

EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA EM DANOS DE DNA DE OÓCITOS E CÉLULAS DA GRANULOSA EM MACACOS RHESUS

Maria Isabel Schiavon Cousen¹; Tatiana Dandolini Saccon²; Bianka Zanini³; Driele Neske⁴; Rozalyn Anderson⁵; Jorgea Pradiee⁶; Augusto Schneider⁷

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelcousen@gmail.com 1

²Universidade Federal de Pelotas– tatisaccon@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– bianka_zanini@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas- drika_neske@yahoo.com.br

⁵University of wisconsin- rmanderson5@wisc.edu

⁶Universidade Federal de Pelotas- JorgeaPradiee@hotmail.com

⁷Universidade Federal de Pelotas– augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

No ovário humano os folículos primordiais se formam durante a vida intrauterina, após a puberdade, os folículos que até então estavam em um estado de dormência, começam se desenvolver em folículos primários, secundários e antrais (FADDY et al., 2000; ZHANG et al., 2015; ZOU et al., 2009). Durante a vida reprodutiva a maioria das células germinativas femininas sofrem atresia folicular (ZHANG et al., 2015), essa depleção da reserva folicular ovariana marca o começo da menopausa, que em mulheres ocorre em torno dos 50 anos de idade (TE VELDE et al., 1998). O início deste período está associado a um aumento na incidência de doenças cardiovasculares, diabetes, assim como, elevação da pressão arterial, dos níveis séricos das frações de colesterol e redução dos níveis de estradiol (AKINKUOLIE et al., 2015; CASSANDRA R., et al., 2018).

A restrição calórica (RC) sem desnutrição é uma intervenção dietética que vem demonstrando repetidamente, em diversas espécies, efeitos benéficos no tempo de expectativa de vida e atraso de doenças associadas ao envelhecimento (COLMAN et al., 2011). Estudos realizados com macacos rhesus demonstram que houve aumento dos níveis de HDL (COLMAN et al., 2011), redução da gordura visceral e da incidência de doenças cardiovasculares; houve também, preservação da função muscular e elevação da sensibilidade à insulina o que melhorou a tolerância à glicose (COLMAN et al., 2009). Em camundongos, a restrição foi capaz de preservar os folículos primordiais, devido a redução do processo de atresia, indicando que a RC é capaz de prolongar o tempo fértil e atrasar o começo da menopausa, assim como suas consequências (SELESNIEMI et al., 2008).

O período de dormência do folículo ovariano favorece o acúmulo de danos ao DNA (ZHANG et al., 2015), esses danos podem ocorrer devido ligações cruzadas, alterações de base e até mesmo quebra de cadeia dupla de DNA (DSBs - double-strand breaks), resultando em redução da fertilidade (ZHANG et al., 2015). Quando um dano grave de DNA acomete os folículos primordiais ocorre apoptose (ROOS et al., 2006). Em resposta a DBSs, quinases são conhecidas por fosforilar a histona 2Ax (H2Ax) na serina 139 (BAKKENIST et al., 2003). Tal modificação pós-transcricional após o dano, proporciona uma plataforma para outras proteínas de resposta a danos de DNA se ligarem ao DNA, e iniciar o processo de reparo (COLLINS et al., 2016).

Os macacos Rhesus apresentam cerca de 93% de sequência genômica idêntica a humana (COLMAN et al., 2011). O ovário desses animais exibe um padrão de depleção relacionado a idade folicular semelhante ao descrito no ovário

humano (FADDY et al., 2000). Inclusive, as macacas passam por alterações patológicas e hormonais características do climatério feminino quando se aproximam do fim da vida reprodutiva (GILIARDI et al., 1997). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de uma dieta com restrição calórica sobre o envelhecimento ovariano em macacos Rhesus, avaliando especialmente a qualidade oocitária através do acúmulo de danos no DNA.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados ovários de 6 macacos rhesus, 3 ovários do grupo controle e 3 ovários do grupo submetido a restrição calórica (RC). O grupo RC foi submetido a uma restrição de 30% em comparação ao grupo controle. As amostras ovarianas foram cedidas pela Universidade de Winsconsin-Madison, Madison, WI, USA. Os tecidos ovarianos foram fixados em formaldeído 10% e embebidos em Paraplast® e trazidos ao Brasil para a Universidade Federal de Pelotas. Os ovários foram seccionados na espessura de 5 µm com um micrótomo Leica semiautomático®, reservamos 1 corte a cada 10 cortes, e os fixamos em lâminas. Os folículos foram classificados como primordiais e primários de acordo com o descrito por MYERS e seus colaboradores (MYERS et al., 2004). O protocolo de imunofluorescência foi adaptado conforme o descrito por TITUS e seus colaboradores (TITUS et al., 2013). As amostras utilizadas foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em um gradiente de álcool. Essas foram bloqueadas para atividade da enzima peroxidase e o antígeno foi exposto através de um processo de pressão e calor. O anticorpo primário antigama H2AX (ab11174, Abcam®, Cambridge, Reino Unido) com diluição de 1:500 foi encubado overnight. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa Fluor® 488 (ab150089, Abcam®, Cambridge, Reino Unido) para identificar o núcleo foi utilizado o Hoechst 33342 (H1399, Thermo® Fisher Scientific, Waltham, EUA). Para a análise e quantificação de danos presentes no DNA utilizamos o software ImageJ®. As imagens dos folículos primordiais e primários (oócitos e células da granulosa) foram capturadas por um microscópico confocal Olympus® FluoView™ 1000 (Shinjuku, Japão). As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graph Pad Prism7®. O Test-t de Student foi aplicado para a avaliação da imunofluorescência. O nível de significância considerado foi de 5 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontramos uma menor intensidade de fluorescência: nos oócitos de folículos primordiais e primários no grupo das fêmeas submetidas a restrição calórica em comparação as fêmeas do grupo controle ($p=0,0005$ e $p=0,0031$, respectivamente) e nas células da granulosa das fêmeas do grupo restrição calórica, também com relação ao controle ($p=0,0002$ e $p< 0,0001$, respectivamente). Sendo assim, os animais submetidos a RC apresentaram menores níveis de danos de DNA em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais e primários, o que nos sugere que a qualidade dos oócitos e propriamente dos folículos avaliados é superior em relação aos animais de dieta livre, mesmo em idades avançadas. Tal fato decorre, muito possivelmente, devido a maior reparação de danos DSB no DNA.

Corroborando com nossos achados um estudo semelhante indica que o aumento da idade em macacos rhesus (RM) induz maior dano nas células da granulosa de folículos primordiais e primários, analisados pela marcação de H2AX (ZHANG et al., 2015). Como visto anteriormente o DSB em células germinativas é

potencialmente letal, pois acarreta na redução da fertilidade, visto que reduz a qualidade oocitária e embrionárias, podendo ocasionar repetidos abortos ou má formações congênitas no embrião (ADRIAENS et al., 2009). Demonstrando assim, a importância de novos estudos que esclareçam melhor o papel de DSB na vida reprodutiva feminina.

Evidências indicam que o envelhecimento está relacionado ao aumento do estresse oxidativo e desencadeamento do processo inflamatório (NELSON et al., 2004). Esse processo oxidativo inflamatório também pode levar a aumento nos DSB no DNA. Os macrófagos participam da apoptose de folículos saudáveis e atresícos (WU et al., 2004), atuam na liberação de citocinas, fatores de crescimento e processos inflamatórios. Camundongos deficientes em GH apresentam maior extensão do tempo de vida e da atividade reprodutiva, mesmo em idades avançadas (SACCON et al., 2017), similarmente aos RM em RC. De acordo com o exposto por nosso grupo esses roedores tem menor infiltração macrocitária no tecido ovariano (COUSEN et al., 2018). Tais fatos nos sugerem que em MR submetidos a RC haveria um efeito semelhante na preservação da reserva ovariana, devido a possível menor inflamação, e consequente redução do processo apoptótico, abrindo assim, uma janela para novos estudos.

4. CONCLUSÕES

De acordo com nossos dados a restrição calórica possui um efeito protetor, justificando a menor presença de dano no DNA nos oócitos e células da granulosa em folículos primordiais e primários nas fêmeas do grupo RC em relação as do grupo controle. Inclusive, a presença de menos danos ao DNA no grupo RC aponta para duas possibilidades: a maior reparação de danos DSB no DNA e para a redução do estresse oxidativo. Compreendemos a limitação deste estudo por se tratar de uma amostra pequena, assim a realização de novos estudos é fundamental para que em um futuro possa haver uma intervenção que atrase a menopausa e suas consequências em seres humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriaens, I., J. Smits, and P. Jacquet, The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. *Hum Reprod Update*, 2009. 15(3): p. 359-77.

Akinkuolie, A.O., et al., Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. 35(6): p. 1544-50.

Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003. 421(6922): p. 499-506.

Cassandra Roeca, MD, Zain Al-Safi, MD, and Nanette Santoro, MD., The Postmenopausal Women. *Endotext*, August 31, 2018. Online. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279131/>

Collins, J.K. and K.T. Jones, DNA damage responses in mammalian oocytes. *Reproduction*, 2016. 152(1): p. R15-22.

Colman, R.J., et al., Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009. 325(5937): p. 201-4.

Colman, R.J. and R.M. Anderson, Nonhuman primate calorie restriction. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 14(2): p. 229-39.

Cousen, M.I.S., et al., Influência do hormônio de crescimento na preservação da reserva ovariana e presença de macrófagos em ovários de camundongos Ames Dwarf. . XXVII Congresso De Iniciação Científica, 2018.

Faddy, M.J., Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. 163(1-2): p. 43-8.

Gilardi, K.V., et al., Characterization of the onset of menopause in the rhesus macaque. *Biol Reprod*, 1997. 57(2): p. 335-40.

Myers, M., et al., Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 2004. 127(5): p. 569-80.

Nelson, S.M., E.E. Telfer, and R.A. Anderson, The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update*, 2013. 19(1): p. 67-83.

Roos, W.P. and B. Kaina, DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 2006. 12(9): p. 440-50.

Saccon, T.D., et al., Ovarian aging and the activation of the primordial follicle reserve in the long-lived Ames dwarf and the short-lived bGH transgenic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. 455: p. 23-32.

Selesniemi, K., H.J. Lee, and J.L. Tilly, Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell*, 2008. 7(5): p. 622-9.

Te Velde, E.R., et al., Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. 145(1-2): p. 67-73.

Titus, S., et al., Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med*, 2013. 5(172): p. 172ra21.

Wu, R., et al., Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(2): p. 119-33.

Zhang, D., et al., Increased DNA damage and repair deficiency in granulosa cells are associated with ovarian aging in rhesus monkey. *J Assist Reprod Genet*, 2015. 32(7): p. 1069-78.

Zou, K., et al., Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(5): p. 631-6.