

RESTRIÇÃO ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO EM CAMUNDONGOS, EFEITOS SOBRE ENVELHECIMENTO OVARIANO NA PROLE

BIANKA ZANINI¹; KELVIN RUAN ANDRADE²; JORGEA PRADIEE³; GABRIEL
VEIGA⁴; DRIELE NESKE⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – Bianka_Zanini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – Kelvinruan2@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jpradiee@veterinaria.med.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – Gabrielbveiga@icloud.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – olavoschneider3@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – Augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O processo de depleção da reserva ovariana folicular em mulheres ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que um estímulo ou agressão que ocorra num período suscetível, resulta em consequências em longo prazo para as funções fisiológicas (GLUCKMAN, 2008; GODFREY *et al.*, 2010). Por exemplo, quando os ambientes intrauterino e pós-natal diferem acentuadamente, essas modificações podem se mostrar inadequadas na vida adulta. Os oócitos no ovário fetal em crescimento são vulneráveis a eventos pré-natais, onde o crescimento fetal e o baixo peso ao nascer estão associados ao início puberal precoce, disfunção ovariana, redução da fertilidade e menopausa precoce (GARDNER; OZANNE; SLOBODA *et al.*, 2009). Evidências de que a função e maturação reprodutiva são influenciadas por eventos iniciais da vida e os ambientes nutricionais pré e pós-natais também interagem para influenciar a função reprodutiva da prole, estão surgindo na literatura (GLUCKMAN *et al.*, 2008; SLOBODA, 2007, 2009).

A atividade ovariana é extremamente sensível ao estado nutricional (BERNAL *et al.*, 2010; SLOBODA *et al.*, 2007). Estudos experimentais demonstraram que um declínio na reserva ovariana folicular, mudanças nas taxas de ovulação e idade alterada no início da menarca são vulneráveis a influências precoces (CHAN 2018; GUZMAN *et al.* 2006). Sloboda (2009) mostrou que os déficits e excessos nutricionais durante os períodos intrauterino, lactacional e pós-desmame resultaram na aceleração do início puberal e subsequentes mudanças na função ovariana. Porém, os mecanismos subjacentes a essas mudanças, não estão claros.

Estudos mostram que a redução na disponibilidade de alimento, como a restrição alimentar (RA), tem sido praticada como um método para aumentar a longevidade e a qualidade de vida (SPEAKMAN; MITCHELL, 2011). Durante a vida adulta a RA aumenta a duração do período fértil em camundongos, visto que inibe a transição de folículos primordiais para primários resultando assim no adiamento do esgotamento follicular. Além disso, estudos em modelos animais têm demonstrado que a RA diminui ou previne a progressão de doenças relacionadas ao envelhecimento (LEVENSON; RICH, 2007). Em contrapartida, RA durante a gestação mostrou efeitos prejudiciais, induzindo uma alteração na sensibilidade da leptina, diminuindo a sensação de saciedade, o que contribui para o desenvolvimento da obesidade e com o envelhecimento (GRIVE; FREIMAN, 2015). Portanto o objetivo do presente estudo é investigar o efeito da RA na gestação sobre o envelhecimento ovariano da prole em camundongos.

2. METODOLOGIA

Este obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL, sob o número 8367-2018. As ninhadas foram oriundas de 14 camundongos fêmeas e 7 camundongos machos da linhagem C57BL/6, mantidos sob condições controladas de luz e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos 12 horas claro/12 horas escuro) e com dieta padrão e água *ad libitum*. Acasalados na proporção de 1 macho para duas fêmeas no mesmo intervalo de tempo em gaiolas separadas. Dentro de 10 dias após a confirmação da cópula (plug vaginal e esfregaço contendo espermatozoides) as fêmeas foram divididas em grupo controle ($n=7$) e grupo restrição ($n=7$), para o qual foi fornecida uma dieta de 50% do consumido pelo grupo controle até o momento do parto. Após o parto todas as fêmeas receberam dieta *ad libitum*. Após o desmame (21 dias de vida) as fêmeas da prole foram separadas de acordo com o grupo inicial e receberam dieta normal *ad libitum* até os 3 meses de vida quando foram eutanasiadas e tiveram os ovários coletados em formol.

Para avaliação histológica as amostras de ovários foram retirados do formol tamponado 10%, submetidas à desidratação em álcool, clareados em xilol e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Os ovários já incluídos em Paraplast Plus® foram sequencialmente cortados em micrótomo automático Leica modelo RM2245 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK) a uma espessura de 5 μm , sendo 1 a cada 6 cortes retirados e colocados em lâminas histológicas padrão. Todo o ovário foi cortado e usado. As lâminas, após, secagem na estufa a 55°C , foram coradas com hematoxilina-eosina, montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). Imagens de seções ovarianas foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan), utilizando objetivas de 10 e 40X. Os folículos foram classificados como: primordiais quando cercado por uma camada de célula da granulosa planas; primários quando circundado por uma camada de células cúbicas; secundários quando rodeado por duas ou mais camadas de células granulosas cúbicas e finalmente folículos terciários quando a presença de antro e complexo cumulus oophorus foi detectada (LI *et al.*, 2015). A quantidade de folículos foi multiplicada por seis e a quantidade final de folículos multiplicada duas vezes, mimetizando a quantidade de folículos dos dois ovários.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do teste de t usando o software GraphPad Prism 6, assumindo-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folículos primordiais, em transição e totais do grupo GRA foi menor comparado ao GC ($p<0.0001$, $p<0.0001$ e $p<0.0001$, respectivamente). Folículos primários, secundários e terciários não apresentaram diferença entre os grupos ($p=0.1717$, $p=0.6297$ e $p=0.5064$ respectivamente) (Figura 1).

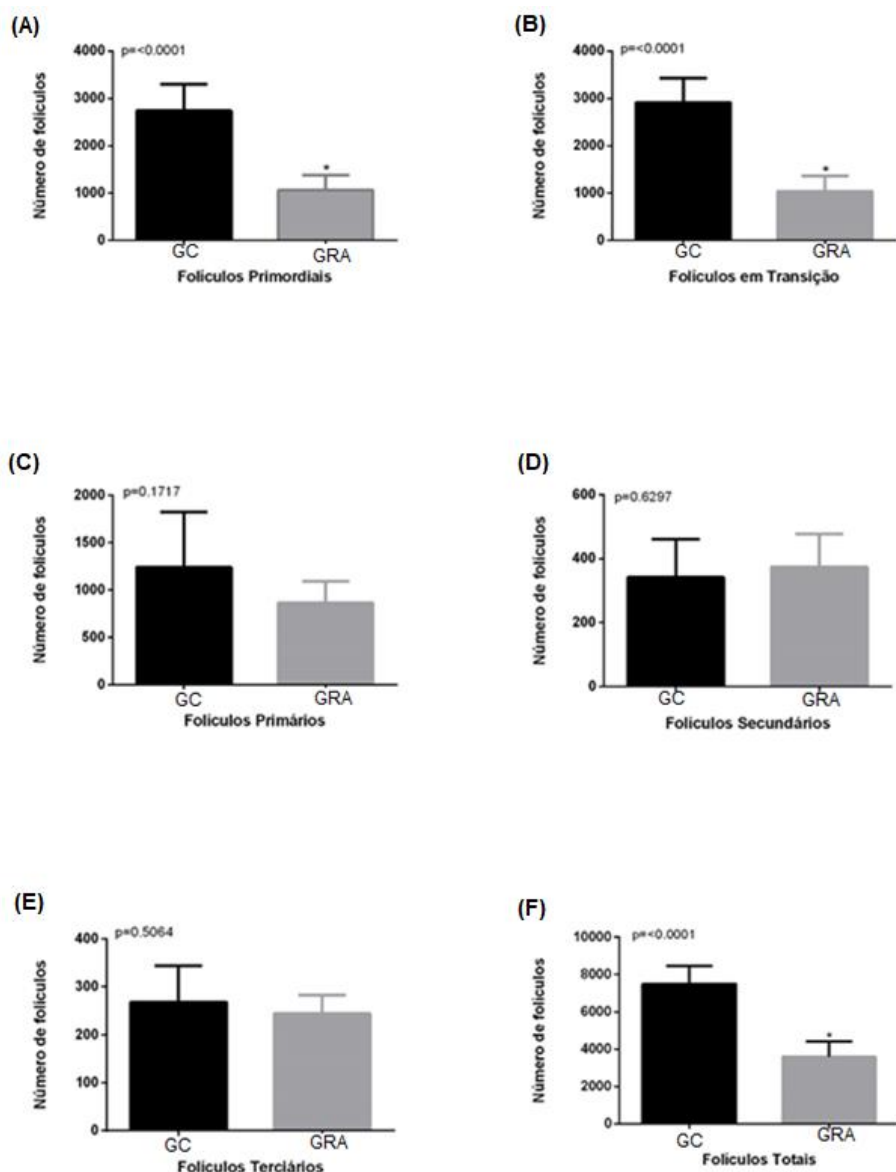


Figura 1. Número de folículos ovarianos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos submetidos a restrição alimentar e grupo controle. *Indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Os animais submetidos a RA apresentaram uma quantidade menor de folículos primordiais, em transição e totais do que animais do GC, o que sugere uma vida reprodutiva mais curta. Foi observado que o número de folículos primordiais na prole de mães submetidas a restrição, representa 38,83% quando relacionado com o grupo controle. Isto é, o grupo controle apresentou 2,6 vezes mais folículos do que o grupo restrição. De maneira similar, Winship et al. (2018) observaram 51% menos folículos primordiais em descendentes de mães submetidas a restrição proteica em relação ao grupo controle.

Estes resultados também se assemelham aos estudos feitos por Bernal et al., (2010) e Chan et al., (2018) onde camundongos prole de RA também tiveram uma reserva de folículos primordiais menor. As mudanças no ambiente fetal através da nutrição, têm o potencial de alterar o desenvolvimento do ovário, com grandes implicações para a fertilidade. Estudo em ovinos (LEA et al. 2006), bovinos (EVAN et al., 2012) e ratos (MEIKLE; WESTBERG, 2001) mostraram que os descendentes de animais submetidos a alguma restrição de nutrientes durante a gestação, tiveram uma série de problemas reprodutivos pós-natais. No presente estudo, a prole mostrou perda folicular significativa aos 3 meses, corroborando

com outras evidências de proles nascidas de mães expostas a algum tipo de restrição (BERNAL *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2018; GUZMÁN *et al.*, 2006). Portanto os resultados apresentados demonstram que esse fenótipo de envelhecimento acelerado começa muito antes do que se pensava anteriormente e com a exposição, diminuiu a reserva ovariana da prole já aos 90 dias de vida.

4. CONCLUSÕES

A prole de camundongos submetidos a restrição alimentar durante a gestação, apresentou reserva ovariana quase três vezes menor que a prole de animais controles. Estes dados mostram a influência nutricional precoce sobre a função reprodutiva, ou seja, a restrição alimentar resulta em perda precoce de folículos em filhotes adultos jovens.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERNAL, Angelica B. et al. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.
2. CHAN, Kaitlyn A. et al. Maternal nutrient restriction impairs young adult offspring ovarian signaling resulting in reproductive dysfunction and follicle loss. **Biology of reproduction**, v.98, n.5, p. 664-682, 2018.
3. GARDNER, D. S.; OZANNE, S. E.; SINCLAIR, K. D. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3419-3427, 2009.
4. GLUCKMAN, Peter D. et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.
5. GODFREY, Keith M.; GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 199-205, 2010.
6. GRIVE, Kathryn J.; FREIMAN, Richard N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. **Development**, v. 142, n. 15, p. 2554-2563, 2015.
7. GUZMAN, C. et al. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **The Journal of physiology**, v. 572, n. 1, p. 97-108, 2006.
8. LEA, Richard G. et al. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 113-124, 2006.
9. LEVENSON, Cathy W.; RICH, Nicholas J. Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. **Nutrition reviews**, v. 65, n. 9, p. 412-415, 2007.
10. SLOBODA, Deborah M. et al. Pre-and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6744, 2009.
11. SLOBODA, Deborah M. et al. Age at menarche: influences of prenatal and postnatal growth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 46-50, 2007.
12. Speakman, J.R.; Mitchell, S.E. Caloric restriction. **Mol Aspects Med**, v.32, n.3, p.159-221, Jun, 2011.