

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE COLINA EM DIETAS RICAS EM GORDURA SOBRE A FIBROSE OVARIANA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

ÂNDREA GOIA ALSINO NOGUEIRA¹; CESAR AUGUSTO PINZON OSORIO²;
JÉSSICA DAMÉ HENSE³; GIULIA DA CUNHA PEREIRA⁴; BIANKA MACHADO
ZANINI⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – deianogueira1616@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas -capinzono@unal.edu.co

³Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- giuliacpereira@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- bianka_zanini@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

As dietas ocidentais, caracterizadas pelo alto teor de gordura, estão fortemente associadas à crescente prevalência da obesidade no mundo (CLEMENTE-SUÁRES et al; 2023). A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo ou distribuição anormal de tecido adiposo e induz um estado inflamatório (SILVESTRIS et al; 2018), acarretando o desenvolvimento de danos hepáticos (YOUNOSSI Z. M.; 2019). Esse quadro inflamatório na obesidade está associado com aumento dos níveis de fibrose no tecido ovariano (SKAZNIK- WIKIEL et al; 2016)

A fibrose é uma das consequências da desorganização e da remodelação da matriz extracelular (MEC) (SUN et al 2013), processo que se intensifica na obesidade (RUIZ-OJEDA et al; 2019). Esse ambiente fibrótico compromete tecidos como o hepático, podendo resultar na disfunção orgânica e de danos na estrutura (WEISKIRCHEN R.; WEISKIRCHEN S.; TACKE F.; 2019). Ademais, a inflamação crônica e a fibrose podem influenciar na regulação dos processos ovulatórios e ocasionar a infertilidade (MACZKA et al; 2024), diminuindo as chances das fêmeas obesas de conceber (SILVESTRIS et al; 2018).

Sabe-se ainda que a deficiência de colina, um nutriente essencial para o metabolismo lipídico (ZEISEL S.H.; 2012), ocasiona danos hepáticos, porém, não induzindo o fenótipo obeso (RAUBENHEIMER P. J.; NYIREND M. J.; WALKER B. R.; 2006). A deficiência de colina já apresenta correlação com um desenvolvimento embrionário comprometido em camundongos (CHAN et al; 2010). Nesse sentido, pesquisas recentes têm buscado entender se as dietas pobres em colina podem afetar a fertilidade, mesmo sem o fenótipo obeso, sendo uma área pouco explorada (ZHAN et al; 2021). Com base nessas evidências, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da dieta ocidental deficiente em colina e dietas ricas em gorduras sobre obesidade, dano hepático e fibrose ovariana em camundongos fêmeas.

2. METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (número 006470/2023-30). Foram utilizadas 21 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 3 meses de idade, mantidos sob condições controladas de temperatura e luz ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclos claro escuro de 12h) e recebendo água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: dieta controle (CSD), dieta controle deficiente em colina (CDC), dieta rica em gordura (HFD) e dieta ocidental deficiente em colina (CDWD), durante um período de 10 semanas. O peso corporal foi registrado semanalmente ao longo do experimento.

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados, e fígado e ovários foram coletados, dissecados, pesados e fixados em solução de paraformaldeído a 4%. Para a análise do colágeno, ovários foram desidratadas em álcool, clareados em xanol e adicionados a Paraplast Plus. Foram cortados em micrótomo automático em uma espessura de 5 μ m e os cortes foram retirados e colocados em lâminas histológicas padrão, seguidas de coloração com corante de Picosirius Red (PSR, Sirius Red F3BA; Direct Red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que marca preferencialmente fibras de colágeno tipos I e III. As imagens das secções foram capturadas usando uma câmera digital (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japão) com uma objetiva de 10 \times . O conteúdo de colágeno foi quantificado usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 8.0. Para a comparação entre grupos (fibrose e peso corporal), foi utilizado o teste ANOVA de uma via, considerando-se diferenças estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo HFD apresentou aumento significativo no peso corporal em comparação aos demais grupos ($P < 0,0001$; **FIGURA 1A**). Com relação ao tecido hepático, o grupo CDWD apresentou aumento do peso do fígado e padrões de esteatose e danos hepáticos mesmo não apresentando fenótipo obeso (**FIGURA 1B e C**).

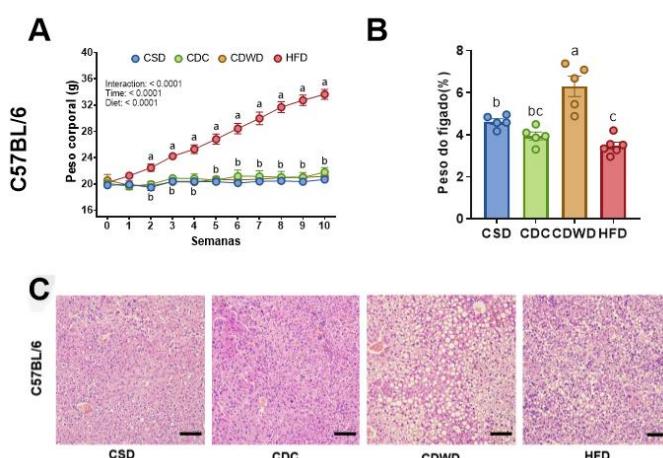


Figura 1 – (A) Peso corporal da semana 1 a 10 de experimento; **(B)** peso do fígado (%); **(C)** secções histológicas hepáticas de camundongos fêmeas nos grupos dieta controle (CSD), dieta controle deficiente em colina (CDC), dieta ocidental deficiente em colina (CDWD) e dieta rica em gordura (HFD).

Os resultados referentes ao peso corroboram com a literatura que a dieta rica em gordura aumenta o peso corporal (ROMUALDO et al; 2022). De modo consistente com nossos resultados, as dietas deficientes em colina não influenciam

no peso corporal, mas induzem danos hepáticos, elevando-se a fibrose no tecido (RAUBENHEIMER P. J.; NYIREND M. J.; WALKER B. R.; 2006). Visto que o tecido hepático, privado desse nutriente, desenvolve esteatose, os hepatócitos morrem e posteriormente, a inflamação e fibrose é desenvolvida (MEHEDINT M. G; ZEISEL S. H.; 2014).

No ovário, observou-se aumento de fibrose nos grupos HFD e CDWD em comparação aos grupos controle com e sem colina ($P<0.05$; **Figura 2A e B**).

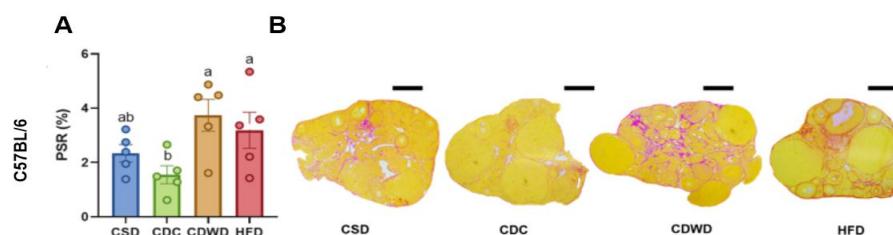


Figura 2 - (A) Porcentagem de fibrose ovariana; **(B)** imagens representativas de tecido ovariano nos grupos dieta controle (CSD), dieta controle deficiente em colina (CDC), dieta ocidental deficiente em colina (CDWD) e dieta rica em gordura (HFD).

Em relação ao tecido ovariano, nossos resultados indicam que as dietas padrão ocidentais impactam no ovário, mesmo sem a obesidade, como no grupo CDWD. Esse achado converge com pesquisas anteriores, indicando que as dietas deficientes em colina podem induzir alterações epigenéticas reguladoras de diversos mecanismos biológicos e patológicos (JIANG et al; 2014), capazes de modular cenários de estresse oxidativo, proliferação celular e inflamação (KHAN et al; 2023). Assim, independente do ganho de peso, a presença de um quadro inflamatório hepático, contribui para o aumento da fibrose no tecido ovariano, em concordância com relatos prévios (SHAZNIK- WIKIEL et al; 2016). Nota-se que o grupo com dieta rica em gordura desenvolveu nível semelhante de fibrose ao grupo com CDWD.

4. CONCLUSÕES

As evidências deste estudo indicam que as dietas ricas em gordura aumentam o peso corporal de camundongos fêmeas, induzindo a obesidade, enquanto que a deficiência em colina provoca lesões hepáticas independentemente do fenótipo obeso. Independente, ambas as dietas levaram ao aumento da fibrose ovariana, com potenciais implicações para a fertilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAN, J. et al. Low dietary choline and low dietary riboflavin during pregnancy influence reproductive outcomes and heart development in mice. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 1035–1043, 17 fev. 2010.

CLEMENTE-SUÁREZ, V. J. et al. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: a Narrative Review. **Nutrients**, v. 15, n. 12, p. 2749–2749, 2023.

JIANG, X.; WEST, A. A.; CAUDILL, M. A. Maternal choline supplementation: a nutritional approach for improving offspring health? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 263–273, maio 2014.

KATARZYNA MACZKA et al. The Impact of the Endocrine and Immunological Function of Adipose Tissue on Reproduction in Women with Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 17, p. 9391–9391, 29 ago. 2024.

KHAN, M. Z. et al. Overview of the effect of rumen-protected limiting amino acids (methionine and lysine) and choline on the immunity, antioxidative, and inflammatory status of periparturient ruminants. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 12 jan. 2023.

MEHEDINT, M. G.; ZEISEL, S. H. Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 16, n. 3, p. 339–345, 1 maio 2013.

RAUBENHEIMER, P. J.; NYIREND, M. J.; WALKER, B. R. A Choline-Deficient Diet Exacerbates Fatty Liver but Attenuates Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice Fed a High-Fat Diet. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2015–2020, 27 jun. 2006.

ROMUALDO, G. R. et al. Western diet–induced mouse model of non-alcoholic fatty liver disease associated with metabolic outcomes: Features of gut microbiome-liver-adipose tissue axis. **Nutrition**, v. 103-104, p. 111836, 1 nov. 2022.

RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Effects of Sweeteners on the Gut Microbiota: A Review of Experimental Studies and Clinical Trials. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl 1, p. S31–S48, 1 jan. 2019.

SILVESTRIS, E. et al. Obesity as disruptor of the female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, 9 mar. 2018.

SKAZNIK-WIKIEL, M. E. et al. High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 5, 1 maio 2016.

SUN, K. et al. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 470–477, out. 2013.

WEISKIRCHEN, R.; WEISKIRCHEN, S.; TACKE, F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, p. 2–15, fev. 2019.

YOUNOSSI, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 3, p. 531–544, mar. 2019.

ZEISEL, S. H. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1-2, p. 34–38, maio 2012.

ZHAN, X. et al. Choline supplementation influences ovarian follicular development. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 26, n. 12, p. 1525–1536, 30 dez. 2021.