZIZ, R. et al. Polycystic ovary syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**. v.2, p.16057, 2016.

BARBER, TM. et al. Obesity and polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol** 2006;65:137-45.

Bloomgarden ZT. Insulin resistance: causes and consequences. **Int Rev Neurobiol** 2005a;65:1-24.

CARMINA E, LOBO RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 2004;82:661-5.

COHEN A, MCCARTHY D, STOFF J. Direct hemodynamic effect of insulin in the isolated perfused kidney. **Am J Physiol Renal Physiol** 1989;257:F580-5.

CRISOSTO, N. et al. Improvement of hyperandrogenism and hyperinsulinemia during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: possible effect in the ovarian follicular mass of their daughters. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 218-224, 2012.

GOLDMAN, B. D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 192, p. 29-31, 2003.

DIAMANTI-KANDARAKIS E, SPINA G, CHRYSSA K, MIGDALIS I. Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:3595-98.

DUNAIF, A. et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. **Diabetes**. 1989;38:1165-74.

EHRMANN, D. A. Polycystic Ovary Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 24, n. 352, p. 1223-1236, 2005.

GOLDMAN, B. D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 192, p. 29-31, 2003.

JOHAM, A. E. et al. Gestational diabetes and type 2 diabetes in reproductive-aged women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.99, n.3, p.447-452, 2014.

KOVO, M. et al. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 136, p. 29–33, 2008.

LAUTATZIS, M. E.; GOULIS, D. G.; VRONTAKIS, M. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. **Metabolism clinical and experimental**, v. 62, p. 1522-1534, 2013.

LAWS A, REAVEN GM. Insulin resistance and risk factors for coronary heart disease. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, 1993;7:1063-78.

LEMOS, A. J. et al. Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. **Toxicology and Applied Pharmacology**.v.280, n.1, p.159-168, 2014.

MCGRATH, R.T. et al. Outcomes for Women with Gestational Diabetes Treated with Metformin: A Retrospective, Case-Control Study. **Journal of Clinical Medicine**. v. 7, n.3, 2018

MIKOLA, M. et al. Obstetric outcome in women with polycystic ovarian syndrome. **Human Reproduction**. v.16, n.2, p.226-229, 2001.

PIATTI, PM. et al. Relationship between endothelin-1 concentration and metabolic alterations typical of the insulin resistance syndrome. **Metabolism** 2000;49:748-52.

POLAK, K. et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**. v.40, n.1, p. 1–8, 2017.

PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 987–95, 2004.

SOARES, ELVIRA MARIA MAFALDO. Avaliação da prevalência de Síndrome Metabólica, Microalbuminúria e Risco Cardiovascular em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. 2007.

REAVEN GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annu Rev Med** 1993;44:121-31.

RITZ E, ORTH SR. Nephropathy in patients with type 2 diabete mellitus. **N England J Med** 1999; 341:1127-33.

ROSENBAUM, P. et al. Independent impact of glycemia and blood pressure in albuminuria on high-risk subjects for metabolic syndrome. **Clin Nephrol** 2004;61:369-76.

ROSSING, K. et al. Progression of nephropathy in type 2 diabetic patients. **Kidney Int**. 2004;66:1596- 605.

TARCHINI, R. et al. Type 2 diabetic nephropathy: clinical course and prevention proposals. **G Ital Nefrol** 2005;22 Suppl 31:S15-9.

TARTARIN, P. et al. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 11, p. 3304–3314, 2012.

YAO, K.; BIAN, C.; ZHAO, X. Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and gestational diabetes: Aggravated complication of pregnancy. **Experimental and Therapeutic Medicine**.v. 14, n.2, p. 1271–1276, 2017.