

## SENESCÊNCIA CELULAR NO OVÁRIO DE CAMUNDONGOS OBESOS

HENSE, Jéssica Damé<sup>1</sup>; ISOLA, José<sup>2</sup>; GARCIA, Driele Neske<sup>3</sup>; ZANINI, Bianka Machado<sup>4</sup>; SCHNEIDER, Augusto<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jeeh.hense@hotmail.com](mailto:jeeh.hense@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jvvisola@ufpel.edu.br](mailto:jvvisola@ufpel.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [drika\\_neske@yahoo.com.br](mailto:drika_neske@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [bianka\\_zanini@hotmail.com](mailto:bianka_zanini@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O camundongo modelo *ob/ob* deficiente em leptina tem uma mutação do gene *ob* (DREL; MASHTALIR; ILNYTSKA; SHIN *et al.*, 2006), são obesos e estéreis, principalmente devido aos baixos níveis de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (COLEMAN, 1978), e constituem uma importante ferramenta para estudos de obesidade e comorbidades associadas, pois apresentam obesidade hereditária severa, diabetes mellitus com resistência à insulina, letargia, infertilidade e outras comorbidades associadas (COLEMAN, 1978). Também apresentam taxas de sobrevivência significativamente menores quando comparados aos camundongos selvagens (REN; DONG; CAI; ZHAO *et al.*, 2010).

Células senescentes estão presentes em inúmeros tecidos do organismo, em maior quantidade durante o envelhecimento e obesidade (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013) (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER *et al.*, 2012). Essas células possuem como características a secreção de fatores pró-inflamatórios que atraem macrófagos (TCHKONIA; ZHU; VAN DEURSEN; CAMPISI *et al.*, 2013), conhecido como fenótipo secretor associado a senescência (SASP). Estes fatores contribuem para aparecimento de morbididades relacionadas à idade e obesidade (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Este acúmulo de células senescentes acaba por ser prejudicial ao organismo e associado ao declínio das funções corporais durante o envelhecimento. Sabe-se que o acúmulo de células senescentes aumenta os processos pró-inflamatórios na obesidade (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Apesar disso, não há dados se essas células estão presentes nos órgãos reprodutivos. Sabe-se que tratamento com drogas senolíticas quercetina e dasatinib (D+Q) tem a capacidade de reduzir de forma seletiva células senescentes, aumentando a longevidade e reduzindo os sintomas característicos do envelhecimento (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND *et al.*, 2018). Quando as células senescentes são removidas através do

tratamento com D+Q, há uma diminuição na inflamação e um aumento na sensibilidade à insulina, aumentando a longevidade de animais normais (XU *et al.* 2018).

Desta maneira, presente trabalho tem por objetivo avaliar a presença de células senescentes no ovário de animais obesos e magros aos 12 meses, e animais *ob/ob* tratados com senolíticos aos 6 meses de idade.

## 2. METODOLOGIA

Os dois experimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação animal, experimento 1, número 3715-2014, experimento 2, número 24915-2020. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, em estantes ventiladas, com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2$  °C), umidade (40-70%) e fotoperíodo (12h claro/escuro). Camundongos fêmeas foram divididas em dois experimentos. No experimento 1 foram dois grupos formados por fêmeas *ob/ob* (n=5) e fêmeas WT (n=5), que foram eutanasiadas aos 12 meses, e coletado tecido ovariano desses animais. O experimento 2 foi composto por dois grupos (n=6), ambos de fêmeas *ob/ob* que foram divididas em dois grupos e tratadas com senolíticos durante 4 meses, iniciando aos 2 meses de idade. O grupo tratamento recebeu senolíticos dasatinib e quercetina (5mg/kg e 50mg/kg respectivamente) (Xu *et al.* 2018), 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 receberam placebo, constituído por apenas o vetor onde foram dissolvidos o D+Q (XU *et al.*, 2018). Aos seis meses de idade os animais do experimento 2 foram eutanasiados para coleta de tecido ovariano.

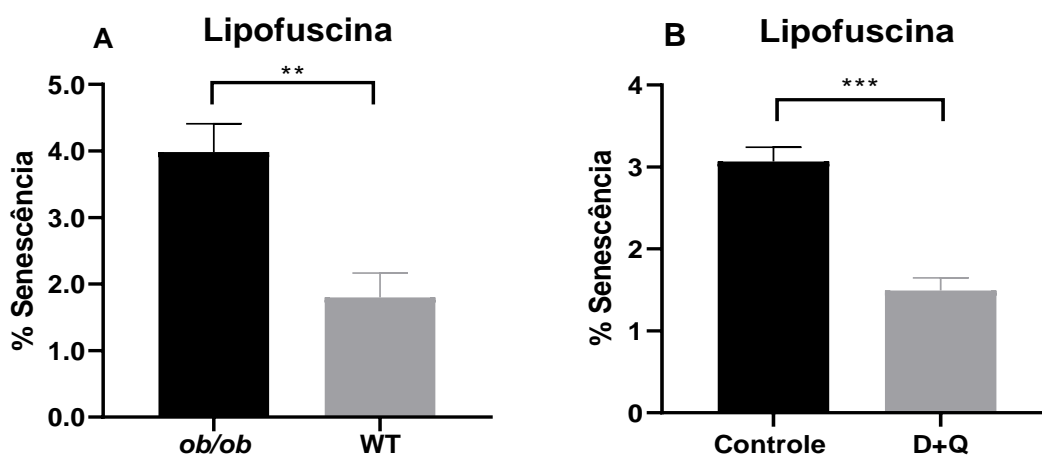
Foi realizado o teste de coloração de lipofuscina com o corante sudan black em lâminas histológicas com cortes de ovário. O protocolo utilizado foi ajustado de (EVANGELOU *et al.*, 2017).

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

A porcentagem de células senescentes no ovário de fêmeas *ob/ob* foi maior quando comparada com grupo de fêmeas magras aos 12 meses de idade ( $P = 0,0059$ ; Figura 1A). Esse foi o primeiro estudo que avaliou senescência no ovário de fêmeas obesas com marcação de lipofuscina. Sabe-se que as células senescentes estão presentes em diversos tecidos (HAYFLIK, 1961; HOHN *et al.*, 2017; TCHKONIA *et al.*,

2010), no entanto, há uma escassez de dados na literatura sobre a presença de células senescentes em órgãos reprodutores feminino, principalmente com o avançar da idade associado a obesidade. Estudos demonstraram que há uma sobrecarga lipídica no ovário de camundongos obesos (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER et al., 2012), e está claro que há uma abundância de células senescentes do tecido adiposo que aumenta não apenas com o envelhecimento, mas também com a obesidade (PALMER et al. 2019). Dessa maneira, nosso estudo demonstrou que no ovário de fêmeas obesas ocorre o mesmo que já identificado em outros tecidos de animais obesos, há uma maior carga de células senescentes em relação a fêmeas magras da mesma idade, confirmando assim a nossa hipótese.



**Figura 1.** Porcentagem da área ovariana com marcação de lipofuscina (em % de pixels) feita com corante sudan black em fêmeas obesas (*ob/ob*) e magras (WT) aos 12 meses de idade (Fig. 1A), e em fêmeas *ob/ob* controle e tratamento (D+Q) aos 6 meses de idade (Fig. 1B). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

O tratamento com senolíticos (D+Q) diminuiu a porcentagem de células senescentes no ovário de fêmeas *ob/ob* tratadas com D+Q aos 6 meses de idade, quando comparada com grupo controle ( $P = 0,0002$ ; Figura 1B). Esse foi o primeiro estudo que avaliou senescência no ovário de fêmeas obesas tratadas com senolíticos (D+Q) com marcador de lipofuscina. Como confirmado no experimento anterior com os animais *ob/ob* aos 12 meses, há uma maior sobrecarga de células senescentes no ovário desses animais, independentemente da idade essa alta carga de senescência está presente no ovário de fêmeas obesas. Estudo não publicado e realizado pelo nosso grupo, mostrou que fêmeas normais submetidas ao tratamento com senolíticos não apresentam grandes diferenças na carga de senescência quando comparado com grupo controle. Dessa maneira, nesse experimento confirmamos a hipótese de que o

tratamento com D+Q é eficaz na eliminação de células senescentes no ovário de fêmeas obesas como já demonstrado em outros tecidos.

#### 4. CONCLUSÕES

Camundongos obesos independente da idade possuem uma alta carga de células senescentes no tecido ovariano, Além disso, o tratamento com senolíticos (D+Q) reduziu a carga de células senescentes já aos 6 meses de idade, sugerindo efetividade do tratamento em animais jovens.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, 14, n. 3, p. 141-148, Mar 1978.

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.

EVANGELOU, K. *et al.* Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. **Aging Cell**, 2017.

LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, 153, n. 6, p. 1194-1217, Jun 6 2013.

PALMER, A. K.; GUSTAFSON, B.; KIRKLAND, J. L.; SMITH, U. Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. **Diabetologia**, 62, n. 10, p. 1835-1841, Oct 2019.

PALMER, A. K.; XU, M.; ZHU, Y.; PIRTSKHALAVA, T. *et al.* Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. **Aging Cell**, 18, n. 3, p. e12950, Jun 2019.

REN, J.; DONG, F.; CAI, G. J.; ZHAO, P. *et al.* Interaction between age and obesity on cardiomyocyte contractile function: role of leptin and stress signaling. **PLoS One**, 5, n. 4, p. e10085, Apr 9 2010.

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.

TCHKONIA, T.; ZHU, Y.; VAN DEURSEN, J.; CAMPISI, J. *et al.* Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. **J Clin Invest**, 123, n. 3, p. 966-972, Mar 2013.

XU, M.; PIRTSKHALAVA, T.; FARR, J. N.; WEIGAND, B. M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. **Nat Med**, 24, n. 8, p. 1246-1256, Aug 2018.