

O PAPEL PROTETOR DOS SENOLÍTICOS NA RESERVA OVARIANA EM UM MODELO ANIMAL DE DHGNA INDUZIDO POR UMA DIETA OCIDENTAL DEFICIENTE EM COLINA

PEREIRA, Tarcísio Henrique L.¹; HENSE, Jéssica Damé²; GARCIA, Drielle Neske³; ASSIS, Inês Laco de⁴; SCHNEIDER, Augusto⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – tarcisio.henrique95@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

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

⁴Universidade Federal de Pelotas - In3slaco@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) aumenta ano a ano e, como consequência desse aumento, a DHGNA tornou-se uma das doenças hepáticas mais prevalentes em todo o mundo (POUWELS; SAKRAN; GRAHAM; LEAL et al., 2022). O alto consumo de dieta rica em colesterol, alta ingestão de alimentos processados, açúcares adicionados e grãos refinados, juntamente com o baixo consumo de vegetais, frutas e peixes é comumente chamada de dieta ocidental (WD) (CORDAIN; EATON; SEBASTIAN; MANN et al., 2005).

Esse padrão alimentar está envolvido na etiologia de inúmeras doenças crônicas, como a diabetes mellitustipo 2 (DM2) (KOPP, 2019), dislipidemias, câncer (DOYLE; DONOHOE; LYSAGHT; REYNOLDS, 2012), DHGNA (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007), e uma dieta ocidental quando deficiente em colina, leva a um modelo de DHGNA sem obesidade (MATSUMOTO; HADA; SAKAMAKI; UNO et al., 2013). Uma dieta pró inflamatória, independente da obesidade pode afetar até mesmo os órgãos reprodutivos, e por consequência a fertilidade.

O envelhecimento reprodutivo em fêmeas é um processo natural do envelhecimento, caracterizado por uma diminuição contínua e progressiva da reserva ovariana e fertilidade (TE VELDE; SCHEFFER; DORLAND; BROEKMAN et al., 1998). Em mamíferos, essa reserva ovariana possui quantidade finita de óocitos ao nascimento, que é gradativamente reduzida ao longo dos anos até seu total esgotamento, que culmina no que chamamos de menopausa em mulheres (BAKER, 1963; FINCH, 2014) ou estropausa nos roedores (KEVENAAR; MEERASAHI; KRAMER; VAN DE LANG-BORN et al., 2006).

Com o intuito de amenizar patologias relacionadas à idade, foram desenvolvidos os compostos senolíticos, que possuem a capacidade de eliminar seletivamente as células senescentes (BAKER; WIJSHAKE; TCHKONIA; LEBRASSEUR et al., 2011; PIGNOLO; PASSOS; KHOSLA; TCHKONIA et al., 2020). Tais compostos tem o potencial de reduzir os processos inflamatórios e os sintomas clínicos que tendem a ser acentuados durante o envelhecimento aumentando a longevidade em camundongos (XU; PIRTSKHALAVA; FARR;

WEIGAND et al., 2018). Os senolíticos mais estudados são a combinação de dasatinib e queracetina (D+Q), que de forma sinérgica, agem na remoção das células senescentes (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND et al., 2018). Dasatinib é um medicamento antineoplásico, comumente utilizado no tratamento de certos tipos de leucemia em adultos e crianças (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND et al., 2018). A queracetina é um flavonóide com atividade antioxidante e anti-inflamatória. Portanto, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a eficácia dos senolíticos na dasatinib e queracetina (D+Q) na reserva ovariana, em camundongos fêmeas com DHGNA induzidos pela dieta ocidental deficiente em colina.

2. METODOLOGIA

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (028574/2021-33). Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com três meses de idade, selecionados aleatoriamente para receber uma dieta padrão (SD, LIP: 12%, CHO: 70%, PTN: 18%, TestDiet® 5GFJ) ou WD deficiente em colina (LIP: 40%, CHO: 44%, PTN: 16%, TestDiet® 5TFH) ad libitum até os nove meses de idade. Aos seis meses de idade, os animais foram divididos em quatro grupos para receber senolíticos (D+Q) ou veículo controle até os nove meses de idade. Os senolíticos foram administrados durante três dias consecutivos, uma vez por mês, através de gavagem oral (D=5 mg/kg; Q=50 mg/kg) dissolvidos em veículo (60% phosal, 30% PEG400 e 10% álcool etílico) (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND et al., 2018). Seis camundongos de cada grupo foram eutanasiados aos três e nove meses de idade para coleta dos ovários. Os ovários foram removidos de paraformaldeído a 4%, desidratados em álcool, clarificados em xilol, embebidos em parafina e cortados sequencialmente com uma espessura de 5 µm em um micrótomo semiautomático (RM2245 38, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Uma em cada seis seções foi selecionada e colocada em lâminas. Após secagem em estufa a 56°C por 24 horas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma®, St. Louis, MO, EUA). As imagens dos cortes ovarianos foram capturadas por uma câmera digital (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japão), utilizando objetivas de 4, 10 e 40X. Folículos com núcleos de óocitos claramente visíveis foram quantificados. O número final de folículos foi dividido pelo número total de secções de cada ovário.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

DHGNA não afetou a reserva ovariana

A reserva ovariana não foi alterada pela ocorrência de DHGNA, nem pelo tratamento com senolíticos D+Q. No entanto, no grupo dieta controle os animais tratados com D+Q verificou-se uma diminuição na quantidade de folículos

primordiais, indicando um efeito prejudicial para a reserva ovariana quando os animais não sendo desafiados metabolicamente.

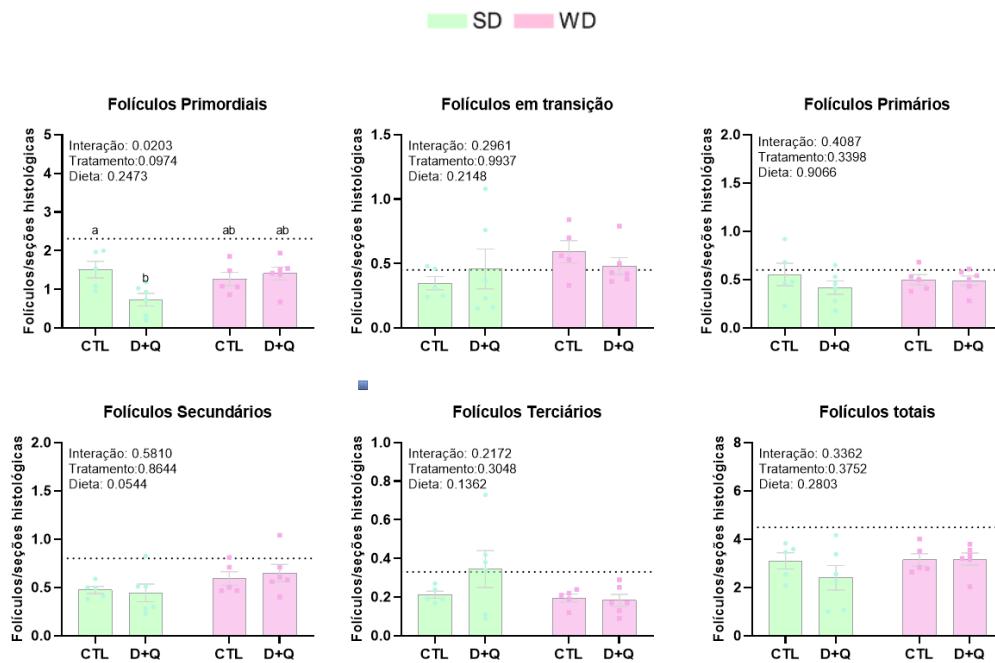


Figura 7- Folículos primordiais, folículos de transição, folículos primários, folículos secundários, folículos terciários e folículos totais de camundongos fêmeas de 9 meses de idade, alimentadas com dieta padrão (SD) ou dieta ocidental (WD) e tratados com placebo (CTL) ou Dasatinibe e quercetina (D+Q). A linha pontilhada representa medidas em camundongos fêmeas controle com 3 meses de idade. Todos os dados são apresentados como média \pm SEM. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Em nosso estudo, fornecemos a WD por um período de seis meses para induzir o desenvolvimento de DHGNA, administrando tratamento com drogas senolíticas nos últimos três meses do experimento. Os resultados indicaram que os camundongos sob WD desenvolveram DHGNA, mesmo na ausência de obesidade, mas a DHGNA não foi capaz de alterar de forma significativa o número de folículos ovarianos. Nos animais do grupo que consumiram uma dieta controle, houve uma diminuição do número de folículos primordiais quando esses animais foram tratados com D+Q, indicando possivelmente que os senolíticos são prejudiciais quando não existe a presença de doenças metabólicas que resultam em inflamação sistêmica. Em estudo semelhante utilizando camundongos idosos, tratados com o senolítico ABT-263, foram encontrados resultados negativos em relação a reserva ovariana de camundongos idosos, porém o contrário ocorreu quando o ABT-263 foi introduzido precocemente (XIA, X., YANG Y., LIU P. et al, 2018). Indicando que os senolíticos podem tanto atuar na preservação quanto na depleção da reserva ovariana conforme fatores como idade, condições metabólicas e tipo de dieta.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a DHGNA não afetou a reserva ovariana, que também não sofreu os efeitos do tratamento com D+Q. Quando os animais não

foram submetidos a condições metabólicas adversas, a D+Q demonstraram causar efeitos negativos na reserva ovariana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- POUWELS, S.; SAKRAN, N.; GRAHAM, Y.; LEAL, A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. **BMC Endocr Disord**, 22, n. 1, p. 63, Mar 14 2022.
- CORDAIN, L.; EATON, S. B.; SEBASTIAN, A.; MANN, N. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, 81, n. 2, p. 341-354, Feb 2005.
- MONSANTO, S. P.; HINTZE, K. J.; WARD, R. E.; LARSON, D. P. et al. The new total Western diet for rodents does not induce an overweight phenotype or alter parameters of metabolic syndrome in mice. **Nutr Res**, 36, n. 9, p. 1031-1044, Sep 2016.
- KOPP, W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 12, p. 2221-2236, 2019.
- DOYLE, S. L.; DONOHOE, C. L.; LYSAGHT, J.; REYNOLDS, J. V. Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. **Proc Nutr Soc**, 71, n. 1, p. 181-189, Feb 2012.
- ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; SANYAL, A. J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**, 86, n. 2, p. 285-300, Aug 2007.
- TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMAN, F. J. et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol Cell Endocrinol**, 145, n. 1-2, p. 67-73, Oct 25 1998.
- BAKER, T. G. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 158, p. 417-433, Oct 22 1963.
- FINCH, C. E. The menopause and aging, a comparative perspective. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 142, p. 132-141, Jul 2014.
- KEVENAAR, M. E.; MEERASAHI, M. F.; KRAMER, P.; VAN DE LANG-BORN, B. M. et al. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, 147, n. 7, p. 3228-3234, Jul 2006
- 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
- XIA, X., YANG Y., LIU P. et al. The senolytic drug ABT-263 accelerates ovarian aging in older female mice. **Sci Rep** 14, 23178 (2024)