

## **DIETA OCIDENTAL E SENOLÍTICOS: EFEITOS NA POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA DE CAMUNDONGOS AOS SEIS E NOVE MESES DE IDADE**

**CÉSAR A. PINZÓN-OSORIO<sup>1</sup>; JULIANE B. PROSCZEK<sup>2</sup>; JÉSSICA D. HENSE<sup>3</sup>;  
CAMILA L. MOREIRA<sup>4</sup>; MARIANA M. BARRETO<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil – capinzono@unal.edu.co*

<sup>2</sup>*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil — julianeprosczek@gmail.com*

<sup>3</sup>*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil — jeeh.hense@hotmail.com*

<sup>4</sup>*Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil — camila.lapischies@ufpel.edu.br*

<sup>5</sup>*Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil — mmachadobarreto@hotmail.com*

<sup>6</sup>*Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil — augusto.schneider@ufpel.edu.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A reserva ovariana representa um dos pilares fundamentais da fertilidade, e está intrinsecamente ligada à qualidade de vida e ao bem-estar de mulheres em idade reprodutiva (MOSLEHI et al. 2018). A fertilidade feminina diminui drasticamente com a idade, principalmente devido à perda do número e da qualidade dos oócitos (PETERS, 1969), e fatores como a dieta podem ter um efeito direto neste fenômeno (LEROY et al. 2022). A obesidade como distúrbio metabólico, é uma doença crônica considerada epidemia (WHO, 2022). Interessantemente, a prevalência da obesidade é maior na população feminina do que na masculina, independentemente da idade (BOUTARI E MANTZOROS, 2022), o que sugere que a apresentação de doenças metabólicas e seus efeitos deletérios no sucesso reprodutivo maternal tem maior probabilidade de ocorrer (SILVESTRIS et al. 2019). O crescente consumo de alimentos processados e ricos em gordura saturada, características da dieta ocidental (Western Diet - WD), tem sido associada a uma multiplicidade de problemas como obesidade e doenças crônicas, além de efeitos deletérios na saúde reprodutiva (LEROY et al. 2022).

A senescência celular é uma resposta que limita a proliferação de células envelhecidas ou danificadas, levando a um estado de parada de crescimento celular (CALCINOTTO et al. 2019). Assim, o acúmulo crônico de células senescentes com o avançar da idade, tem potenciais efeitos deletérios na saúde (CALCINOTTO et al. 2019). Neste contexto, os senolíticos são alternativas terapêuticas pela sua capacidade de eliminar células senescentes, reduzindo processos inflamatórios crônicos (HENSE et al. 2022). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos senolíticos dasatinib e a queracetina (D+Q) sobre a população folicular e a reserva ovariana em diferentes idades (6 e 9 meses) em camundongos fêmeas submetidos à WD.

### **2. METODOLOGIA**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFPel. Camundongos fêmeas ( $n=41$ ) da linhagem C57BL/6 com idade de três meses foram mantidos sob condições controladas de temperatura, luz e umidade ( $22 \pm 2$



°C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60%). Metade dos camundongos foram alimentados com uma dieta padrão (CTL) ou ocidental (WD) por três meses ( $n=18/\text{grupo}$ ). Ao início e os três meses do experimento, em alguns dos indivíduos ( $n=5/\text{grupo}$ ) foi feita a eutanásia para coleta de ovário. Aos seis meses de idade, os camundongos de cada grupo ( $n=61$ ) foram divididos em 4 grupos ( $n=6/\text{grupo}$ ) da seguinte maneira: 1) grupo com CTL e administração de dasatinib (5 mg/kg) e quercetina (50 mg/kg) dissolvidos no diluente (60% phosal, 30% PEG400 e 10% álcool etílico) via gavagem (CRTL/D+Q); 2) CTL e administração de placebo (CTL/CTL); 3) WD e administração de dasatinib e quercetina (WD/D+Q); 4) e WD e administração de placebo (WD/CTL). A administração dos senolíticos e placebos foram realizadas durante três dias consecutivos, mensalmente. Aos 9 meses de idade os animais foram eutanasiados para coleta de tecido ovariano. Os ovários foram dissecados, pesados e armazenados em solução de paraformaldeído 4%, desidratados, diafanizados com xilol e posteriormente incluídos em parafina e cortado serialmente em micrótomo a espessura de 5 µm. O protocolo usado para a classificação dos folículos foi baseado em MYERS et al. (2004). As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico Graphpad Prism 8.0. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ( $P>0,05$ ). As medias foram comparadas através de análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P<0,05$ . Todos os dados são relatados como médias ± erro padrão da média (médias ± SEM).

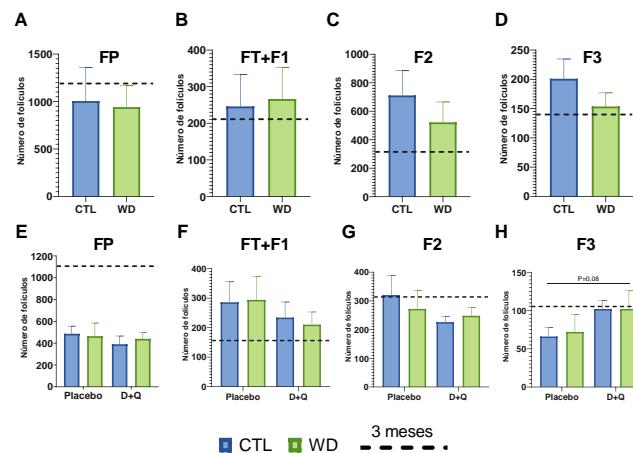
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população de folículos primordiais (FP), em transição e primários (FT+F1), secundários (F2) e terciários (F3) não foram diferentes ( $P>0,05$ ; Figura 1A-B) entre fêmeas de 3 e 6 meses após alimentação com dieta CTL ou WD. Fêmeas de 3 meses de idade tiveram maior número de FP ( $P<0,05$ ; Figura 1E) quando comparadas a fêmeas de 9 meses, no entanto, a quantidade de FT+F1, F2 e F3 foram similares ( $P>0,05$ ; Figura 1F-H). Independente dos tratamentos e dietas, fêmeas de 6 e 9 meses não tiveram diferenças nos números de folículos ( $P>0,05$ ). Foi observado uma tendência de aumento na quantidade de F3 nos grupos recebendo D+Q comparado aos grupos com placebo ( $P=0,08$ ; Figura 1H).

Com base em estudos anteriores, foi hipotetizado que a WD ao promover desequilíbrio metabólico derivada da obesidade, aceleraria a ativação dos folículos primordiais, levando à exaustão prematura da reserva folicular (AIKEN et al. 2016). No entanto, a WD não foi capaz de induzir obesidade (dados não apresentados), o que poderia explicar a similaridade na quantidade de FP quando comparadas WD e CRTL nos 6 e 9 meses de idade (3 e 6 meses de intervenção). No entanto, a exaustão folicular foi marcada aos 9 meses de idade, independente da dieta e da administração de senolíticos. Neste contexto, os achados coincidem com ANSERE et al. (2021) quem documentaram que a densidade de FP diminuiu 70% dos 3 aos 9 meses de idade e que a queda de FP de 3 para 6 meses é pouco significante.

Previamente foi documentado que as senoterapias baseadas em D+Q tem um efeito protetivo da reserva ovariana de camundongos de 3 meses após ser submetidos a os efeitos nocivos da cisplatina (DU et al. 2022). No entanto, GAO et al. (2023) reportaram que apesar de D+Q reduzir significativamente a carga de células senescentes nos ovários após o tratamento com doxorrubicina, não teve

um efeito protetivo da perda massiva de folículos, de acordo com nossos achados. Nossos estudos anteriores com camundongos obesos deficientes em leptina também indicam que o D+Q não tem efeito sobre a reserva ovariana (HENSE et al., 2022). A discrepância entre os estudos pode ser derivada dos diversos delineamentos experimentais utilizados, assim os procedimentos (fármacos ou dietas) para induzir efeitos na exaustão folicular. A dieta (WD) e o tratamento (D+Q) não tiveram um efeito sobre a reserva folicular ovariana, o que parece sugerir que a exaustão da reserva não depende da presença de células senescentes nesta faixa etária.



**Figura 1.** Efeitos da dieta ocidental (WD) e senolíticos (D+Q) na população folicular de camundongos de 6 e 9 meses. (A-D) População de folículos ovarianos aos 6 meses de idades de fêmeas submetidas durante 3 meses a dieta controle (CTL) ou ocidental (WD). (E-H) População de folículos ovarianos aos 9 meses de idade de fêmeas submetidas durante 6 meses a dieta CTL ou WD com administração de placebo (CTL) ou D+Q.

#### 4. CONCLUSÕES

A reserva ovariana representada pela quantidade de diferentes populações foliculares sofre alterações profundas após os 6 meses de idade, sendo observada uma perda massiva da reserva ovariana. A dieta WD não promoveu exaustão da reserva e ainda o tratamento D+Q não tem um efeito protetivo do ovário nestas condições. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os efeitos da dieta na reserva ovariana, assim como de possíveis estratégias farmacológicas protetivas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKEN, C.E.; TARRY-ADKINS, J.L.; PENFOLD, N.C.; DEARDEN, L.; OZANNE, S.E. Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet. *The FASEB Journal*, United States, v. 30, n. 4, p. 1548-56, 2016.

ANSERE, VA.; ALI-MONDAL, S.; SATHIASEELAN, R.; GARCIA, DN.; ISOLA, JVV.; HENSE, JD.; SACCON, TD.; OCAÑAS, SR.; TOOLEY, KB.; STOUT, MB.; SCHNEIDER, A.; FREEMAN, WM. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. *Mechanisms of Ageing and Development*, Ireland, v. 194, n. 1, p. 111425, 2021.



BOUTARI, C.; MANTZOROS, C.S. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. **Metabolism**, United Kingdom, v. 133: p. 155217, 2022.

CALCINOTTO, A.; KOHLI, J.; ZAGATO, E.; PELLEGRINI, L.; DEMARIA, M.; ALIMONTI, A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. **Physiological Reviews**, United States, v. 99, p. 1047–1078, 2019.

DU, D.; TANG, X.; LI, Y.; GAO, Y.; CHEN, R.; CHEN, Q.; WEN, J.; WU, T.; ZHANG, Y.; LU, H.; ZHANG, J.; WANG, S. Senotherapy protects against cisplatin-induced ovarian injury by removing senescent cells and alleviating DNA damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, United States, p. 1-18, 2022.

GAO, Y.; WU, T.; TANG, X.; WEN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, S. Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. **Geroscience**, Switzerland, v. 45, n. 3, p. 1775-1790, 2023.

HENSE, J.D.; GARCIA, D.N.; ISOLA, J.V.; ALVARADO-RINCÓN, J.A.; ZANINI, B.M.; PROSCZEK, J.B.; STOUT, M.B.; MASON, J.B.; WALSH, P.T.; BRIEÑO-ENRÍQUEZ, M.A.; SCHADOCK, I.; BARROS, C.C.; MASTERNAK, M.M.; SCHNEIDER, A. Senolytic treatment reverses obesity-mediated senescent cell accumulation in the ovary. **Geroscience**, Switzerland, v. 44, n. 3, p. 1747-1759, 2022.

LEROY, J.L.M.R.; MEULDERS, B.; MOORKENS, K.; XHONNEUX, I.; SLOOTMANS, J.; DE KEERSMAEKER, L.; SMITS, A.; BOGADO PASCOTTINI, O.; MAREI, W.F.A. Maternal metabolic health and fertility: we should not only care about but also for the oocyte! **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 35, n. 2, p. 1-18, 2022.

MOSLEHI, N.; SHAB-BIDAR, S.; RAMEZANI TEHRANI, F.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Is ovarian reserve associated with body mass index and obesity in reproductive aged women? A meta-analysis. **Menopause**, v. 25, n. 9, p. 1046-1055, 2018.

MYERS, M.; BRITT, K.L.; WREFORD, N.G.; EBLING, F.J. KERR J.B.; Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, United Kingdom, v. 127, n. 5, p. 569-580, 2004.

PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v. 62, n. 1, p. 98-116, 1969.

SILVESTRIS, E.; LOVERO, D.; PALMIROTTA, R. Nutrition and female fertility: An interdependent correlation. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, Switzerland, v. 10, p. 346, 2019.

WHO European Regional Obesity Report 2022. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.