

EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO PERINATAL E INTERVENÇÃO PERIPUBERAL COM METFORMINA NO CICLO REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR

Ana Letícia Mans Assakawa¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anna Carolina Hupples de Souza¹, Mariana Narciso Constancio¹, Marcos Vinícius Martins¹, Scarlett Rodrigues Raposo¹, Douglas Lopes Almeida¹ (Coorientador) Paulo Cesar de Freitas Mathias¹ (Orientador). E-mail: analeticiamanso@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular Laboratório Experimental em DOHaD (Lex DOHaD), Maringá, PR.

Fisiologia, Fisiologia de Órgãos e Sistemas

Palavras-chave: Adolescência, Obesidade, Sistema Reprodutor

RESUMO

Interferências em fases como a lactação e a adolescência podem levar a uma programação no organismo. A superalimentação na fase perinatal reproduz o modelo de obesidade precoce, trazendo efeitos sobre o metabolismo e sistema reprodutor, já a administração da metformina na adolescência mostrou-se hábil para melhorar parâmetros de obesidade. Hipotetizamos que os prejuízos formados no metabolismo e ciclo estral de ratas Wistar devido a hiperalimentação perinatal poderiam ser atenuados pelo tratamento de metformina na adolescência. Utilizamos a ninhada normal (NL), com 9 filhotes por mãe e animais de redução de ninhada - "small litter" (SL), em que houve redução para 3 filhotes (até PN21), para indução de superalimentação e sobrepeso nas ratas. No período de 30 dias durante a adolescência (PN30-PN60) as ratas dos grupos NL-metformina e SL-metformina receberam metformina via água de beber na dose de 300mg/kg de peso corporal/dia. Durante 30 dias após a abertura vaginal observou-se os estágios do ciclo estral através da realização do esfregaço vaginal. Os animais dos grupos NL mostraram maior regularidade do ciclo quando comparados aos animais do grupo SL. Ademais, a aplicação de metformina durante a adolescência mostrou-se eficaz para regularizar o ciclo estral e atraso na abertura vaginal. Portanto, a superalimentação mostra prejuízos ao ciclo estral de ratas enquanto a metformina melhorou esses parâmetros.

INTRODUÇÃO

O conceito DOHaD "Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença" advém do estudo que explora as janelas críticas do desenvolvimento para programação da saúde e doença nas diferentes etapas da vida. (FALL, KUMARAN, 2019). A análise de estudos experimentais evidencia que o modelo de superalimentação no estágio

perinatal é capaz de induzir obesidade na fase adulta e aumentar a probabilidade de síndrome cardiometabólica (HOU et al, 2011). As alterações metabólicas podem exercer influência tanto no curto quanto no longo prazo, acarretando implicações em etapas cruciais do desenvolvimento, como a puberdade. A superalimentação durante a fase de lactação acelera a maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, estimulando tal eixo e intensificando a sensibilidade aos glicocorticoides no tecido adiposo (BOULLU-CIOCCA et al, 2005). Nas fêmeas, a fase da adolescência coincide com o início do ciclo estral e a abertura do canal vaginal, observado em ratas Wistar entre 34 e 39 dias em sintonia com o aumento na liberação de LH e FSH, estrógeno e progesterona, que determinarão este ciclo (WESTWOOD, 2008). O estudo do ciclo estral em roedores é conduzido por meio de esfregaços de secreção vaginal e análises histológicas do sistema reprodutivo, considerando que a duração do ciclo varia entre 4 e 5 dias, abrangendo as fases de Diestro, Proestro, Estro e Metaestro (WESTWOOD, 2008). A literatura sugere que a programação metabólica neonatal, através de ajustes nos eixos de regulação metabólica centrais, pode ter implicações significativas no desenvolvimento juvenil, afetando parâmetros biométricos, metabólicos e reprodutivos. Ademais, a metformina, um fármaco utilizado com tratamento para DM2 e obesidade, tem se mostrado eficaz para melhorar aspectos metabólicos durante a fase pré-pube e púbere (PASTOR-VILLAESCUSA, B. et al, 2017). Assim, hipotetizamos que o tratamento de metformina durante a adolescência seria capaz de atenuar os efeitos que a hiperalimentação durante a fase perinatal pode causar sobre o ciclo estral e maturação sexual das ratas fêmeas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e condições experimentais: Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas do CEUA (protocolo N° 4831020822). Fêmeas prenhas advindas do biotério central foram mantidas no biotério setorial. No nascimento (PN0) as ninhadas foram mantidas com 9 filhotes por ninhada. No PN3, o grupo “*Small Litter*” (SL) teve sua ninhada reduzida para 3 animais, para induzir superalimentação (Fig. 1). O desmame foi realizado no PN21 (n= 4-7 ninhadas por grupo). Apenas ratas fêmeas foram utilizadas para os protocolos experimentais. Após o desmame, os animais foram acondicionados em 3 ratas por caixa. No PN30 teve início o tratamento com metformina, administrado via água de beber na dose de 300 mg/kg de peso corporal/dia até o PN60, resultando em 4 grupos: SL-MET, SL-CONTROLE, NL- MET e NL-CONTROLE.

Condições de biotério: Os animais permaneceram com água e comida à vontade até o PN120. **Abertura Vaginal:** Após o desmame, avaliou-se visualmente os animais todos os dias para determinação do início da maturação sexual, evento caracterizado pela abertura do canal vaginal. **Esfregaço Vaginal:** A partir da abertura vaginal realizou-se por 30 dias esfregaços em lâmina por meio da coleta de secreção vaginal utilizando uma pipeta *pasteur* de 1,5 ml com solução salina e colocado na lâmina. As lâminas foram analisadas no microscópio óptico. De acordo com os tipos celulares visualizados foi determinada a fase do ciclo em: Proestro (Fig.

2.A); Estro (Fig. 2.B), Metaestro (Fig. 2.C) e Diestro (Fig. 2.D). *Determinação da duração e regularidade do ciclo estral:* O ciclo teve duração a partir da primeira fase estro, até a próxima fase estro. Foram considerados ciclos regulares os de 4 a 5 dias de duração com 1 a 2 fases estro entre elas. *Tratamento Estatístico dos Dados:* Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Foram submetidos ao teste t de Student e um $p < 0,05$ foi considerado o limiar de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos SL apresentaram maior número de ciclos estrais desregulados em comparação com os animais NL, enquanto a metformina obteve efeito regulador sobre o ciclo em ambos (Fig. 3 e 4). Isso nos indica que ao melhorar os parâmetros biométricos, como na diminuição do ganho de peso (Fig. 5), há uma melhora na regulação hormonal das ratas, especialmente no ciclo de estrogênio. A administração da metformina provocou um retardo na abertura vaginal (Fig. 6), dos grupos SL-met e NL-met quando comparado respectivamente ao SL-controle e NL-controle. Esses dados indicam uma relação entre o início da puberdade com o metabolismo na fase imediatamente anterior, mostrando a possibilidade do centro regulador dos hormônios em relação a parâmetros metabólicos, como o hipotálamo. Apesar das análises anteriores terem mostrado grande diferença de resultados entre os grupos tratados, a média de duração do ciclo não apresentou diferença entre os grupos (Fig. 7), demonstrando que a duração do ciclo não foi influenciada pelo tipo de ninhada ou tratamento.

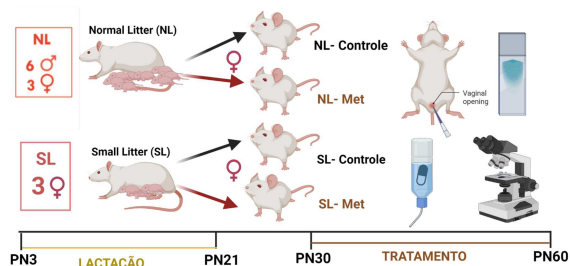


Figura 1- Representação do modelo experimental

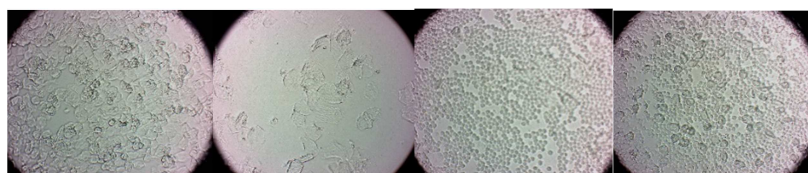


Figura 2- Lâminas do esfregaço nos ciclos: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro, respectivamente

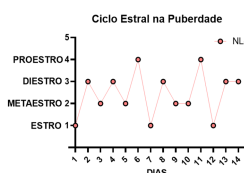


Figura 3A

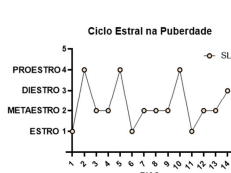


Figura 3B

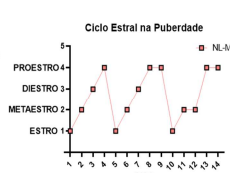


Figura 3C

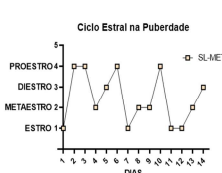


Figura 3D

Figura 3- Figura representativa do ciclo estral dos respectivos grupos.

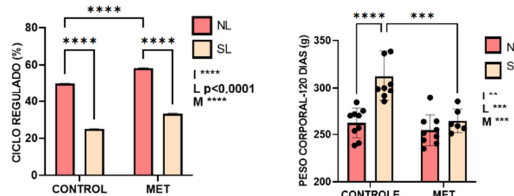


Figura 4- Ciclos regulados em porcentagem(n=4-8). **Figura 5-** Massa corporal aos 120 dias.

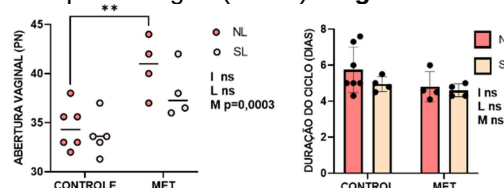


Figura 6- Data de abertura vaginal(n=4-8) **Figura 7-** Duração do Ciclo Estral (n=4-8)

CONCLUSÕES

A hiperalimentação na fase perinatal provoca uma desregulação no ciclo estral de ratas fêmeas, e a introdução da metformina durante a puberdade mostra-se capaz de atenuar esse parâmetro.

AGRADECIMENTOS

As instituições de fomento: CNPq e a Fundação Araucária, que permitiram a realização desse projeto com a bolsa de iniciação científica

REFERÊNCIAS

BOULLU-CIOCCA, S et al. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 197-203, 2005.

GHASEMI, A; JEDDI, S; KASHFI, K. The laboratory rat: Age and body weight matter. **EXCLI journal**, v. 20, p. 1431, 2021. HOU, M et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e25726, 2011.

PASTOR-VILLAESCUSA, B., et al (2017). Metformin for Obesity in Prepubertal and Pubertal Children: A Randomized Controlled Trial. **Pediatrics**, 140(1), e20164285.

WESTWOOD, F. Russell. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 3, p. 375-384, 2008.