

## RESTRICÇÃO ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO EM CAMUNDNGOS, EFEITOS SOBRE ENVELHECIMENTO OVARIANO NA PROLE

**BIANKA ZANINI<sup>1</sup>; KELVIN RUAN ANDRADE<sup>2</sup>; JORGEA PRADIEE<sup>3</sup>; GABRIEL VEIGA<sup>4</sup>; DRIELE NESKE<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – Bianka\_Zanini@hotmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – Kelvinruan2@hotmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – jpradiee@veterinaria.med.br*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – Gabrielveiga@icloud.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – olavoschneider3@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade 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

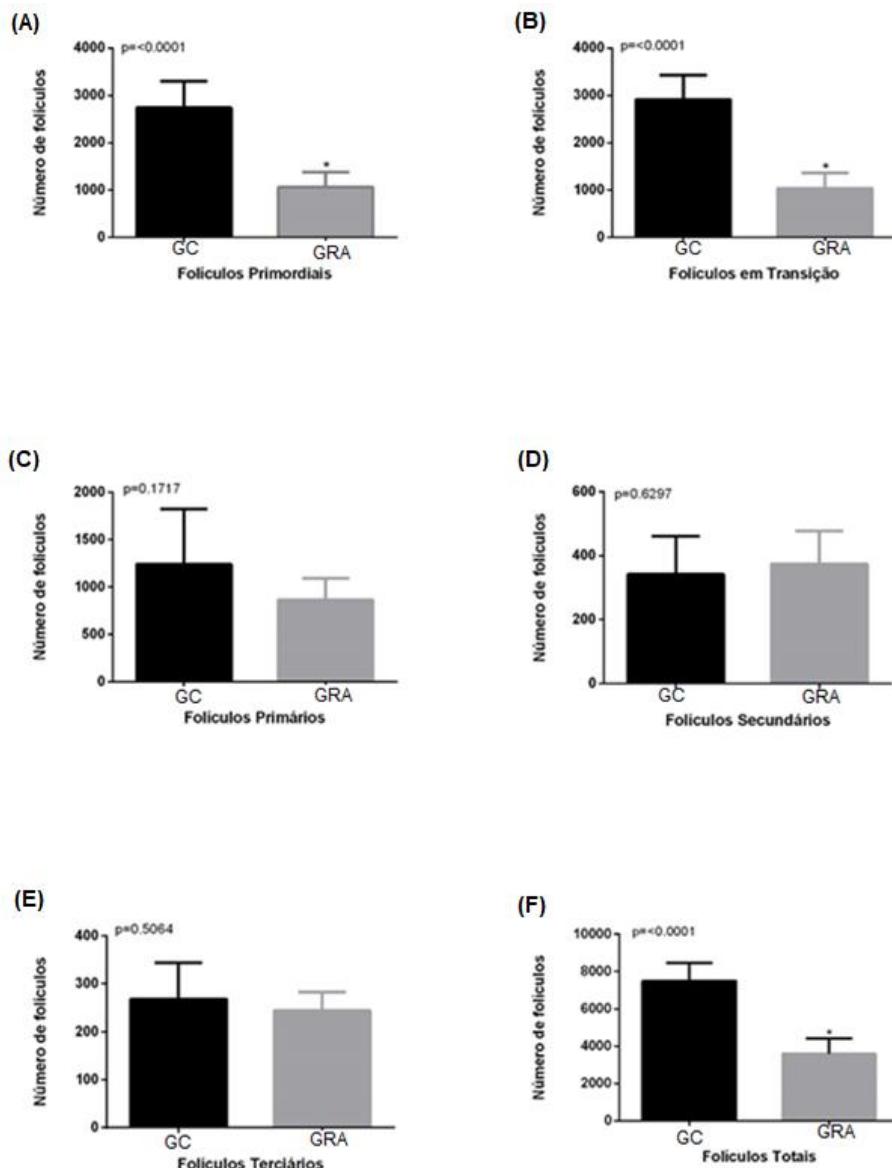
Este obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL, sob o número 8367-2018. As ninhadas foram oriundas de 14 camundongos fêmeas e 7 camundongos machos da linhagem C57BL/6, mantidos sob condições controladas de luz e temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclos 12 horas claro/12 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 xanol 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  $\mu\text{m}$ , 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  $55^\circ\text{C}$ , 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.