

# ANÁLISE MORFOMÉTRICA RENAL DA METFORMINA ASSOCIADA À MELATONINA NO TRATAMENTO DA SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS

Marcos Aurélio Santos da Costa <sup>1</sup>

Maria Luísa Figueira de Oliveira <sup>2</sup>

Bruno Eduardo Arruda Alves <sup>3</sup>

Bárbara da Silva Gonzaga <sup>4</sup>

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

## 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 (AZZIZ et al., 2016; CRISOSTO et al., 2012; YAO et al., 2017).

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-eclâmpsia, 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; SIVALINGAM et al., 2014). 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 (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 (LEMOS et al., 2014). Lemos et al (2014), em estudos com ratas prenhes, induzidas à SOP, observaram melhoras a nível hepático, tanto histopatologicamente quanto bioquimicamente, e na defesa antioxidante dos animais que foram tratados com a associação das drogas.

Assim, avaliar o efeito da metformina e sua associação com melatonina durante o período gestacional para o tratamento da SOP se faz necessário, bem como seus possíveis efeitos sobre os rins, visto que este órgão possui a função de excreção no organismo.

<sup>1</sup>Mestrando do Curso de **MORFOTECNOLOGIA** da Universidade Estadual - UFPE, [marcosxp17@gmail.com](mailto:marcosxp17@gmail.com);

<sup>2</sup>Graduanda do Curso de **BIOMEDICINA** Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, [malufigueira\\_2@outlook.com](mailto:malufigueira_2@outlook.com)

<sup>3</sup>Graduando do Curso de **ODONTOLOGIA** Uninove- SP, [brunoalvesodontologia24@gmail.com](mailto:brunoalvesodontologia24@gmail.com);

<sup>4</sup>Graduanda do Curso de **BIOMEDICINA** Universidade Federal de Pernambuco- UFPE; [barbaragonzaga@outlook.com](mailto:barbaragonzaga@outlook.com)

<sup>5</sup> Professora orientador: Dra, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, [fcas14@hotmail.com](mailto:fcas14@hotmail.com).

## **METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)**

### **Animais**

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 40 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°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 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).

### **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 1mg/kg/dia durante 21 dias consecutivos. Para confirmação da indução, esfregaços vaginais foram realizados para identificação da aciclicidade estral das ratas.

### **Tratamento com metformina**

O cloridrato de metformina foi administrado por gavagem nos animais dos grupos III e V, 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.

### **Tratamento com melatonina**

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 e do grupo V. 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.

### **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 a presença de espermatozoides nos esfregaços vaginais, corados pelo método de Shorr-Harris, sendo este dia considerado o primeiro dia gestacional.

### **Análise morfométrica**

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 rins foram pesados e em seguida fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina -

Eosina (H. E.) para análise de rotina histopatológica. Para medição das camadas da área e do diâmetro do glômerulo, fotomicrografias na objetiva de 40x foram realizadas para análises utilizando o programa Image J.

## **DESENVOLVIMENTO**

A síndrome dos ovários policísticos foi descrita pela primeira vez em 1935 por dois médicos, Stain e Leventhal, que trataram pacientes que apresentavam características em comum, como amenorreia, hirsutismo, aumento dos ovários e aparecimento de múltiplos cistos neste órgão (SIRMANS; PATE, 2014; STEIN; LEVENTHAL, 1935). Após muitas controvérsias, com realização de estudos posteriores, chegou-se à conclusão de que as pacientes de Stain e Leventhal faziam parte de um subgrupo de mulheres portadoras de uma doença complexa e heterogênea, que foi então denominada de Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) (GOLDZIEHER, 1981; YEN, 1980). Atualmente a SOP é considerada uma das desordens endocrinológicas mais frequente em mulheres em idade reprodutiva, de causa multifatorial e com susceptibilidade associada a fatores de riscos genéticos e ambientais (YAO et al., 2017). Sua prevalência varia de acordo com o critério de diagnóstico utilizado, uma vez que possui diferentes formas de apresentação dos sintomas, podendo chegar a acometer cerca de 2,2-26% da população feminina (ASUNCION et al., 2000; AZZIZ et al., 2004; KNOCHENHAUER et al., 1998; MARCH et al., 2010; YAO et al., 2017).

Dentre diversas estratégias terapêuticas, a utilização de drogas insulinosensibilizantes para o tratamento de anormalidades reprodutivas relacionadas à resistência à insulina, vem se destacando (DIAMANTI- KANDARAKIS et al., 2012), desta forma, vários estudos têm avaliado a eficácia da metformina no tratamento da anovulação decorrente da SOP (COSTELLO; EDEN, 2003; SUN; ZHANG; ZHANG, 2013). A droga é distribuída rapidamente após absorção não se ligando as proteínas plasmáticas e sem produzir metabólitos ou conjugados sendo excretada pelos rins e na bile sem ser alterada. As taxas de liberação no rim são variáveis, dessa forma a dose de metformina deve ser ajustada de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) e aproximadamente 30% da droga é excretada diretamente pelas fezes (GRAHAM et al., 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise morfométrica demonstrou que a área e o diâmetro dos glomerulos renais das ratas tratadas com metformina e melatonina (GV) apresentaram áreas e diâmetros conservados igualmente ao grupo controle (GI). Estes achados morfométricos corroboram com os estudos de DE MACEDO, 2017, onde foi analisado o tratamento conjunto de metformina e melatonina para ratos diabéticos, apresentando nenhuma observou diferença significativa. A metformina ajuda na ação do tratamento da SOP e seus resíduos são excretados pelos rins (GRAHAM et al., 2011) e a melatonina reduz o estresse oxidativo desta última, visto que é uma molécula com propriedade antioxidante e lipofílica, passando livremente pela membranas celulares (LE MOS et al., 2014).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O tratamento sinérgico de metformina e melatonina gerou uma grande conservação do parênquima renal, visto que a nível morfométrico não acarretou alterações morfométricas. São necessários estudos futuros em cima da bioquímica renal, visto que alterações enzimáticas

ocorrem primeiro que alterações celulares, assim como pesquisa de imunohistoquímica visando saber se naquele órgão está ocorrendo apoptose ou proliferação celular.

**Palavras-chave:** metformina; melatonina, rins, SOP.

## REFERÊNCIAS

ASUNCION, M. et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 85, p. 2434–2438, 2000.

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

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.

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

GOLDZIEHER, J.W. Polycystic ovarian disease. *Fertility and Sterility*, v.35: p.371-394,1981.

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.

KNOCHENHAUER, E. S. et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, p. 3078–3082,1998.

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.

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.

MARCH, W. A. et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*, v. 25, p. 544-51, 2010.

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.

PANCHAUD, A. et al. Pregnancy outcomes in women on metformin for diabetes or other indications among those seeking teratology information services. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v.84, n.3, p.568-578, 2018.

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.

DE MACEDO, SIMONE REGINA BARROS. Alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas em ratos wistar diabéticos, submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina. 2017.

SIRMANS, S. M.; PATE, S. K. A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 1-13, 2014.

SIVALINGAM, V.N. et al. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. **Human Reproduction Update**. v.20, n.6, p.853-868, 2014.

STEIN, I. F.; LEVENTHAL, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. **America Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 181–191, 1935.

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.

YEN, S.S.C.The polycystic ovary síndrome.**Clinical Endocrinology**,v.12: p.177-182, 1980.