

EFEITOS DO TRATAMENTO COM SENOLÍTICOS (QUERCETINA E DASATINIB) SOBRE A RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS EM CAMUNDONGOS

JÉSSICA DAMÉ HENSE¹; JOSÉ ISOLA², DRIELE GARCIA³
JOAO ALVARADO RINCÓN⁴, ARNALDO DINIZ VIEIRA⁵; AUGUSTO
SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jvvisola@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – joaoal13@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – arnaldo.vieira@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Senescência celular é definida como uma resposta celular que limita a divisão de células envelhecidas ou danificadas (MUÑOZ-ESPÍN E SERRANO, 2014). A senescência exerce papéis fisiológicos durante o desenvolvimento normal e é essencial durante a homeostase tecidual (MCHUGH E GIL, 2018). Trata-se de um processo que é projetado principalmente para eliminar células indesejadas, induzindo remodelação do tecido, em resposta ao estresse desencadeado por danos associados ao envelhecimento, como a instabilidade genômica e o desgaste dos telômeros, que são sinais específicos do envelhecimento (MCHUGH E GIL, 2018). No entanto, o acúmulo de células senescentes que ocorre com o passar da idade, resulta em potenciais efeitos prejudiciais à saúde (SUN et al., 2016).

Sendo assim, medicamentos que agem na remoção destas células do organismo possuem potencial de retardar os efeitos negativos do envelhecimento. Dentre estas drogas estão os senolíticos, uma classe relativamente nova de medicamentos que destroem seletivamente as células senescentes. Dentre os senolíticos mais estudados recentemente estão o Dasatinib e a quercetina (D+Q), que formam uma sinergia eficaz na remoção de alguns tipos de células senescentes (ZUH ET AL., 2015). A quercetina é um dos principais bioflavonóides da dieta humana, já o Dasatinib, é um inibidor de múltiplas tirosinas quinases, usado no tratamento oncológico (MONTERO et al., 2011). Um estudo recente identificou que em camundongos, o tratamento com D+Q promoveu a redução seletiva do número de células senescentes e reduziu sintomas característicos do envelhecimento, aumentando a longevidade de forma saudável dos animais (XU et al. 2018).

Nesse contexto, o envelhecimento ovariano refere-se ao esgotamento da reserva folicular ovariana, que é definida logo após o nascimento em camundongas (PETERS, 1969) e durante a vida fetal em mulheres (TE VELDE et al., 1998). Em algum momento do ciclo de crescimento eles são ativados, e a ativação dos folículos primordiais leva ao seu crescimento ocorrendo a ovulação ou atresia (BAKER, 1963). Uma vez ativado o folículo não retorna mais à reserva, ou seja, é irreversível, até o momento que a mesma se esgota ocorrendo a menopausa (BAKER, 1963). Sabe-se que no estilo de vida atual as mulheres têm optando cada vez mais por terem filhos tardiamente, portanto, um atraso na ativação de folículos primordiais bem como a manutenção de sua qualidade seria essencial para prolongar a fertilidade feminina e para reduzir o risco de anormalidades cromossômicas e morte embrionária precoce que estão relacionadas com a aproximação da menopausa (TREFF et al., 2016).

Drogas que possuem efeitos no envelhecimento muitas vezes também apresentam efeitos na reprodução e longevidade reprodutiva (GARCIA et al., 2019). Entender estes efeitos é de suma importância para que eventualmente estas drogas possam vir a ser fornecidas a humanos. Há evidências de que a quercetina na concentração 5 mg/kg aumentou o número de filhotes por ninhada em camundongos jovens (BEAZLEY E NURMINSKAYA, 2016). No entanto, até o momento, não existem evidências sobre o efeito da combinação D+Q na fertilidade, principalmente à nível de desenvolvimento embrionário. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito dos senolíticos D+Q sobre o número total de estruturas recuperadas e os embriões viáveis.

2. METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, número 58357-2018. Foram utilizados 16 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), luz (ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro) e umidade (40-60%). Os animais, tanto do grupo controle quanto do tratamento foram alimentados com ração padrão para roedores e com água *ad libitum*.

Os animais do grupo tratamento (n=8) receberam via gavagem oral os senolíticos quercetina e dasatinib, (5mg/kg e 50mg/kg respectivamente), dissolvidos no vetor (60% phosal, 30% PEG400 e 10% álcool etílico) durante três dias consecutivos, com intervalo de 14 dias entre uma dose e outra. Já os controles (n=8) receberam placebo que constituído por apenas o vetor onde eram dissolvidos D+Q. O tratamento iniciou quando os animais possuíam 30 dias de idade e foi realizado até a semana da eutanásia, quando os animais possuíam 6 meses.

Para sincronização da ovulação dos animais foi feita aplicação intraperitoneal de 5 UI de eCG 5 dias prévios à eutanásia e 5 UI de hCG seguido por acasalamento (1 macho para cada duas fêmeas) 3 dias prévios à eutanásia. Ao final do período de 6 meses, todos os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, seguido de anestesia por via inalatória com isoflurano, eutanásia e exsanguinação cardíaca.

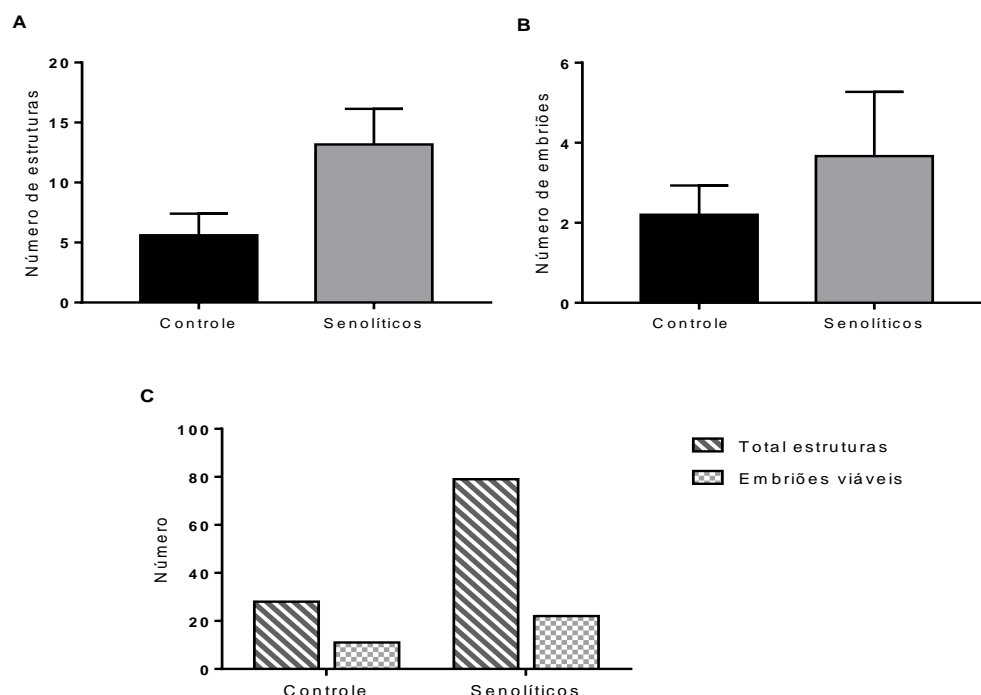
Os ovidutos foram dissecados e lavados com solução salina suplementada com soro fetal bovino (10%) para recuperação das estruturas. Com auxílio de lupa estereoscópica foi realizada a busca, contagem e classificação das estruturas. As estruturas foram classificadas segundo a morfologia, em ovócito não fecundado, embrião degenerado ou embrião viável.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. Foi realizado teste t para comparar o número de estruturas totais e embriões viáveis. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos e valores de $P \leq 0,07$ como tendência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível recuperar estruturas embrionárias de 5/7 (62,5%) das fêmeas do grupo controle e 13/17 (75%) do grupo tratamento. O grupo tratado com os senolíticos apresentou uma tendência a maior número de estruturas totais por fêmea, comparado ao grupo controle ($13,7 \pm 3,0$ vs $5,6 \pm 1,8$ estruturas; $P=0,069$). Quanto à produção de embriões viáveis, não houve diferença entre os grupos ($P=0,45$). O grupo senolíticos produziu em média $3,7 \pm 1,6$ embriões/fêmea e o grupo controle $2,2 \pm 0,7$ embriões/fêmea. Porcentagem de embriões viáveis também não foi encontrada diferença ($p=0,976$), sendo 43,11% de embriões viáveis no grupo controle e 43,68% no grupo tratamento. O número total de estruturas

recuperadas, a porcentagem de embriões viáveis e a relação entre total de estruturas e número de embriões viáveis podem ser visualizadas na Figura 1.



Não se conhecem resultados do efeito do tratamento com o composto Q+D sobre a fertilidade, especialmente à nível embrionário. Um estudo que analisou a adição de quercetina no cultivo *in vitro* de embriões suínos encontrou melhor desenvolvimento em decorrência da suplementação de quercetina, no entanto conforme foram fornecidas doses maiores, a quercetina passou a ser prejudicial aos embriões, devido ao excessivo efeito antioxidante (KANG et al., 2013). Já em camundongos, fêmeas jovens tratadas com quercetina tiveram um aumento no tamanho da ninhada (BEAZLEY E NURMINSKAYA, 2016). O mesmo trabalho também reporta menor número de folículos primordiais nas fêmeas tratadas, sugerindo que tal aumento da fecundidade ocorre devido à maior ativação dos folículos, o que resulta num antecipado esgotamento das reservas ovarianas (BEAZLEY E NURMINSKAYA, 2016). O declínio da fertilidade camundongos ocorre a partir de 12 meses (PETERS, 1969), sendo assim neste momento hipotetizamos que há mais células senescentes ao comparar com fêmeas jovens que possuem menor número destas células e portanto podem ainda não se beneficiar dos tratamentos.

Estudos de com estes compostos senolíticos, já vêm sendo realizados com humanos, em pacientes com fibrose pulmonar idiopática, observando redução de sintomas após 3 semanas de intervenção (JUSTICE et al. 2019). Mais informações são necessárias a respeito de possíveis efeitos do composto Q+D na fisiologia ovariana e fertilidade em fêmeas, para garantir que tais efeitos não ocorram em mulheres. No caso de serem comprovados efeitos benéficos, o composto poderá então ser fornecido como medicamento, visando estes benefícios.

4. CONCLUSÕES

O tratamento com o composto senolítico (quercetina + dasatinib) via gavagem durante 5 meses não tem efeito no número de embriões viáveis produzidos em camundongos jovens.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, T. G. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 158, n. 972, p. 417–33, 1963.

BEAZLEY, k. E.; NURMINSKAYA, M. Effects of dietary quercetin on female fertility in mice: implication of transglutaminase 2. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 7, p. 974- 981, 2016.

GARCIA DN, SACCON TD, PRADIEE J, RINCÓN JAA, ANDRADE KRS, ROVANI MT, MONDADORI RG, CRUZ LAX, BARROS CC, MASTERNAK MM, BARTKE A, MASON JB, SCHNEIDER, A. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience** v.41, n.1, p.14, 2018.

KANG, J.T.; KNOW, k. K.; PARK, S. J.; KIM, S. J.; MOON, J. H.; KOO, O. J.; JANG, G.; LEE, B. C. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2011.

JUSTICE JN ET AL. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first in human, open-label, pilot study. **EBioMedicine** 40: p. 554-563, 2019.

MONTERO, J .C.; SEOANE S, OCÃNA, A. E.; PANDIELLA, A. Inhibition of Src Family Kinases and Receptor Tyrosine Kinases by Dasatinib: Possible Combinations in Solid Tumors. **Clinical Cancer Research** v. 17 p. 5546–52

MUÑOZ-ESPÍN D., AND SERRANO M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 15, p.482–496, 2014.

SUN N., YOULE R.J., AND FINKEL T. The Mitochondrial Basis of Aging. **Mol. Cell.** V.61, p. 654–666, 2016.

TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. J.; FAUSER, B. C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 67–73, 1998.

TREFF, N. R.; KRISHER, R. L.; TAO, X.; GARNSEY, H.; BOHRER, C.; SILVA, E.; LANDIS, J.; TAYLOR, D.; SCOTT, R. T.; WOODRUFF, T. K.; DUNCAN, F. E. Next Generation Sequencing-Based Comprehensive Chromosome Screening in Mouse Polar Bodies, Oocytes, and Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, p. 76, 2016.

ZHU, Y.; TCHKONIA, T.; PIRTSKHALAVA, T.; ET AL. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. **Aging Cell**, v.14, p. 644-58, 2015.