

ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA PÓS-MENOPAUSA QUIMICAMENTE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS

BIANKA MACHADO ZANINI¹; BIANCA MACHADO DE ÁVILA²; DRIELE NESKE GARCIA³; JÉSSICA DAMÉ HENSE⁴; GABRIEL BARRETO VEIGA⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bianca_avila@ymail.com

³Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gabrielbveiga@icloud.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augusto.schneider@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Nas fêmeas além do envelhecimento natural do organismo, o envelhecimento dos órgãos reprodutivos também é uma questão biológica importante. Em geral as fêmeas tem uma longevidade maior que machos (AUSTAD; FISCHER, 2016). Assim, fica claro que existem alguns efeitos sexualmente dimórficos que não estão claramente compreendidos. Como por exemplo, diferenças nos esteroides sexuais podem refletir na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e respostas diferentes ao estresse oxidativo quando comparamos camundongos machos com fêmeas (SYMONDS, 2007). Associado ao envelhecimento, ocorre um declínio da atividade ovariana que leva à infertilidade das fêmeas com o avançar da idade.

Os estrogênios, hormônios esteroides sexuais femininos, têm amplos efeitos sistêmicos em diferentes tipos de células por meio de seus receptores. Como se sabe, os níveis de estrogênios sistêmicos, especialmente 17 β -estradiol (E₂), reduzem drasticamente no momento da menopausa em mulheres (O'CONNOR; FERRELL; BRINDLE; TRUMBLE *et al.*, 2009). Embora o estrogênio esteja clinicamente disponível há mais de seis décadas, os riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal com estrogênio ainda são motivo de estudos. O estradiol é um hormônio utilizado como contraceptivo oral e hormônio de reposição. As terapias hormonais contendo compostos de estrogênio são o único tratamento aprovado que alivia o amplo espectro de sintomas associados à menopausa (SOCIETY, 2017).

Dado que a grande maioria das mulheres passa por uma transição natural para a menopausa, restando o tecido ovariano e não sofre uma ovariectomia, o composto 4-Diepóxido de vinilciclohexeno (VCD) pode ser usado para induzir um modelo de menopausa mais fiel, melhorando o entendimento de como as terapias interagem com um sistema reprodutivo intacto, mas com depleção de folículos. A exposição de animais ao composto leva à falha gradual da função ovariana, resultando em animais depletados de folículos, mas que retêm o tecido ovariano residual, assim como ocorre em mulheres na menopausa (KAPPELER; HOYER, 2012; LIU; WANG; XING; FAN, 2015).

Nesse sentido é essencial entender o papel do ovário no contexto geral da longevidade. O objetivo deste trabalho visa entender os efeitos metabólicos em fêmeas em menopausa induzida por VCD e suplementadas ou não com E₂.

2. METODOLOGIA

O experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sendo aprovado sob o número 0902860. Os animais, todas fêmeas da linhagem C57BL/6, foram divididos

em três grupos e mantidos sob condições controladas de temperatura e luz ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos 12 horas claro/12 horas escuro). Foram utilizados 31 camundongos de 60 dias de idade. Para realização do tratamento hormonal, 21 fêmeas foram tratadas diariamente com injeção intraperitoneal de VCD (160 mg/kg) durante 20 dias para induzir menopausa, enquanto que 10 fêmeas receberam placebo (óleo de gergelim) na mesma frequência. As 21 fêmeas que receberam VCD, foram divididas em grupo VCD controle (n=10) e VCD estradiol (n=11), que 61 dias após o final do tratamento com VCD, receberam placebo ou β -estradiol (5 $\mu\text{g/kg}$; E8875-250mg, Sigma, Cidade, País) dissolvido em óleo de gergelim, aplicado com injeções subcutâneas três vezes por semana, durante 90 dias. Para confirmar que os animais estavam em menopausa, 60 dias após o fim das injeções com VCD foi realizado citologia vaginal diariamente por um período de 5 dias e a menopausa foi confirmada pela não progressão do ciclo estral. Foi verificado a glicose basal e após uma semana os animais foram eutanasiados. Os camundongos foram dissecados e o sangue, ovários, gordura visceral, útero, fígado e rim coletados e estocados.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6.0. A ANOVA de uma via usada para analisar ganho de peso e metabolização da glicose. Para o peso corporal foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativamente estatísticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do peso corporal durante todo o período do experimento e ganho de peso durante a menopausa estão representados nas **Figura 1 e 2**. Os animais que receberam suplementação com estradiol (VCD+E2) apresentaram maior peso corporal, seguido por aqueles animais em menopausa sem suplementação (VCD) e os controles (CTL) apresentaram-se mais leves ($p < 0.0001$). O peso ganho durante a menopausa foi maior nos animais tratados com terapia hormonal (VCD+E2) comparado a animais controles (CTL) e sem estradiol (VCD) ($p = 0.0155$). Relatos dos efeitos da menopausa no peso corporal e no tecido adiposo podem ser conflitantes. A gordura corporal em animais OVX foi relatada como aumentada (ROGERS; PERFIELD; STRISSEL; OBIN *et al.*, 2009), diminuída (GALLETI; KLOPPER, 1964) ou inalterada (MASON; CARGILL; ANDERSON; CAREY, 2010). Alterações no tecido adiposo de mulheres na menopausa são relatadas de maneira similarmente conflitante com aumentos (LOVEJOY; CHAMPAGNE; DE JONGE; XIE *et al.*, 2008), diminuições (ALOIA; MCGOWAN; VASWANI; ROSS *et al.*, 1991) ou sem alterações (AUBERTIN-LEHEUDRE; GOULET; DIONNE, 2008). No entanto, nosso estudo mostra um claro aumento no peso corporal de animais em menopausa.

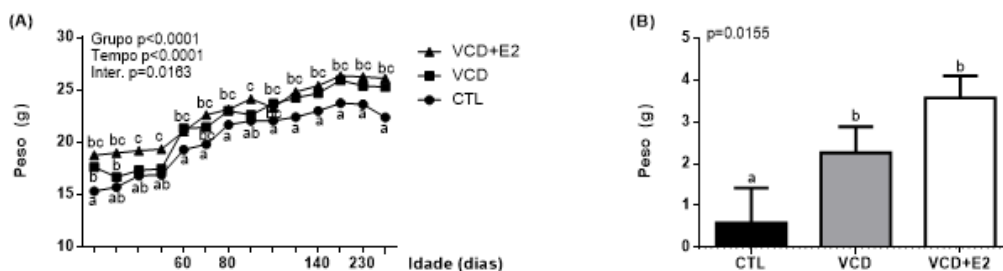


Figura 1. (A) Peso corporal durante o período de experimento. (B) Ganho de peso corporal durante o período da menopausa. Valores foram representados como média \pm erro padrão. Letras diferentes simbolizam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os

Referente ao peso dos órgãos estes estão representados na **Figura 3**. Houve um efeito significativo do tratamento para peso uterino, onde o grupo VCD+E2 teve maior peso uterino em comparação com camundongos CTL e VCD ($p<0.0001$). Similarmente, estudos anteriormente descrevem esse resultado após administração exógena de E2 (KOEBELE; NISHIMURA; BIMONTE-NELSON; KEMMOU *et al.*, 2020). Os animais com menopausa induzida, tanto VCD quanto VCD+E2 apresentaram maior quantidade de tecido adiposo ($p=0.01$) e rins mais pesados ($p=0.006$). Único tecido que não apresentou diferença estatística entre os grupos foi o fígado ($p=0.06$).

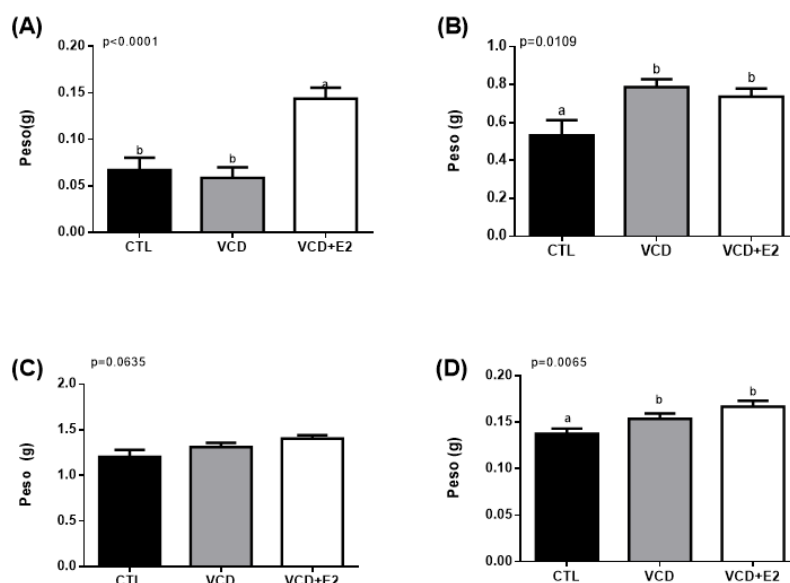


Figura 2. Análise do peso dos tecidos uterino (A), adiposo (B), fígado (C) e rim (D). Valores foram representados como média \pm erro padrão. Letras diferentes simbolizam diferenças estatísticas ($p<0.05$) entre os grupos.

Menores níveis glicêmicos basais foram observados para o grupo suplementado com estradiol, em comparação ao controle e VCD ($p=0.0002$; **Figura 3**). Nossos dados corroboram com (DEPYPERE; DIERICKX; VANDEVELDE; STANCZYK *et al.*, 2020), que observaram uma tendência a níveis mais baixos de glicose entre mulheres em terapia hormonal na menopausa.

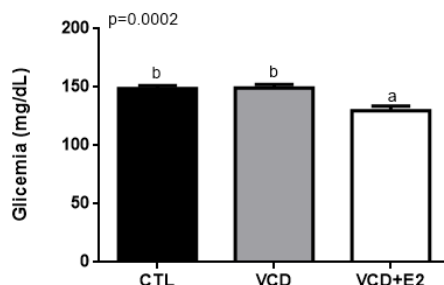


Figura 4. Glicose Basal, letras diferentes representam diferença entre os grupos ($P<0,05$). Valores foram representados como média \pm erro padrão.

CONCLUSÕES

O modelo do experimento foi um sucesso, os animais em menopausa apresentaram alterações metabólicas como aumento do peso corporal e adiposidade, o que

é bem descrito na literatura. O ciclo estral de camundongos tratados com VCD cessou após a conclusão das injeções caracterizando a transição para menopausa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOIA, J. F.; MCGOWAN, D. M.; VASWANI, A. N.; ROSS, P. *et al.* Relationship of menopause to skeletal and muscle mass. **Am J Clin Nutr**, 53, n. 6, p. 1378-1383, Jun 1991.

AUBERTIN-LEHEUDRE, M.; GOULET, E. D.; DIONNE, I. J. Enhanced rate of resting energy expenditure in women using hormone-replacement therapy: preliminary results. **Journal of Aging and Physical Activity**, 16, n. 1, p. 53-60, 2008.

AUSTAD, S. N.; FISCHER, K. E. Sex Differences in Lifespan. **Cell Metab**, 23, n. 6, p. 1022-1033, Jun 14 2016.

DEPYPERE, H.; DIERICKX, A.; VANDEVELDE, F.; STANCZYK, F. *et al.* A randomized trial on the effect of oral combined estradiol and drospirenone on glucose and insulin metabolism in healthy menopausal women with a normal oral glucose tolerance test. **Maturitas**, 138, p. 36-41, Aug 2020.

GALLETI, F.; KLOPPER, A. The Effect of Progesterone on the Quantity and Distribution of Body Fat in the Female Rat. **Acta Endocrinol (Copenh)**, 46, p. 379-386, Jul 1964.

KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. **Syst Biol Reprod Med**, 58, n. 1, p. 57-62, Feb 2012.

KOEBELE, S. V.; NISHIMURA, K. J.; BIMONTE-NELSON, H. A.; KEMMOU, S. *et al.* A long-term cyclic plus tonic regimen of 17 β -estradiol improves the ability to handle a high spatial working memory load in ovariectomized middle-aged female rats. **Hormones and behavior**, 118, p. 104656, 2020.

LIU, W.; WANG, L. Y.; XING, X. X.; FAN, G. W. Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure. **Altern Lab Anim**, 43, n. 6, p. 385-392, Dec 2015.

LOVEJOY, J.; CHAMPAGNE, C.; DE JONGE, L.; XIE, H. *et al.* Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **International journal of obesity**, 32, n. 6, p. 949-958, 2008.

MASON, J. B.; CARGILL, S. L.; ANDERSON, G. B.; CAREY, J. R. Ovarian status influenced the rate of body-weight change but not the total amount of body-weight gained or lost in female CBA/J mice. **Experimental gerontology**, 45, n. 6, p. 435-441, 2010.

O'CONNOR, K. A.; FERRELL, R.; BRINDLE, E.; TRUMBLE, B. *et al.* Progesterone and ovulation across stages of the transition to menopause. **Menopause (New York, NY)**, 16, n. 6, p. 1178, 2009.

SOCIETY, N. A. M. The 2017 hormone therapy position statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, 24, n. 7, p. 728-753, 2017.

SYMONDS, M. E. Integration of physiological and molecular mechanisms of the developmental ori