

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM OVARIOS DE CAMUNDONGOS DE ACORDO COM A IDADE E TIPO DE DIETA**

**LÍGIA ANTUNES PRITESCH<sup>1</sup>; DRIELE GARCIA NESKE<sup>2</sup>; RENATA ABIB<sup>3</sup>;  
CARLOS CASTILHOS BARROS<sup>4</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Nutrição - [ligiaprietsch@hotmail.com](mailto:ligiaprietsch@hotmail.com)

<sup>2</sup>Faculdade de Nutrição - [drika\\_neske@yahoo.com.br](mailto:drika_neske@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Faculdade de Nutrição - [renata.abib@ymail.com](mailto:renata.abib@ymail.com)

<sup>4</sup>Faculdade de Nutrição - [barroscpel@gmail.com](mailto:barroscpel@gmail.com)

<sup>5</sup>Faculdade de Nutrição - [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

Durante a vida reprodutiva das fêmeas mamíferas, a reserva de folículos ovarianos é reduzida progressivamente em ciclos de maturação e atresia, até que se esgote e tenha início o período conhecido como menopausa (MATSUDA et al, 2011). O fator de transcrição forkhead Box 3a (FOXO3a) é necessário para manter a reserva ovariana. O FOXO3 protege a reserva de folículos primordiais ovarianos em mamíferos e é um possível determinante do início da menopausa, visto que quando constitutivamente ativo pode estender a capacidade reprodutiva do ovário em ratos (PELOSI et al, 2013).

O excesso de ingestão de alimentos de alto teor calórico pode aumentar os fatores de risco para problemas de saúde, inclusive reduzir a fertilidade. O oócitos de mulheres obesas submetidas a técnicas de reprodução assistida, assim como de camundongos fêmeas com obesidade induzida por dieta dão origem a blastocistos de qualidade inferior, e, portanto, com menor probabilidade de gerar uma gestação de sucesso (LUKE, 2011). Estudos anteriores mostram que a dieta rica em calorias pode afetar a expressão de FOXO3a (FANG, 2008).

Espécies reativas ou também chamadas radicais livres participam de reações fisiológicas normais no ovário e no embrião (WELLS, 2005). No entanto, sabe-se que quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e capacidade antioxidante pode levar ao estresse oxidativo, esse estresse leva ao desenvolvimento de patologias reprodutivas e quadros de infertilidade (AGARWAL, 2003). Neste sentido, a enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) tem papel de proteger as células contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio. No entanto, a via exata da reação adaptativa celular da MnSOD associada ao estresse oxidativo, ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se principalmente que o FOXO3a tem papel essencial na promoção da expressão de MnSOD em diversos tecidos, inclusive no processo de envelhecimento celular (DEMET et al, 2013).

Baseado nisso, o presente estudo tem como objetivo comparar a expressão gênica de FOXO3a e MnSOD no ovário de camundongos fêmeas de acordo com a idade (jovens vs. velhas) e tipo de dieta (normal vs. hipercalórica e hiperlipídica).

### **2. METODOLOGIA**

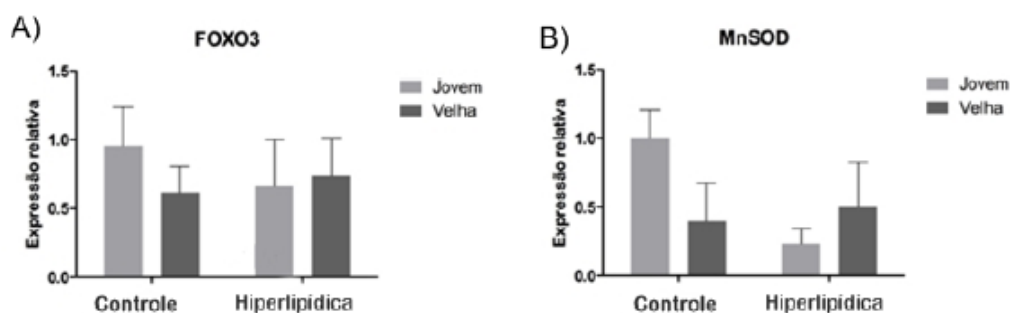
O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPEL sob o número 9106. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, sendo 9 fêmeas jovens com aproximadamente 4 meses de idade e 12 fêmeas idosas com 13-14 meses de idade. As fêmeas foram divididas em quatro

grupos: Grupo 1 formado por 5 fêmeas jovens com dieta normal (grupo controle); grupo 2 por quatro fêmeas jovens com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica; grupo 3 por 6 fêmeas idosas com dieta normal (grupo controle); e o grupo 4 formado por 6 fêmeas idosas com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da UFPel e durante o experimento foram mantidos e alimentados durante 55 dias no Laboratório de Nutrição Experimental em estantes ventiladas, sob temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade (40-60%) controladas. As dietas foram elaboradas segundo a AIN-93 (REEVES et al, 1993), para a dieta hiperlipidêmica experimental foi adicionado 120g de banha de porco e 10g colesterol em substituição a 191g de amido de milho para cada 1kg da ração normal da AIN-93. Os animais passaram por um período de adaptação de 1 semana e então foi iniciada a suplementação com as respectivas dietas de acordo com o grupo experimental.

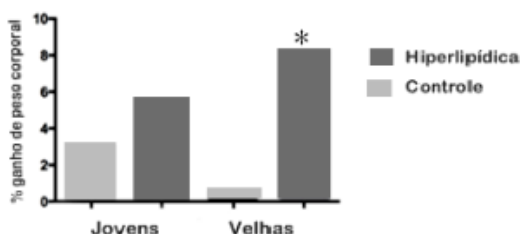
Ao final do experimento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e tiveram sangue e tecidos coletados após a decapitação. Foram coletados os ovários, lavados em solução salina e armazenados em um tubo (1 tubo por fêmea), adicionados de 0,5mL de Trizol, homogenizados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  conforme previamente padronizado. A extração do RNA foi feita pelo método do Trizol, conforme o seu protocolo padronizado e a avaliação da integridade do RNA feita por eletroforese em gel de agarose. Após síntese de DNA complementar (cDNA), as amostras foram submetidas a análise de PCR em tempo real para análise da expressão de FOXO3a e MnSOD, e as análises estatísticas foram realizadas através de two-way ANOVA e teste de "t" usando o programa GraphpadPrism 6.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 demonstra a expressão gênica das enzimas FOXO3 e MnSOD em camundongos fêmeas jovens e velhas submetidas a dieta hiperlipídica ou controle. Não foi encontrada relação significativa entre a dieta hiperlipídica e idade, bem como não foi evidenciado interação entre dieta/idade. No entanto em relação ao ganho de peso corporal ao longo de 9 semanas, as fêmeas velhas do grupo que recebeu dieta hiperlipídica atingiram maior peso com relação as jovens do respectivo tratamento ( $P < 0,05$ ) (Figura 2).



**Figura 1.** Expressão das enzimas FOXO3 (A) e MnSOD (B) em ovários de camundongos fêmeas com relação a dieta (controle e hiperlipídica) e a idade (jovens e velhas) no ovário de camundongos fêmeas.



**Figura 2.** Percentual de ganho de peso conforme dieta (controle ou hiperlipídica) e idade (jovens ou velhas) (B). \* $P < 0.05$  (Teste ANOVA de duas vias).

Anteriormente, um estudo com fornecimento de dieta rica em colesterol a camundongos durante 7 meses obteve como resultado a diminuição da expressão gênica da FOXO3a nos camundongos obesos (RELLING et al, 2006). Outro trabalho analisou os níveis de mRNA para FOXO3a em diferentes regiões do cérebro a partir de 6, 16, 60 e 100 semanas em camundongos alimentados com dieta rica em gordura a partir de 6 semanas de vida para indução a obesidade e diabetes, neste estudo a FOXO3a foi significativamente menos expressa no cerebelo em todas as regiões corticais nos ratos com dieta rica em gordura em comparação aos animais do grupo controle (ZEMVA et al, 2012). Sendo assim, é possível que os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a fertilidade se manifestem maneira crônica e não aguda. Ou seja, o período de aproximadamente 2 meses não foi suficiente para alterar a expressão da enzima FOXO3a como nos estudos mais prolongados anteriormente citados.

No presente estudo não foi possível detectar nenhuma alteração da expressão de MnSOD entre os grupos, tanto por efeito da dieta quanto pela idade. Indicando, novamente, que nesta dieta em curto prazo, os níveis de MnSOD não mudam como esperado já que o nível de FOXO3a também foi similar entre os grupos.

Em relação ao ganho de peso significativo dos camundongos fêmeas velhas que receberam dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica comparado as fêmeas jovens do respectivo tratamento, indicando que o ganho de peso é maior em fêmeas mais velhas. É sabido que em mulheres com idade avançada e em período de menopausa há um aumento do índice de massa corporal. Um estudo com 1.506 mulheres observou que a prevalência de sobrepeso foi mais alta na faixa etária de 35 a 49 anos (23,4%) (SICHIERI, 2001). É importante mencionar que estudos anteriores que observaram efeito positivo da dieta na expressão gênica ovariana houve um incremento muito maior de massa corporal do que aquele observado no presente estudo, o que pode justificar a ausência de diferença observada.

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o fator idade e tipo de dieta não foram relevantes para determinar a expressão enzimática das enzimas FOXO3a e MnSOD. Neste estudo foi comprovado que o curto tempo de indução a obesidade não altera a expressão enzimática de ambas as enzimas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MATSUDA, F; INOUE, N; MAEDA, A; Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries **Jornal da Reprodução e Desenvolvimento**; vol. 57, p. 151-158, 2011.

PELOSI, E; OMARI, S; MICHEL, M; DING, J; AMANO, T; FORABOSCO, A; SCHLESSINGER, D; Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice; Laboratory of Genetic, USA; **Nature Communications**, April, n.1843 p.2, 2013

LUKE, B; The effect of increasing obesity on the response to and outcome of assisted reproductive technology: a national study; **J. Society for Assisted Reproductive Technology writing group**; Outubro,v.96, p.820-825, 2011.

WELLS, P.G; Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species; **Toxicology and Applied Pharmacology**; v.207, p.352-366, 2005.

AGARWAL, A; **Fertility and Sterility** ; Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction; v.79, p.829-843, 2003.

DEMET, C; JIAN, L; MnSOD na regulação resposta de potencial estresse oxidativo via influxo de proteína mitocondrial; **Departamento de Radiação Oncológica**, University of California Davis; NCI-Designado Centro Abrangente de Câncer, p.2, Califórnia, 2013.

SICHERI, AP; Menopausa e o Índice de Massa Corporal; **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**; Junho, Rio de Janeiro, vol. 45, n. 3, p. 265-270, 2001.

RELLING, D; ESBERG, G; FANG, C; JOHNSON, W; MURPHY,E; High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and preglutination of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis; **Journal of hypertension**, New York, v.1, p.549-561, 2006.

ZEMVA, J; SCHILBACH, K; STOHR, O; J. A; Central FoxO3a and Foxo6 Expression is Downregulated in Obesity Induced Diabetes but not in Aging; **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**; Center for Endocrinology, Diabetes and Preventive Medicine, University of Cologne, Germany; New York, v.6, p.340-350, 2012.

REEVES, PG; NIELSE, FH; Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet; **AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents**; American Institute of Nutrition, 1993.

FANG, C; Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription; **American journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, Center for Cardiovascular Research and Alternative Medicine, University of Wyoming College of Health Sciences, Laramie, USA, v.1, p.206-215, 2008.