

AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE OBESOS

HENSE, Jéssica Damé¹; ISOLA, José V. V.²; RINCON, J³; ZANINI, Bianka⁴; BARROS, Carlos Castilho⁵; SCHNEIDER, Augusto⁶.

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

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

³Universidade Federal de Pelotas – joaoal13@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barroscscpel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é um importante problema de saúde pública, pois predispõe o indivíduo a uma série de doenças, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (FALOIA et al., 2012). O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade está associado a muitas doenças crônicas, incluindo a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, hipertensão e desordens reprodutivas (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006). O camundongo modelo *ob/ob*, deficiente para leptina possui uma mutação do gene *ob* (DREL et al., 2006). Animais com esta mutação apresentam obesidade hereditária severa, diabetes mellitus com resistência à insulina, letargia, infertilidade (COLEMAN, 1978), e taxas de sobrevivência significativamente menores quando comparados aos camundongos magros (REN et al., 2010). Por possuírem essas características, os camundongos *ob/ob* são uma importante ferramenta para estudos de obesidade e comorbidades associadas.

Esse modelo experimental apresenta anovulação, menor peso gonadal em machos e fêmeas, associado principalmente à falta de ação da leptina hipotalâmica, diminuindo a liberação de gonadotrofinas e prejudicando a ovulação (BARASH et al., 1996). Embora esses animais tenham a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal prejudicada, tornando-os inférteis, a fertilidade destes animais é restaurada quando suplementados com leptina exógena (BARASH et al., 1996), ou quando é realizado transplante de tecido adiposo (BARROS et al., 2009). No entanto, a administração de gonadotrofina isoladamente não é capaz de recuperar completamente a foliculogênese e a ovulação final dos animais *ob/ob*, sugerindo que os níveis basais de leptina são necessários para a ovulação (OLATINWO et al., 2005).

Entretanto, a caracterização da reserva ovariana desse modelo experimental é escassa na literatura. Sabe-se que a obesidade prejudica a função do ovário, tanto que os camundongos *ob/ob* possuem um número reduzido de corpos lúteos, além de uma maior atresia folicular e apoptose (CABELLO et al., 2015), e folículos pré-antrais e antrais com oócitos deformados (SERKE et al., 2012). Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar a reserva ovariana em camundongos *ob/ob*, por meio de contagem histológica dos folículos.

2- METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, número 3715-2014. Doze camundongos fêmeas, seis da linhagem C57BL/6 (WT) e seis *ob/ob* foram mantidos a $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, do desmame (21 dias), até os 12 meses de idade. Os camundongos tiveram acesso *ad libitum* a ração padrão para roedores e água durante todo o experimento. Aos 12 meses, os animais foram anestesiados com isoflurano e

sacrificados por deslocamento cervical antes da dissecção. Um ovário de cada animal foi coletado e colocado em formaldeído tamponado a 10% para análises histológicas. Os folículos foram classificados como primordiais (quando cercados por uma única camada de células da granulosa achatada), primários (quando cercados por uma única camada de células da granulosa cuboides), em transição (quando cercados por células achatadas e cuboides), secundários (quando cercados por mais de uma camada de células da granulosa cuboides e sem antro visível), e terciário (quando tinha um espaço antral claramente definido e uma camada de células da cumulus granulosa ao redor do ócito). Também foi calculada a porcentagem de folículos classificados em cada fase do desenvolvimento.

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6, utilizando o teste t. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 12 meses de idade, camundongos *ob/ob* apresentaram reserva folicular ovariana semelhante aos camundongos normais da mesma idade (Figura 1). Nenhuma diferença foi encontrada para o número de folículos primordiais, de transição, primários, secundários, terciários e totais, entre os camundongos *ob/ob* e WT.

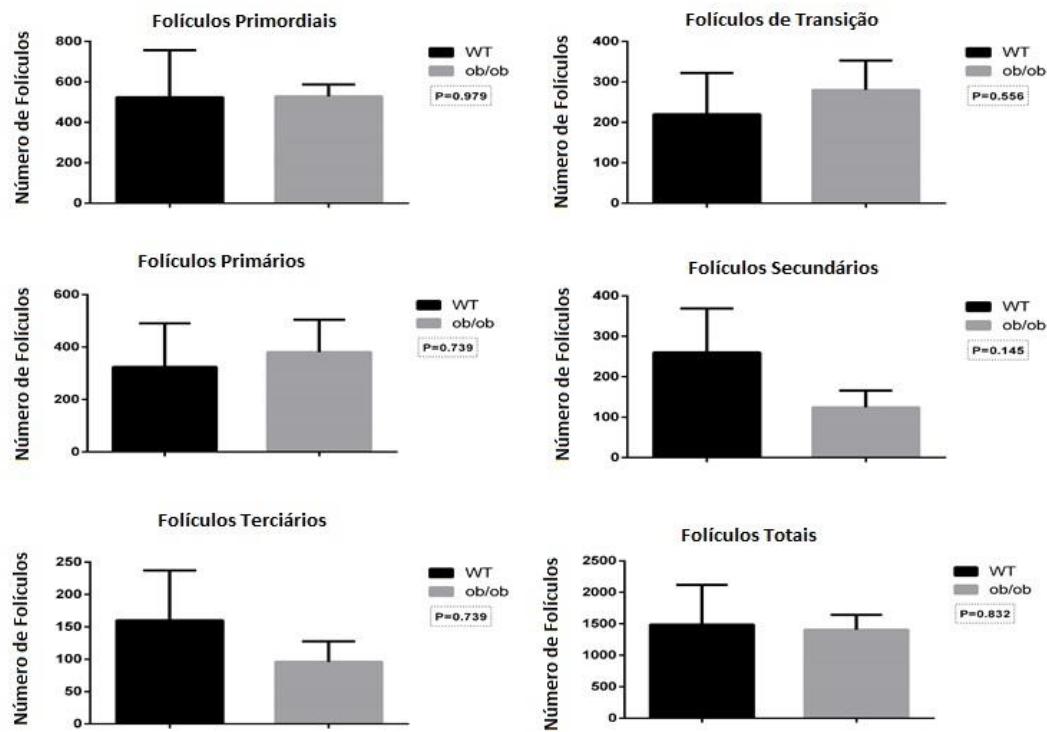


Figura 1 - Número de folículos primordiais, de transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos do tipo selvagem (WT) e deficientes em leptina (*ob/ob*).

A porcentagem de folículos ovarianos totais, classificados como folículos primordiais, de transição, primários, secundários e terciários de camundongos do tipo selvagem (WT) e deficientes em leptina (*ob/ob*) são mostrados na Figura 2. A porcentagem de folículos secundários foi menor ($p=0,036$) em camundongos *ob/ob* ($8,35 \pm 2,11$) em comparação aos camundongos WT ($11,51 \pm 2,05$),

enquanto que nenhuma diferença foi encontrada nos folículos primordiais ($p = 0,586$), em transição ($p = 0,212$), primários ($p = 0,429$) e terciários ($p = 0,429$).

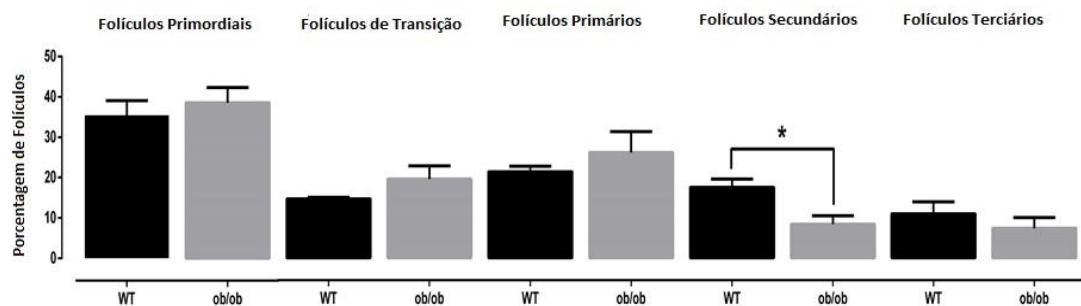


Figura 2 - Porcentagem de folículos ovarianos primordiais, de transição, primários, secundários e terciários em camundongos do tipo selvagem (WT) e deficientes em leptina (ob / ob).

Nossos resultados não corroboram com os encontrados na literatura para camundongos *ob/ob*, uma vez que foram encontradas diferenças na reserva ovariana de fêmeas *ob/ob* mais jovens, em comparação com as fêmeas WT de idades iguais. Em camundongos com três meses de idade, foi encontrado um número menor de folículos pré-antrais, mas não foi encontrada diferença no número de folículos antrais em fêmeas *ob/ob* em comparação com o WT (SERKE, 2012), embora este estudo não tenha definido se a diferença estava no número de folículos primordiais, primários ou secundários. Em fêmeas *ob/ob* ainda mais jovens (sete semanas), um estudo encontrou um número menor de folículos primordiais e totais em comparação com fêmeas WT (HAMM, 2004). Em ambos os estudos, os autores usaram uma metodologia de contagem diferente. Portanto, as divergências podem ser devidas às diferentes metodologias aplicadas. Outra explicação poderia ser que a falta de leptina tem alguns efeitos no número de folículos primordiais, mas, como esses efeitos são leves, a diferença entre os camundongos *ob/ob* e WT desaparece, uma vez que o tamanho da reserva diminui nos dois genótipos com a idade avançada.

Estudos vêm demonstrando que a restrição calórica (RC) sem desnutrição diminui a ativação do folículo primordial, bem como aumenta a expectativa de vida e a insulina por meio de vias de detecção de nutrientes que envolvem a regulação negativa de fatores como o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (GARCIA et al., 2019; SACCON et al., 2017). Enquanto a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica proporciona efeito oposto pelas mesmas vias (WANG et al., 2014). A falta de leptina aumenta o consumo de alimentos, uma vez que a leptina é responsável por inibir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) (BLUM WF., 1997), responsável pela estimulação da ingestão de alimentos. Com base nisso, efeitos semelhantes à dieta rica em gordura e efeitos opostos à RC, como maior ativação dos folículos primordiais, podem ser esperados nos ovários de camundongos *ob/ob*. No entanto, o número de folículos primordiais que encontramos para camundongos *ob/ob* e WT foi compatível com o relatado anteriormente para camundongos WT em idades semelhantes, usando a mesma metodologia (SACCON et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2014).

Não é de surpreender que tenhamos encontrado uma porcentagem menor de folículos secundários em camundongos *ob/ob*, o que provavelmente se deve à maior taxa de atresia nos folículos em estádios mais avançados encontrados nesses camundongos (HAMM, 2004; SERKE, 2012).

4- CONCLUSÕES

Camundongos *ob/ob* de 12 meses de idade possuem a mesma reserva de folículos primordiais do que camundongos selvagens, sugerindo que, diferentemente da taxa de atresia, a taxa de ativação dos folículos primordiais não é afetada pela falta de leptina.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H. et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, 137, n. 7, p. 3144-3147, Jul 1996.
- BARROS, C. C.; ALMEIDA, S. S.; MORI, M. A.; VALERO, V. B. et al. Efficient method for obtaining Lep(*ob*)/Lep(*ob*)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **Int J Obes (Lond)**, 33, n. 8, p. 938-944, Aug 2009.
- BLUM WF. Leptin: the voice of the adipose tissue. **Hormone research**. 1997;48 Suppl 4:2-8.
- CABELLO, E.; GARRIDO, P.; MORAN, J.; GONZALEZ DEL REY, C. et al. Effects of resveratrol on ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in *ob/ob* mice. **Fertil Steril**, 103, n. 2, p. 570-579 e571, Feb 2015.
- COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, 14, n. 3, p. 141-148, Mar 1978.
- DESPRÉS, J.P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature** V. 444, n.14, Dec 2006
- DREL, V. R.; MASHTALIR, N.; ILNYTSKA, O.; SHIN, J. et al. The leptin-deficient (*ob/ob*) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, 55, n. 12, p. 3335-3343, Dec 2006.
- Garcia DN, Saccon TD, Pradiee J, Rincon JAA, Andrade KRS, Rovani MT, et al. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **GeroScience**. 2019;41(4):395-408.
- HAMM ML, BHAT GK, THOMPSON WE, MANN DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. **Biology of reproduction**. 2004;71(1):66-72.
- OLATINWO MO, BHAT GK, STAH CD, MANN DR. Impact of gonadotropin administration on folliculogenesis in prepubertal *ob/ob* mice. **Molecular and cellular endocrinology**. 2005;245(1-2):121-7.
- SACCON TD, MOREIRA F, CRUZ LA, MONDADORI RG, FANG Y, BARROS CC, 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. **Molecular and cellular endocrinology**. 2017;455:23-32.
- SERKE, H.; NOWICKI, M.; KOSACKA, J.; SCHRODER, T. et al. Leptin-deficient (*ob/ob*) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme. **Int J Obes (Lond)**, 36, n. 8, p. 1047-1053, Aug 2012.
- WANG N, LUO LL, XU JJ, XU MY, ZHANG XM, ZHOU XL, ET AL. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism: clinical and experimental**. 2014;63(1):94-103.