

# EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA METFORMINA E DA MELATONINA DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS E SUA REPERCUSSÃO NO PERFIL LIPÍDICO DE RATAS ALBINAS

Maria Luísa Figueira de Oliveira<sup>1</sup>

Jennyfer Martins de Caralho<sup>2</sup>

José Anderson da Silva Gomes<sup>3</sup>

Pedro Vinicius Silva Novis<sup>4</sup>

Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório<sup>5</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a síndrome dos ovários policísticos (SOP) é considerada uma das desordens endocrinológicas mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva, de causa multifatorial e com susceptibilidade associada a fatores de riscos genéticos e ambientais (Yao *et al.*, 2017). Nessa síndrome, a infertilidade feminina pode ser atribuída não apenas a anovulação crônica, mas também a diminuição dos oócitos e a qualidade do embrião (Plachot *et al.*, 2003) uma vez que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) a partir das células mononucleares é elevada em portadoras da SOP e o produto da peroxidação lipídica, decorrente do estresse oxidativo, aumenta consideravelmente no soro e no fluido folicular das mesmas (González *et al.*, 2006).

Devido a tais características, tem-se buscado alternativas terapêuticas para o tratamento da SOP, como a utilização de agentes antioxidantes associados a tratamentos pré-estabelecidos. Dentre eles, destaca-se a melatonina, um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal que atua na regulação do estrógeno e progesterona, na atividade funcional e crescimento ovariano, reduzindo o estresse oxidativo nos folículos, e protegendo os oócitos contra os radicais livres (Devoto *et al.*, 2002; Fujimoto *et al.*, 2002). Também foi observado que essa indolamina lipofílica atravessa a placenta livremente sem ser alterada, atingindo a circulação fetal com facilidade, mediando diversas interações fisiológicas fetais (Goldman *et al.*, 2003).

Dentre os tratamentos disponíveis, a metformina, uma biguanida utilizada para tratar pacientes obesos com diabetes tipo 2, tornou-se o agente mais utilizado devido a seus efeitos diretos sobre a esteroidogênese (Mansfield *et al.*, 2003). Assim, como a melatonina é um potente agente antioxidante e eliminador de radicais livres, e o estresse oxidativo é uma condição presente na SOP (Glueck *et al.*, 2013), testamos a hipótese de que a utilização da melatonina associada à metformina poderia reduzir os níveis do desequilíbrio redox, influenciando, conseqüentemente, no reflexo do perfil lipídico, tornando-se uma alternativa terapêutica eficaz para essa enfermidade durante a gestação.

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Departamento de Histologia e Embriologia, malufigueira\_2@outlook.com;

<sup>2</sup> Graduanda do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Departamento de Histologia e Embriologia, geovannafacundo@gmail.com

<sup>3</sup> Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Departamento de Histologia e Embriologia, andy\_silvacarte@outlook.com;

<sup>4</sup> Graduando do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Departamento de Histologia e Embriologia, pedro.novissp@gmail.com;

<sup>5</sup> Doutora em Biociência Animal, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Departamento de Histologia e Embriologia, fcas14@hotmail.com

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizadas 40 ratas albinas da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente  $200\text{g} \pm 20\text{g}$ , procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Este experimento foi aprovado pelo CEUA, com a licença 19/2017. 102

As ratas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água “ad libitum”, na temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e iluminação artificial de 12 horas claro e 12 horas escuro. 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 em cinco 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); Grupo V- Animais induzidos a SOP tratados com Metformina e Melatonina (SOP+Mel+Met).

### 2.2 Indução da SOP

A indução da Síndrome dos ovários Policísticos foi realizada em todos os animais dos grupos II, III, IV e V. Foi realizada mediante gavagem de Letrozol na dosagem de  $1\text{mg/kg/dia}$  durante 21 dias consecutivos (Kafali *et al.*, 2004). Para confirmação da indução, esfregaços vaginais foram realizados para identificação da aciclicidade estral das ratas.

### 2.3 Tratamento com metformina

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos III e V, na dosagem de  $50\text{mg}/100\text{g}$  diluído em  $0,05\text{mL}$  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.

### 2.4 Tratamento com melatonina

O tratamento com melatonina foi realizado após aferição do peso das ratas, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima *et al.*, nas ratas do grupo IV e do grupo V. A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada na dose de  $0,5\text{mg/kg}$  de peso corporal do animal, dissolvida em um volume de etanol ( $0,02\text{mL}$ ) 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.

### 2.5 Acasalamento

Após o diagnóstico da SOP, e 10 dias de tratamento, as fêmeas foram pesadas e permitidas ao acasalamento na proporção de um macho para duas fêmeas, diariamente, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã seguinte (06:00h), foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro à presença de espermatozoides nos esfregaços vaginais, corados pelo método de Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

### 2.6 Dosagens Bioquímicas

As ratas de todos os grupos experimentais foram imobilizadas utilizando-se um contensor para a coleta do sangue por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G),

o sangue foi coletado antes da indução da SOP, após a indução, após 10 dias dos respectivos tratamentos e durante a gestação, nos tempos de 7, 14 e 21 dias de prenhez. Após centrifugação refrigerada, o soro foi acomodado em microtubos (ependorfs) e congelado a -20°C até o momento das dosagens (Teixeira *et al.*, 2004), que foram realizadas em triplicatas. As dosagens de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), HDL, LDL, VLDL e glicose dos animais foram realizadas utilizando kits reagentes da Doles, conforme especificações do fabricante.

### **2.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada em um programa computacional GraphicPad Prism 5, onde dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ), e Anova Two-way, para análise da ciclicidade.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Perfil lipídico e níveis de glicose**

O perfil lipídico observado nos diferentes grupos experimentais demonstrou um aumento nos níveis de colesterol total naqueles animais que foram induzidos à SOP, diferindo significativamente do grupo controle, o colesterol total foi normalizado após os respectivos tratamentos, tanto com metformina, melatonina e sua associação. No terço inicial da gestação foi observado diminuição característica do colesterol total nos animais dos grupos que receberam as monoterapias ou sua associação. No terço médio da gestação verificou-se um aumento expressivo nos animais tratados com a associação. Já no terço final da gestação verificou-se uma redução significativa nos animais dos grupos que receberam as monoterapias ou sua associação. Os triglicerídeos também se apresentaram elevados após a indução da policistose, tendo seus níveis reduzidos apenas nos animais tratados com melatonina e a associação dos fármacos. Não foram observadas diferenças entre os grupos na fase inicial e média da gestação, entretanto com 21 dias, apenas os animais que receberam melatonina e a sua associação com a metformina apresentaram níveis semelhantes àqueles observados no grupo controle.

Os níveis de HDL apresentaram-se reduzidos após a indução da SOP, e tiveram seus níveis normalizados após os respectivos tratamentos, entretanto, no terço inicial da gestação verificou-se uma redução nos animais tratados com melatonina e a associação. No terço médio apenas a associação reduziu sendo semelhante aos animais do grupo II. E no terço final do período gestacional, os animais que receberam os diferentes tipos de tratamento apresentaram uma redução do HDL, diferindo dos animais do grupo controle e do GII, mas sem diferir significativamente entre si (Tabela 4). O LDL apresentou-se elevado nos animais que foram induzidos à SOP, diferindo significativamente dos animais do grupo I. Com 10 dias de tratamento, tanto com metformina, melatonina e a associação dos fármacos, seus níveis se regularizaram assemelhando-se aos animais do grupo controle. Esse mesmo resultado foi observado no terço inicial da prenhez. Com 14 dias apenas as monoterapias promoveram normalização dos níveis dessa fração do colesterol e com 21 dias de prenhez ocorreu uma redução acentuada nos animais que receberam os diferentes tratamentos, diferindo significativamente dos animais do grupo I.

Os níveis de VLDL foram aumentados após a indução da SOP. Após 10 dias de tratamento todos os animais dos grupos induzidos a SOP independente ou não do tratamento apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo controle. Esse mesmo efeito foi observado no terço inicial e médio da gestação. Entretanto, no terço final da gestação apenas os animais dos grupos tratados com melatonina e associação apresentaram níveis semelhante

aos animais do grupo controle. Os níveis de glicose foram aumentados após a indução da SOP. Após 10 dias de tratamento todos os animais dos grupos induzidos a SOP independente ou não do tratamento apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo controle, permanecendo assim no terço inicial e médio da gestação. No terço final da gestação evidenciou-se redução apenas nos animais tratados com a associação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metformina possui efeitos diretos na esteroidogênese ovariana através da inibição da CYP 17 com redução da expressão do seu RNA mensageiro, e também diminui a insulina, atenuando a produção androgênica pelas células da teca, restaurando a ciclicidade dos animais (Pai *et al.*, 2014). A melatonina, por sua vez, é capaz de regular a produção dos hormônios sexuais, a foliculogênese e a maturação oocitária (Nakamura *et al.*, 2003). Além disso, mulheres portadoras da SOP apresentam diminuição ovariana desse hormônio que pode estar relacionada com a anovulação e perda da qualidade do oócito presentes nessa síndrome (Terzieva *et al.*, 2013), então, a utilização de melatonina exógena regularia a ciclicidade estral dos animais.

Outra característica resultante da indução da SOP pelo letrozol é que os animais exibem alguns distúrbios metabólicos da SOP humana como o aumento do peso e da gordura corporal, colesterol total e triglicerídeos (Sasikala *et al.*, 2009). Tais características também foram observadas na presente pesquisa, onde os animais do grupo II apresentaram peso, CT, TG, LDL e VLDL elevados em comparação com os demais grupos, sendo esse efeito atenuado após a utilização da metformina, melatonina ou a associação dos fármacos. Essa diminuição lipídica no tratamento com melatonina pode ser decorrente dos seus efeitos no tecido adiposo marrom, via desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria (Cipolla-Neto *et al.*, 2014). Além disso, estudos demonstraram que a suplementação com melatonina é capaz de reduzir tanto o ganho de peso corporal quanto a quantidade de gordura visceral depositada, independente da ingestão de alimentos (Tan *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Mohammadi-Sartang *et al.*, demonstrou que a melatonina pode exercer efeitos diretos nos níveis de colesterol e triglicerídeos dependendo da dose utilizada e do seu tempo de administração.

A metformina por sua vez, também pode atuar na diminuição de peso corporal, sendo predominantemente indicada para tratar pacientes com resistência à insulina e obesidade relacionadas à SOP (Haas *et al.*, 2017). Sua utilização pode controlar o metabolismo dos lipídios e a ingestão de alimentos, como demonstrado no estudo de Araújo *et al.*, Além disso, a metformina regula de forma direta os níveis de CT, LDL e peso corporal como demonstrado por Solymar *et al.*

Assim, diante de todos esses achados, pode-se concluir que as monoterapias apresentaram maior eficácia em normalizar os parâmetros decorrentes da indução da SOP durante o período gestacional quando comparadas com a associação dos fármacos, destacando-se a utilização da melatonina exógena, podendo esta, diante de todos os seus efeitos benéficos, ser considerada uma alternativa terapêutica para o tratamento da SOP.

**Palavras-chave: Melatonina; Metformina; Metabolismo; SOP; Perfil lipídico.**

## REFERÊNCIAS

Araujo G G, Araújo M B, Mota, CSA, Ribeiro C, D'Angelo R A, Manchado FB, Luciano E. Respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos obesos tratados com metformina. **Rev Bras Med Esp** 2007;13(6).

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J Pineal Res** 2014;56(4):371-38

Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. Control of human luteal steroidogenesis. **Mol Cell Endocrinol** 2002; 186 (2): 137-141.

Elia E, Sander V, Luchetti CG. The mechanism involved in the action of metformin regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. **Mol Human Rep** 2006; 12 (1):475-481

Fujimoto A, Osuga Y, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Momoeda M, Kugu K, Koga K, Morita Y, Wada O, Taketani Y. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rat in patients with low- late midluteal estradiol levels in IVF cycles. **J Assist Reprod Gen** 2002; 19 (12): 550-554

Glueck CJ, Goldenberg N, Pranikoff J, Khan Z, Padda J, Wang P. Effects of metformin-diet intervention before and throughout pregnancy on obstetric and neonatal outcomes in patients with polycystic ovary syndrome. **Curr. Med Res Opin** 2013; 29 (1): 55-62

Goldman BD. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Sci STKE** 2003; 192: 29-31

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91 (1):336-340.

Haas J, Bentov Y. Should metformin be included in fertility treatment of PCOS patients? **Med. Hyp** 2017; 100:54-5

Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. **Arch Med Res** 2004; 35 (2):103-108

Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. **Fertil Steril** 2003;79 (4):956-962.

Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clin Nutr** 2018;37(6):1943-1954.

Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertil Steril** 2003;80(4):1012-6.

Pai SA, Majumdar AS. Protective effects of melatonin against metabolic and reproductive disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. **J Pharm Pharmacol** 2014;66 (12): 1710-1721

Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier A, Serkine AM, Boujenah A, Abirached F. Oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome. **Gynecol Obstet Fertil** 2003; 31(4):350–354

Prata-Lima MF, Baracat EC, Simões MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Braz J Med Biol Res** 2004; 37 (7):987-995

Sasikala SL, Shamila S. Unique rat model exhibiting biochemical fluctuations of letrozole induced polycystic ovary syndrome and subsequent treatment with allopathic and ayurvedic medicines. **J Cel Tis Res** 2009; 9: 2013–2017.

Solymár M, Ivic I, Pótó L, Hegyi P, Garami A, Hartmann P, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Gyöngyi Z, Sarlós P, Simon M, Mátrai P, Bérczi B, Balaskó M. Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly - A meta-analysis. **PLoS One** 2018;13(11):e0207947.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **J Exp Bot** 2012;63(2):577-597.

Teixeira AAC, Simoes MJ, Wanderley Teixeira V, Soares Junior JM. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **Int J morph** 2004; 22(3):189-194

Terzieva DD, Orbetzova MM, Mitkov MD, Mateva NG. Serum melatonin in women with polycystic ovary syndrome. **Folia Med** 2013; 55(2):10-15.

Yao K, Bian C, Zhao X. Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and gestational diabetes: Aggravated complication of pregnancy. **Exp Ther Med** 2017; 14 (2): 1271–1276.