

EFEITO DOS SENOLITICOS DASATINIB + QUERCETINA SOBRE A TAXA DE PRENHEZ E NÚMERO DE EMBRIÕES VIÁVEIS EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

DRIELE NESKE GARCIA¹; JOSÉ VICTOR ISOLA²; JOAO ALVEIRO ALVARADO-RINCÓN³; ARNALDO VIEIRA DINIZ⁴; CARLOS CASTILHO DE BARROS⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (UFPel) – drika_neske@yahoo.com.br

²Programa de Pós-graduação em Veterinária (UFPel) – jvvisola@ufpel.edu.br

³Programa de Pós-graduação em Veterinária (UFPel) – joaoal13@hotmail.com

⁴Faculdade de Veterinária (UFPel) – vieira_ad@yahoo.com.br

⁵Faculdade de Nutrição (UFPel) – barroscapel@gmail.com

⁶Faculdade de Nutrição (UFPel) – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A senescência celular é uma resposta da célula a danos no DNA e tem sido intensamente estudada. A senescência envolve muitas mudanças no perfil de expressão gênica e, principalmente, parada do ciclo celular (TCHKONIA et al. 2013). Estudos mostram um aumento no número de células senescentes com o envelhecimento em diferentes tecidos (LOPEZ-OTIN et al. 2013). A maior presença de células senescentes está associada a maior potencial inflamatório, podendo ser a causa de diversas doenças do envelhecimento (LOPEZ-OTIN et al. 2013). Recentemente foi demonstrado que o tratamento de camundongos velhos com senolíticos, drogas que reduzem o número de células senescentes, promove aumento da expectativa de vida e reduz danos do envelhecimento (XU et al. 2018).

Neste sentido, as drogas senolíticas, por serem capazes de remover células senescentes no organismo, são uma alternativa para aumentar a longevidade. Um estudo recente identificou que o tratamento de camundongos com uma combinação de duas drogas, dasatinib e quercetina (D+Q) promoveu redução seletiva do número de células senescentes e redução de sintomas característicos do envelhecimento, estendendo o período de vida saudável (XU et al. 2018). A quercetina é um flavonóide encontrado em frutas e vegetais com potente atividade antioxidante, possui propriedades senolítica (ZHU et al. 2015), anti-inflamatória e antineoplásica. O dasatinib, é um inibidor de múltiplas tirosinas quinases, usado no tratamento de cânceres (MONTERO et al. 2011). O uso do combinado de D+Q foi demonstrado como seguro, tanto *in vitro* como *in vivo*, causando a eliminação seletiva de células senescentes e reduzindo vários efeitos negativos da presença destas células sobre metabolismo da glicose (XU et al. 2018). Além disso, a combinação de D+Q atinge seletivamente uma gama mais ampla de tipos de células senescentes do que qualquer outro agente sozinho (ZHU et al. 2015).

Por outro lado, o envelhecimento ovariano refere-se ao esgotamento da reserva folicular ovariana, que é definida durante a vida fetal em mulheres. Em algum momento do ciclo de crescimento dos folículos primordiais ocorre sua ativação, o que leva ao seu crescimento e culmina em ovulação ou atresia (BAKER. 1963). Uma vez ativado, o folículo não retorna mais à reserva, ou seja, é um processo irreversível, isso ocorre até o momento em que a reserva se esgota na menopausa (BAKER. 1963). Sabe-se que no estilo de vida atual, as mulheres têm optado 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 precoces associada à aproximação da menopausa (TREFF et al. 2016).

Tratamentos que possuem efeitos no atraso do envelhecimento também apresentam efeitos na reprodução e longevidade reprodutiva, como observamos em estudo anterior realizado por nosso grupo (GARCIA et al. 2019). Entender estes efeitos é de suma importância para que eventualmente estas drogas possam vir a ser fornecidas a humanos. No entanto, até o momento, não existem evidências sobre o efeito da combinação D+Q na fertilidade, principalmente em nível de desenvolvimento embrionário. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito dos senolíticos D+Q sobre a taxa de prenhez, número total de estruturas recuperadas e embriões viáveis em camundongos.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas sob o número 58357-2018. Foram utilizados 48 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade de 30 dias que foram mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade (22 ± 2 °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40-60%). Os animais receberam água e dieta padrão *ad libitum* e foram divididos em 2 grupos: grupo controle (n=24) e grupo tratamento (n=24). O grupo tratamento recebeu dasatinib (5 mg/kg) e quercetina (50 mg/kg) diluídos em vetor composto por 60% Phosal, 30% PEG 400 e 10% álcool etílico absoluto via gavagem oral três dias consecutivos a cada duas semanas (XU et al. 2018). O grupo controle recebeu placebo, constituído por apenas o vetor em que foram diluídos os senolíticos. O tratamento iniciou uma semana após o desmame e as fêmeas foram tratadas por 12 meses.

Aos 3, 6, 9 e 12 meses as fêmeas foram acasaladas com machos de 3 meses de idade não tratados e avaliou-se a taxa de prenhez. Para realizar a avaliação dos embriões viáveis, aos 6 e 12 meses foi realizada sincronização da ovulação e posteriormente eutanásia das fêmeas. Para a 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. Após a eutanásia, 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. Utilizou-se o teste de Qui-quadrado para a taxa de prenhez e o ANOVA two way para número total de estruturas recuperadas e embriões viáveis. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse foi o primeiro estudo que avaliou o tratamento com D+Q sobre a fertilidade em fêmeas tratadas em longo prazo. Nós encontramos que o tratamento com os senolíticos D+Q não afetou a taxa de prenhez ao longo da vida das fêmeas ($P > 0,05$; Figura 1). Somente foi observado um declínio da taxa de prenhez ao longo do tempo em ambos os grupos. Isto era esperado, e está

associado à idade, entretanto, esperávamos que o tratamento com os senolíticos pudesse diminuir este declínio, porém isto não aconteceu.

Não houve diferença no total de estruturas recuperadas, embriões degenerados e embriões viáveis ($P>0,05$) entre os grupos, aos 6 e 12 meses de idade (Tabela 1). Podemos observar que os embriões viáveis também diminuíram ao longo do tempo, concordando com o encontrado na taxa de prenhez, associado à idade.

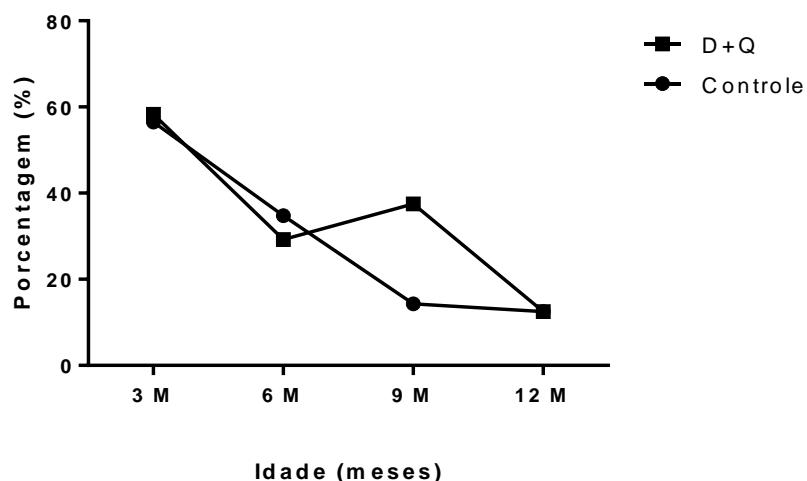


Figura 1. Taxa de prenhez de camundongos fêmeas tratadas com dasatinib e quercetina (D+Q) ou placebo (Controle) ao longo de 12 meses de experimento.

Tabela 1. Média ± erro padrão dos parâmetros: total de estruturas, porcentagem de embriões degenerados e embriões viáveis dos grupos controle e D+Q aos 6 e 12 meses. Valor de $P<0,05$ foi considerado significativo.

Parâmetros	6 meses		12 meses		Tratamento	Tempo	Interação	P
	Controle	D+Q	Controle	D+Q				
Total de estruturas	3,5 ± 1,5	8,6 ± 3,0	1,2 ± 0,6	1,5 ± 0,7	0,1285	0,0108	0,1710	
Porcentagem degenerados	17,2 ± 8,6	35,5 ± 13,5	22,2 ± 14,7	37,5 ± 18,3	0,2497	0,8086	0,9167	
Embriões viáveis	2,4 ± 1,0	4,7 ± 2,0	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,3	0,3825	0,0149	0,2656	

Ainda não se tem estudos avaliando o efeito do tratamento em longo prazo com D+Q sobre a fertilidade e número de embriões. Através do presente estudo foi possível observar alguns aspectos que podem ser melhorados em estudos posteriores como o inicio precoce do tratamento. Como as fêmeas iniciaram o tratamento jovens (30 dias) e sabendo que as células senescentes também desempenham funções importantes para organismo quando em quantidades controladas, talvez a eliminação destas células em fêmeas tão jovens possa não ser tão vantajosa quanto o uso em fêmeas mais velhas. Outro aspecto importante é em relação a frequência das gavagens. Como os estudos utilizando D+Q para aumentar a longevidade são feitos em grande parte com machos e ainda não

havia sido testado no efeito com fêmeas prenhas podemos questionar se o estresse causado pelas gavagens pode influenciar nos resultados. Visto que os senolíticos D+Q estão sendo amplamente estudados, inclusive em humanos (JUSTICE et al. 2019) se torna importante que mais estudos com frequências de tratamento e em idades diferentes sejam realizados a fim de esclarecer os efeitos dos senolíticos na fertilidade de fêmeas.

4. CONCLUSÕES

O tratamento com D+Q durante 6 e 12 meses não afeta a taxa de prenhez e o número de embriões viáveis em camundongos. Entretanto, torna-se necessário a realização de mais estudos com frequências e idades diferentes de tratamento com D+Q para elucidar os possíveis efeitos destes senolíticos na fertilidade da fêmea.

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.
- 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.
- JUSTICE, J.N. et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. **EBioMedicine**, Londres, v. 40, n. 1, p. 554-563, 2019.
- LOPEZ-OTIN, C; BLASCO, M.A; PARTRIDGE, L; SERRANO, M; KROEMER G. The hallmarks of aging. **Cell**, Cambrigde, v. 153, n. 6, p.1194-1217, 2013.
- MONTERO, J.C; SEOANE, S; OCĀNA, A; PANDIELLA, A. Inhibition of Src Family Kinases and Receptor Tyrosine Kinases by Dasatinib: Possible Combinations in Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, Filadélfia, v. 17, n. 17, p. 5546–52, 2011.
- SOTO-GAMEZ, A; DEMARIA, M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. **Drug Discovery Today**, Canada, v. 22, n. 5, p. 786-795, 2017.
- TCHKONIA, T; ZHU, Y; VAN DEURSEN, J; CAMPISI, J; KIRKLAND, J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. **The Journal of clinical investigation**, Michigan, v. 123, n. 3, p.966-972, 2013..
- 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.
- XU, M. et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. **Nature Medicine**, New York, v. 24, n. 8, p. 1246-1256, 2018.
- ZHU, Y; TCHKONIA, T; PIRTSKHALAVA, T. et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. **Aging Cell**, Londres, v. 14, n. 4, p. 644-58, 2015.