

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**SENESCÊNCIA CELULAR E EFEITO DE TRATAMENTO COM SENOLÍTICOS NO
OVÁRIO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE OBESOS**

Jéssica Damé Hense

Pelotas, 2021

JÉSSICA DAMÉ HENSE

**SENESCÊNCIA CELULAR E EFEITO DE TRATAMENTO COM
SENOLÍTICOS NO OVÁRIO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Augusto Schneider

Coorientador: Carlos Castilho de Barros

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H526s Hense, Jéssica Damé

Senescência celular e efeito de tratamento com senolíticos no ovário de camundongos geneticamente obesos / Jéssica Damé Hense ; Augusto Schneider, orientador ; Carlos Castilho de Barros, coorientador. — Pelotas, 2021.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Reserva ovariana. 2. Obesidade. 3. Células senescentes. 4. Senolíticos. I. Schneider, Augusto, orient. II. Barros, Carlos Castilho de, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Agradecimentos

À minha família, aqueles que sempre me incentivaram. Em especial aos meus pais Fernanda Damé Hense e Delmar Hense, minha irmã Tuize Hense, minha madrinha de coração Valdéria e ao meu noivo Ângelo Zarnot, incansáveis no amor, confiança e apoio.

Ao meu orientador, Augusto Schneider, só tenho a agradecer por todos os ensinamentos compartilhados, disponibilidade em me auxiliar sempre que precisei, por toda paciência, incentivo e apoio.

Aos amigos que o mestrado me deu, que tornaram tudo mais leve e agradável. Em especial a Bianka Zanini, Driele Garcia e José Isola que compartilharam comigo muitos momentos importantes. Agradeço pela amizade e pelos ensinamentos. Driele não tenho como expressar o quanto sou grata por todo aprendizado, paciência e boa vontade em ajudar sem medir esforços.

Aos servidores do Departamento de Nutrição, em especial Renata Ramirez, por me ajudar com a manutenção dos animais. Também pelo incentivo e amizade desde a graduação.

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia – UFPel – pelo espaço cedido para realização do meu trabalho, ao Professor Rafael Gianella Mondadori e aos técnicos, Eliane e Luís Augusto, que estiveram presentes me dando apoio sempre que precisei.

A todos os que colaboraram para a realização desse trabalho em especial ao professor Carlos Castilho de Barros e ao Ph.D. Joao Rincón por toda a ajuda.

A todos vocês, muito obrigada!

Resumo

HENSE, Jéssica Damé. **Senescência celular e efeito de tratamento com senolíticos no ovário de camundongos geneticamente obesos**. Orientador: Augusto Schneider 2020. 54f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021

Camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) são obesos e estéreis. Esse modelo experimental é uma importante ferramenta para estudos de obesidade e comorbidades relacionadas. Células senescentes estão presentes em inúmeros tecidos do organismo, em maior quantidade durante o envelhecimento e obesidade contribuindo para o aumento da inflamação tecidual. O tratamento com drogas senolíticas dasatinib e quercetina (D+Q) tem a capacidade de reduzir de forma seletiva células senescentes em diversos órgãos, aumentando a longevidade e reduzindo os sintomas característicos do envelhecimento. Apesar disso, não há dados se essas células estão presentes nos órgãos reprodutivos de fêmeas. Além disso, a caracterização da reserva ovariana deste modelo obeso é escassa. Portanto o objetivo do estudo foi caracterizar a reserva ovariana e sua relação com a senescência celular em camundongos obesos. Foram utilizados 10 animais no experimento 1, onde animais *ob/ob* (n=5) e animais tipo selvagem (WT) (n=5) foram eutanasiados aos 12 meses para coleta do tecido ovariano. O experimento 2 foi composto por (n=12) animais fêmeas *ob/ob* divididos em grupos controle (n=6) e tratamento (n=6). O grupo tratamento recebeu senolíticos (D+Q) que se iniciou aos dois meses de idade por via intragástrica a cada duas semanas, e o grupo controle recebeu placebo, no mesmo período. Estes animais foram eutanasiados aos 6 meses de idade e os ovários foram coletados para análises. No experimento 1 não houve diferença quanto ao tamanho da reserva ovariana entre animais WT e *ob/ob* ($P>0,05$), porém houve uma maior carga de células senescentes no ovário de fêmeas obesas, bem como maior peso corporal e gordura periovariana. No experimento 2 também não houve diferença quanto ao tamanho da reserva ovariana e sensibilidade a insulina ($P>0,05$) em animais *ob/ob* recebendo D+Q. No entanto, houve uma redução na senescência celular no ovário das fêmeas obesas tratadas. Portanto, apesar de observarmos mais senescência nas fêmeas obesas, a obesidade não afetou a reserva ovariana de forma significativa, e o tratamento com D+Q reduziu a carga senescente, porém não refletiu na reserva ovariana de camundongos *ob/ob* tratados com D+Q.

Palavras-chave: Reserva ovariana, obesidade, células senescentes, senolíticos.

Abstract

HENSE, Jéssica Damé. **Cell senescence and effect of treatment with senolytics on the ovary of genetically obese mice**. Advisor: Augusto Schneider. 2020. 34f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Leptin-deficient (*ob/ob*) mice are obese and sterile. This experimental model is an important tool for studies of obesity and related comorbidities. Senescent cells are present in numerous tissues of the organism, in greater quantity during aging and obesity, contributing to the increase of tissue inflammation. Treatment with senolytic drugs dasatinib and quercetin (D+Q) has the ability to selectively reduce senescent cells in various organs, increasing longevity and reducing symptoms of aging. Despite this, there is no data on whether these cells are present in the female reproductive organs. In addition, the characterization of the ovarian reserve of this obese model is scarce. Therefore, the aim of the study was to characterize the ovarian reserve and its association with cellular senescence in obese mice. For this, 10 animals were used in experiment 1, where *ob/ob* mice (n=5) and wild type lean mice (WT) (n=5) were euthanized at 12 months to collect ovarian tissue. Experiment 2 consisted of (n=12) female *ob/ob* mice divided into control (n=6) and treatment (n=6) groups. The treatment group received senolytics (D+Q) starting at two months of age via gavage every two weeks, while the control group received a placebo in the same period. These mice were euthanized at 6 months of age and the ovaries were collected for analysis. In experiment 1, there was no difference in the size of the ovarian reserve between *ob/ob* and WT mice ($P>0.05$). However, there was more senescent cells in the ovary of obese females, as well as increased body weight and periovarian fat. In experiment 2, there was no difference in the size of the ovarian reserve and in insulin sensitivity ($P>0.05$) in control and D+Q treated females. However, there was a decrease in senescence in the ovary of treated obese mice. In conclusion, although we observed more senescence in obese females, it did not significantly affect the ovarian reserve. The treatment with D+Q reduced the senescent load but did not reflect in the ovarian reserve of *ob/ob* mice treated with D+Q.

Keywords: Ovarian reserve, obesity, cell senescence, senolytics.

Lista de figuras

- Figura 1 Análise do peso corporal (A), peso da gordura periovariana (B) dos grupos *ob/ob* e WT aos 12 meses de idade
- Figura 2 Análise da quantidade média de folículos em diferentes estágios de crescimento dos grupos *ob/ob* e WT aos 12 meses de idade
- Figura 3 Análise da porcentagem da área ovariana com marcação de lipofuscina (em % de pixels) feita com corante sudan black em fêmeas *ob/ob* e WT aos 12 meses de idade.
- Figura 4 Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes marcadores de senescência em fêmeas *ob/ob* e WT aos 12 meses de idade.
- Figura 5 Análise da porcentagem de ganho de peso e peso da gordura periovariana dos grupos *ob/ob* tratamento e controle aos 6 meses de idade
- Figura 6 Análise do teste de tolerância à insulina (TTI) dos grupos *ob/ob* tratamento e controle aos 6 meses de idade
- Figura 7 Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos *ob/ob* tratamento e controle aos 6 meses de idade
- Figura 8 Análise da quantidade média de folículos em diferentes estágios de crescimento dos grupos *ob/ob* tratamento e controle aos 6 meses de idade
- Figura 9 Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes marcadores de senescência dos grupos *ob/ob* tratamento e controle aos 6 meses de idade

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|-----------------------------|--|
| β 2m | β -2-Microglobulina |
| β Act | β -Actina |
| Amh | Hormônio anti-mulleriano |
| Akt1 | Proteína quinase B |
| CCL2 | Ligante 2 da quimiocina |
| Col1A1 | Colágeno tipo I alfa 1 |
| Foxo3a | Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| Gdf-15 | Fator de diferenciação de crescimento 15 |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| HPO | Hipotálamo- hipófise- ovário |
| Igf-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| IL1 | Interleucina 1 |
| IL-1a | Interleucina 1 alfa |
| IL6 | Interleucina 6 |
| IL8 | Interleucina 8 |
| IMC | Índice de massa corporal |
| Kit | Receptor tirosina quinase |
| Kitl | <i>Kit Ligand</i> |
| LH | Hormônio luteinizante |
| Mmp12 | Metalopeptidase de matriz 12 |
| Mtor | Alvo de sinalização mamífero da rapamicina |
| p16 ^{INK4A} /CDKN2 | Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A |
| P21/CDKN1A | Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A |
| TrpP53 | Tumor de proteína p53 |
| POAT | Tecido adiposo periovariano |
| Pi3k | Fosfoinosítido-3-Quinase |
| RC | Restrição Calórica |
| RTqPCR | Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time |
| SASP | Fenótipo secretório associado à senescência |
| SESN2 | Sestrin 2 |
| STC1 | Stanniocalcina-1 |

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| SOP | Síndrome dos ovários policísticos |
| TA | Tecido adiposo |
| TNF α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TTI | Teste de tolerância à insulina |

Sumário

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Introdução..... | 9 |
| 2 | Revisão de literatura..... | 11 |
| 2.1 | Envelhecimento ovariano..... | 11 |
| 2.2 | Obesidade e envelhecimento..... | 14 |
| 2.3 | Senescência celular..... | 16 |
| 2.4 | Leptina e camundongos ob/ob..... | 18 |
| 2.5 | Associação entre longevidade e fertilidade | 21 |
| 3 | Objetivo e metas | 23 |
| 3.1 | Objetivo geral | 23 |
| 3.2 | Objetivo específicos | 23 |
| 4 | Materiais e métodos | 24 |
| 4.1 | Animais e desenho experimental..... | 24 |
| 4.2 | Teste de tolerância a insulina | 24 |
| 4.3 | Análise histológica..... | 25 |
| 4.4 | Expressão gênica..... | 26 |
| 4.5 | Sudan black..... | 28 |
| 4.6 | Análise estatística..... | 28 |
| 5 | Resultados e discussão | 29 |
| 6 | Considerações finais e perspectivas futuras..... | 42 |
| 7 | Referência bibliográficas | 43 |
| | Anexos | 51 |

1 Introdução

Animais que possuem deficiência de leptina, carregam uma mutação no gene *ob* (DREL; MASHTALIR; ILNYTSKA; SHIN *et al.*, 2006), por conseguinte são obesos, tem menor sobrevivência, fertilidade prejudicada, são resistentes à insulina, além de outras comorbidades associadas (COLEMAN, 1978). O efeito da deficiência da leptina na infertilidade se dá através do hipotálamo, visto que a diminuição da liberação de gonadotrofinas acaba inibindo a ovulação (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996). Camundongos *ob/ob* possuem uma reserva ovariana reduzida quando comparada com animais normais, desenvolvimento folicular prejudicado, maior apoptose em folículos pré-antrais (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER *et al.*, 2012), oócitos danificados tanto em folículos antrais como nos pré-antrais (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER *et al.*, 2012). A fertilidade de camundongos *ob/ob* é restaurada quando feita a suplementação de leptina exógena (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996), ou transplante de tecido adiposo de irmãos selvagens da mesma ninhada (BARROS; ALMEIDA; MORI; VALERO *et al.*, 2009). Demonstrando assim a importância da leptina para a função ovariana normal e fertilidade.

A expectativa de vida tem aumentado nos dias atuais (WEST; LYTHGOE; BARBEN; NOBLE *et al.*, 2014). Além disso, mulheres têm optado por adiar a maternidade, e isso acarreta na necessidade do prolongamento da vida reprodutiva feminina, de forma saudável (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*, 2016). Em contraponto a longevidade, há uma alta prevalência de obesidade, que agrava as comorbidades associadas ao envelhecimento, comprometendo ainda mais a capacidade de resposta à insulina (MANCUSO; BOUCHARD, 2019). A obesidade está associada a problemas reprodutivos, acelera o gasto da reserva ovariana (WANG; LUO; XU; XU *et al.*, 2014), ocasionando impactos negativos que também são observados como consequência do envelhecimento natural.

Tanto o envelhecimento como a obesidade leva a um aumento na proporção de células senescentes em diferentes tecidos do organismo (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), ou seja, este estado de parada proliferativa estável é acompanhado pelo fenótipo secretor associado à senescência (SASP), que envolve a secreção de sinais pró-inflamatórios no microambiente do tecido. Estes fatores contribuem para aparecimento de morbidades 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. No entanto, são limitados os dados, se há presença ou não de células senescentes em órgãos reprodutores femininos. Assim, nosso estudo visa melhor entender o papel da obesidade na regulação do envelhecimento ovariano, com o objetivo de preservar a fertilidade e prevenir doenças associadas ao envelhecimento na mulher.

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho será caracterizar a reserva ovariana, quantificando os diversos tipos de folículos, analisando e modulando a senescência celular em camundongos obesos.

2 Revisão de literatura

2.1 Envelhecimento ovariano

Envelhecimento é um processo fisiológico, de diminuição progressiva da função tecidual, que ocorre de forma natural com a idade (ALONSO-FERNANDEZ; DE LA FUENTE, 2011). Existem inúmeras teorias para descrever o envelhecimento, sendo a mais aceita que se trata do acúmulo de danos que ocorrem de forma progressiva, que compreendem a instabilidade genômica, encurtamento de telômeros, alterações epigenéticas e perda da proteostase (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Como consequência a esses danos, o organismo dá início a uma resposta compensatória que tem como objetivo atenuar o dano, como a desregulação na sensibilidade de nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência celular, que são projetadas para proteger o organismo contra danos ou escassez de nutrientes (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Estas respostas quando em excesso ou de forma crônica, como no processo de envelhecimento avançado, acabam desenvolvendo doenças relacionadas ao envelhecimento (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). A senescência celular, uma dessas respostas, é um mecanismo defensivo que impede a tumorigênese, mas que, em excesso pode promover o dano tecidual (LIU; WU; JIANG; XU *et al.*, 2020). Já outras respostas também estão ligadas ao declínio funcional do organismo com o envelhecimento, pois afetam diretamente a função dos tecidos e a homeostase, como a exaustão das células-tronco e alteração da comunicação intracelular (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Ainda, somado a todas as consequências do envelhecimento, nas fêmeas é observado um declínio severo da fertilidade, sendo um dos eventos mais importantes que afetam a reprodução humana e com consequências na saúde da fêmea (AHMED; AHMED; EL-GAMMAL; SHOUMAN *et al.*, 2019).

O envelhecimento ovariano refere-se ao esgotamento da reserva folicular ovariana, que afeta não só a quantidade, mas também a qualidade. Em roedores a reserva ovariana é definida logo após o nascimento com a quebra da vesícula germinativa e formação dos folículos primordiais (PETERS, 1969), o que ocorre durante a vida fetal em mulheres (TE VELDE; SCHEFFER;

DORLAND; BROEKMANS *et al.*, 1998). A reserva ovariana é formada por folículos primordiais que são folículos em estado quiescente, caracterizado por um oócito rodeado por uma camada de células achatadas da pré-granulosa (LI; FU; XU; LIN *et al.*, 2015). Também constitui a reserva os folículos pré-antrais, já recrutados, mas que estão em fase de desenvolvimento (primários e secundários). O folículo primário se caracteriza por um oócito rodeado por uma única camada de células cuboides da granulosa ao invés de achatadas, e os secundários rodeados por mais de uma camada de células da granulosa cuboides, sem antro visível. Já os folículos antrais (terciários) caracterizam-se por possuírem o antro claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa do *cumulus* em torno do oócito e apresentam crescimento cíclico após a puberdade (PETERS, 1969; ZOU; YUAN; YANG; LUO *et al.*, 2009) (ZOU; YUAN; YANG; LUO *et al.*, 2009).

A reserva ovariana se caracteriza pela quantidade de folículos primordiais presentes no ovário em um determinado momento. Estes são continuamente ativados e recrutados, o que leva ao seu crescimento e finalmente a ovulação ou a atresia (BAKER, 1963). Uma vez ativado, o folículo primordial não retorna mais à reserva, ou seja, é um processo irreversível, pois as células germinativas não podem se proliferar de maneira significativa. No momento que a reserva se esgota ocorre um evento chamado menopausa em mulheres (BAKER, 1963). Em camundongos não há um evento de menopausa propriamente dito, porém a reserva reduz significativamente com o envelhecimento (KEVENAAR; MEERASAHIB; KRAMER; VAN DE LANGBORN *et al.*, 2006), assim como a fertilidade (SELESNIEMI; LEE; TILLY, 2008). No entanto, antes da menopausa, acontece a redução progressiva do número de folículos com o avançar da idade, que resulta na redução da fecundidade e a esterilidade natural mais próximo à menopausa. A menopausa aumenta consideravelmente o risco para diversas doenças, que não só ligadas a reprodução, mas também ligadas ao metabolismo, como doenças cardiovasculares, ósseas, hipertensão, diabetes mellitus, câncer ovariano, além de outras alterações na saúde feminina (NEWSON, 2018; PRESTWOOD; RAISZ, 2002). Portanto, a vida útil reprodutiva de uma fêmea depende do tamanho inicial da reserva de folículos primordiais, bem como da taxa de depleção desses folículos (RICHARDSON; GUO; FAUSER; MACKLON, 2014).

A ativação dos folículos primordiais depende de diversos fatores de crescimento locais, e de inúmeras vias que estão envolvidas nesse processo. Uma das principais vias de sinalização que participam desse processo é a fosfoinositídeo-3-quinase (Pi3k) proteína quinase B (Akt1) e o seu efetor, o Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (DONG; COPPS; GUO; LI *et al.*, 2008). No folículo primordial, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e a insulina desencadeiam uma via intracelular (Pi3k/Akt1), e quando ocorre ativação dessa via resulta na fosforilação da Foxo3a, levando a saída da FOXO3a do núcleo (CASTRILLON; MIAO; KOLLIPARA; HORNER *et al.*, 2003). No folículo primordial, quando a FOXO3a é fosforilada, ela sai do núcleo e vai ao citoplasma do oócito, ou seja, quando não fosforilada a FOXO3a está localizada no núcleo do oócito mantendo o mesmo em um estado quiescente (CASTRILLON; MIAO; KOLLIPARA; HORNER *et al.*, 2003). Quando esta via é hiperativada, ocorre uma hiperfosforilação da FOXO3a, levando a hiperativação dos folículos primordiais, esgotamento precoce da reserva ovariana e falha ovariana prematura (KALICH-PHILOSOPH; RONESS; CARMELY; FISHELBARTAL *et al.*, 2013).

A via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) também está envolvida na ativação dos folículos primordiais, pois tem uma relação direta com a via PI3k/AKT1. Ela é uma via essencial para a regulação do processo de envelhecimento ovariano e também responde a sinais de fatores de crescimento (insulina/IGF-I), estresse, estado de energia, oxigênio, nutrientes, incluindo síntese proteica, lipídica e autofagia (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Quando a via mTOR é hiperativada nas células da granulosa que rodeiam os folículos primordiais, ocorre a ativação prematura de todos folículos primordiais, pois essa via acelera a diferenciação das células da granulosa que causa o gasto prematuro da reserva ovariana (ZHANG; RISAL; GORRE; BUSAYAVALASA *et al.*, 2014). Ativação da mTORC1 nas células da granulosa leva a ativação de KITL, resultando em ativação da via Pi3K/AKT/FOXO3A no oócito (ZHANG; RISAL; GORRE; BUSAYAVALASA *et al.*, 2014). A restrição calórica e rapamicina diminuem a taxa de ativação dos folículos primordiais, aumentando a vida reprodutiva (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019). Essa preservação parece ocorrer por meio da modulação da via mTOR. Por outro lado, dietas ricas em gordura aumentam a ativação dos folículos

primordiais, através de vias similares, ou seja, ativação da mTOR e da supressão da sinalização da sirtuina, fazendo com que a reserva ovariana se esgote precocemente (WANG; LUO; XU; XU *et al.*, 2014).

Neste contexto, sabe-se que no estilo de vida atual, as mulheres vêm optando cada vez mais por terem filhos tardiamente, e a obesidade está presente de forma crescente na população mundial (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*, 2016). A expectativa é de que até 2030, mais de 20% da população terá 65 anos ou mais (WEST; LYTHGOE; BARBEN; NOBLE *et al.*, 2014) e 40% da população estará obesa (FINKELSTEIN; KHAVJOU; THOMPSON; TROGDON *et al.*, 2012). Além de doenças crônicas como, diabetes mellitus, hipertensão, dislipidemia e doenças cardiovasculares, a obesidade também está associada a complicações reprodutivas e infertilidade.

2.2 Obesidade e envelhecimento

A obesidade é um importante problema de saúde pública, pois predispõe o indivíduo a uma série de doenças, estando altamente prevalente tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (FALOIA *et al.*, 2012). O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade está associado a muitas doenças crônicas, incluindo a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão e certos tipos de câncer (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006). Na obesidade, o aumento do tecido adiposo (TA), especialmente nas regiões centrais (visceral ou intra-abdominal) desencadeia um processo inflamatório crônico de baixo grau, que por sua vez, leva a resistência à insulina (SEARS & PERRY, 2015). Essa inflamação associada à resistência insulínica local pode propagar-se de forma sistêmica comprometendo a ação da insulina em outros tecidos, predispondo ao desenvolvimento de doenças crônicas e comorbidades relacionadas com a obesidade (FALOIA *et al.*, 2012).

O Tecido adiposo (TA) é um dos maiores órgãos do corpo e exerce funções importantes para o organismo na proteção mecânica, armazenamento de energia, regulação da temperatura, além de desempenhar várias funções endócrinas e imunológicas (TCHKONIA; THOMOU; ZHU; KARAGIANNIDES *et al.*, 2013). Existem dois tipos principais de tecido adiposo. O tecido adiposo

branco e o tecido adiposo marrom, cada um possui funções específicas dentro do organismo (YANG; CHEN; LU; TAN *et al.*, 2018). O tecido adiposo marrom armazena pequenas quantidades de gordura, produz calor e quando necessário mantém a temperatura corporal, já o tecido adiposo branco tem como principal função armazenar quantidades de energia em excesso na forma de triglicérides (YANG; CHEN; LU; TAN *et al.*, 2018). O TA branco também é considerado um órgão endocrinologicamente ativo que produz inúmeros hormônios e adipocinas, participa da regulação da homeostase energética, atividade do sistema nervoso, função cardiovascular, funções imunológicas e do sistema reprodutivo (BEALL; HANNA; ELLACOTT, 2017)

Com o envelhecimento ocorrem mudanças em todo organismo e no tecido adiposo não é diferente. A deposição desse tecido migra da periferia para uma área mais central, principalmente nas vísceras (MANCUSO; BOUCHARD, 2019), o que contribui para o aumento do risco de doenças metabólicas. O envelhecimento assim como a obesidade está associado a um aumento de citocinas pró-inflamatórias, que são conhecidas por interferirem na sinalização da insulina, levando ao aumento na resistência à insulina (TONET; KARNIKOWSKI; MORAES; GOMES *et al.*, 2008). O acúmulo de gordura visceral com a idade leva a um aumento dessas citocinas pró-inflamatórias (SEPE; TCHKONIA; THOMOU; ZAMBONI *et al.*, 2011). A inflamação é um processo que está presente no envelhecimento e na obesidade (KENNEDY; BERGER; BRUNET; CAMPISI *et al.*, 2014) e traz consigo uma carga de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL1, IL6, IL8 e acúmulo de macrófagos no TA (MINCIULLO; CATALANO; MANDRAFFINO; CASCIARO *et al.*, 2016).

Durante o processo de envelhecimento é observada uma ineficiência bioenergética mitocondrial, similar ao que ocorre durante a obesidade com o consumo excessivo de nutrientes (SALVESTRINI; SELL; LORENZINI, 2019). Estudos com roedores mostraram que a obesidade induz a redução na biogênese mitocondrial e que a capacidade oxidativa mitocondrial é diminuída em adipócitos (DE MELLO *et al.*, 2018). Em humanos obesos, a biogênese mitocondrial diminuída está relacionada com inflamação de baixo grau e alterações metabólicas que resultam em resistência à insulina (SALVESTRINI; SELL; LORENZINI, 2019). Assim, claramente a obesidade parece acelerar

vários impactos negativos do envelhecimento no nosso organismo e mais estudos tentando entender essa associação são necessários, pois parecem existir importantes ligações entre a inflamação e o envelhecimento reprodutivo feminino.

2.3 Senescência celular

A senescência celular é definida como uma resposta celular que limita a divisão de células envelhecidas ou danificadas (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014). A senescência exerce papéis fisiológicos durante o desenvolvimento normal e é essencial para a homeostase tecidual (MCHUGH; GIL, 2018). Trata-se de um processo que é projetado principalmente para eliminar células indesejadas através do recrutamento de células imunes, induzindo remodelação do tecido, em resposta ao estresse desencadeado por danos associados ao envelhecimento, como a instabilidade genômica e o desgaste dos telômeros, que são sinais específicos do envelhecimento (MCHUGH; GIL, 2018). No entanto, o acúmulo crônico de células senescentes que ocorre com o avançar da idade, resulta em potenciais efeitos prejudiciais à saúde como doenças relacionadas à idade (SUN; YOULE; FINKEL, 2016).

Como mencionado anteriormente, a senescência celular é um estado induzido pelo estresse de parada estável do crescimento, que está fortemente associada ao envelhecimento, porém também presente na obesidade. A senescência parece ser um mecanismo central de doenças relacionadas à idade, mas pode ser ativada de forma prematura pelos mediadores da obesidade (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*). Sabe-se que a obesidade causa estresse oxidativo e inflamação (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*), e com isso pode aumentar de forma progressiva o encurtamento de telômeros que é um marcador biológico do envelhecimento (MORENO-NAVARRETE; ORTEGA; SABATER; RICART *et al.*, 2010). O comprimento dos telômeros também foi inversamente associado à leptina (VALDES; ANDREW; GARDNER; KIMURA *et al.*, 2005), visto que essa adipocina pode contribuir para um maior estresse oxidativo e um estado inflamatório. A obesidade não apenas contribui para o aparecimento de desordens metabólicas, mas também afeta os processos a nível celular de

maneira semelhante ao envelhecimento, dessa forma acelerando-o (AHIMA, 2009).

A senescência das células adiposas regula de forma negativa a adipogênese, através de mecanismos autônomos que afetam as células vizinhas por meio do SASP (PALMER; GUSTAFSON; KIRKLAND; SMITH, 2019). Uma vez formada, as células senescentes podem contribuir para um maior estado inflamatório e estresse oxidativo do tecido, causando resistência à insulina através da secreção de SASP constituído por metaloproteínases (MMP-1, MMP-3, MMP-10), citocinas (IL-6,IL-8) e fatores de crescimento (IGFBPs) dentre outros (JAN; CERVERA; MAACHI; BAUDRIMONT *et al.*). Na obesidade as células senescentes contribuem para que os macrófagos sejam atraídos a migrar para o tecido adiposo visceral. Em camundongos obesos com idade avançada há uma quantidade consideravelmente maior de células senescentes quando comparado a animais selvagens da mesma idade (PALMER; XU; ZHU; PIRTSKHALAVA *et al.*, 2019). Desta maneira, podemos entender que a obesidade acelera a senescência celular e seus impactos negativos no organismo.

Uma classe de medicamentos relativamente nova, as drogas senolíticas, são capazes de remover de forma seletiva as células senescentes do organismo, retardando o envelhecimento, e seus sintomas (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND *et al.*, 2018). Dentre os senolíticos que estão sendo mais estudados no momento, estão o dasatinib e a quercetina (D+Q) (ZHU; XU; YANG; LI, 2009), que são muito eficazes na remoção de alguns tipos de células senescentes (ZHU; XU; YANG; LI, 2009). A quercetina é um dos principais bioflavonóides que estão presentes na dieta humana, já o dasatinib, é um inibidor de múltiplas tirosinas quinases, utilizado em tratamentos oncológicos (MONTERO; SEOANE; OCANA; PANDIELLA, 2011). Estudo recente identificou que, em camundongos, o tratamento com a combinação dessas drogas (D+Q) reduziu de forma seletiva o número de células senescentes e sintomas que são característicos do envelhecimento, aumentando a longevidade desses animais (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND *et al.*, 2018). Outro estudo testou estes compostos senolíticos em humanos, pacientes com fibrose pulmonar idiopática, observando redução de sintomas após 3 semanas de tratamento (JUSTICE *et al.* 2019). Existem outros

senolíticos que vem demonstrando resultados benéficos, como por exemplo, a Fisetina que também é um flavonóide natural encontrado em muitas frutas e vegetais, e pode induzir apoptose em células senescentes (ZHU *et al.*, 2020).

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). Em animais obesos que possuem uma alta carga de células senescentes, aumentando o ambiente pró-inflamatório, esses animais quando tratados com senolíticos foi possível observar uma depuração das células senescentes, junto com uma melhora na disfunção metabólica relacionada à obesidade e suas complicações (PALMER *et al.* 2019). Assim fica claro que os senolíticos D+Q tem uma importância no tratamento das comorbidades associadas à obesidade e idade.

2.4 Leptina e Camundongos ob/ob

A Leptina é um hormônio proteico produzido principalmente pelos adipócitos que regula o apetite de acordo com os níveis de tecido adiposo (AHIMA; DUSHAY; FLIER; PRABAKARAN *et al.*, 1997; MCMINN; LIU; LIU; DRAGATIS *et al.*, 2005). A leptina sinaliza o estado nutricional do corpo para o cérebro. Sua ação se dá de acordo com as condições fisiológicas, ou seja, em condições fisiológicas normais os níveis séricos de leptina são liberados de acordo com a quantidade de massa gorda e sinaliza estado nutricional ideal. Quando ocorre uma má nutrição, resulta em um baixo nível de leptina sérica que se torna um sinal metabólico grave para a fome promovendo aumento do apetite e a busca por alimentos (AHIMA; SAPER; FLIER; ELMQUIST, 2000) (FLIER, 1998). A leptina sérica também é um importante sinal para os processos reprodutivos. Quando ocorre hiperleptinemia pode ocorrer maturação reprodutiva precoce, que se for prolongada pode levar a disfunção ovulatória (GOSMAN; KATCHER; LEGRO, 2006). Por outro lado, baixos níveis de leptina estão associados ao atraso ou a falta da puberdade (EGAN; INGLIS; ANDERSON, 2017). Assim, fica claro que a leptina é permissiva para o sistema reprodutivo de animais normais (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*,

1996), mas não é o iniciador ou o único mecanismo pelo qual a puberdade acontece.

O receptor de leptina está presente nas células da granulosa, teca, intersticial e *cumulus oophorus* no ovário (CIOFFI; VAN BLERKOM; ANTCZAK; SHAFER *et al.*, 1997), com maior presença nas células da teca (RYAN; WOODHOUSE; VAN DER HOEK; GILCHRIST *et al.*, 2002). Porém é no hipotálamo que os receptores de leptina são abundantemente expressos (ELMQUIST; BJORBAEK; AHIMA; FLIER *et al.*, 1998) (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Já a leptina é encontrada na maioria dos tipos de células do ovário de roedores e seres humanos (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*). Em camundongos foi encontrado níveis mais altos de leptina nos oócitos em todas as fases de desenvolvimento folicular, com menor quantidade na granulosa, estroma, teca e corpos lúteos (RYAN; WOODHOUSE; VAN DER HOEK; GILCHRIST *et al.*, 2002), portanto, sugere-se que a leptina possa induzir a produção de outro fator, possivelmente através de células tecais, que pode atuar direta ou indiretamente no oócito ativando a reserva ovariana.

A fisiologia reprodutiva feminina é uma complexa sinalização neuroendócrina e endócrina que envolve o hipotálamo, hipófise e os ovários (ROJAS *et al.*, 2015). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é regulador chave do eixo reprodutivo, sua secreção pulsátil determina o padrão de secreção de duas das gonadotrofinas na hipófise, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (MARQUES *et al.*, 2000). Esses hormônios agem nos ovários de forma a estimular o crescimento folicular o que resulta na produção de estradiol, e após a ovulação, progesterona (MARQUES *et al.*, 2000). Sabe-se que a leptina e o GnRH estão intimamente ligados com a infertilidade, porém seu mecanismo não está bem elucidado, visto que a leptina atua diretamente no hipotálamo para estimular a secreção de GnRH (WATANOBE, 2002). A leptina tem efeitos locais nas gônadas, onde a hiperleptinemia suprime a esteroidogênese e afeta potencialmente a maturação dos gametas (SMITH; JACKSON; FOSTER, 2002). Quando o GnRH é administrado de forma isolada, não é capaz de recuperar completamente a foliculogênese e a ovulação de animais *ob/ob*, sugerindo que os níveis basais de leptina são necessários para que ocorra a ovulação (OLATINWO *et al.*, 2005). Com níveis fisiológicos normais, a

suplementação de leptina aumentou a capacidade dos oócitos de folículos pré-ovulatórios de retornar a meiose em todas as concentrações de tratamento com leptina quando comparado com folículos do grupo controle em cultivo celular (RYAN; WOODHOUSE; VAN DER HOEK; GILCHRIST *et al.*, 2002). A suplementação com leptina também aumentou a produção de estrogênio induzida por LH em células da granulosa de humanos (KITAWAKI *et al.*, 1999) e a produção de estrogênio e progesterona na cultura ovariana *in vitro* de camundongos (SWAIN *et al.*, 2004). Ou seja, a leptina apresenta um sinal crítico que sinaliza as reservas de energia ao eixo reprodutivo, e pode, portanto, ser um fator essencial que determina o momento da puberdade (AHIMA; DUSHAY; FLIER; PRABAKARAN *et al.*, 1997). Existem estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugerindo que a leptina age de forma direta na função ovariana, no entanto as doses de leptina empregada são questionáveis devido aos altos níveis da mesma (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996) (CHEHAB; LIM; LU, 1996).

O camundongo modelo *ob/ob* deficiente em leptina tem uma mutação do gene *ob* (DREL; MASHTALIR; ILNYTSKA; SHIN *et al.*, 2006), e constituem uma importante ferramenta para estudos de obesidade e comorbidades associadas. Camundongos *ob/ob* 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, sendo o tempo médio de vida de 27 e 18 meses para camundongos selvagens e *ob/ob*, respectivamente (REN; DONG; CAI; ZHAO *et al.*, 2010). Esse modelo experimental apresenta anovulação e menor peso gonadal em machos e fêmeas, associado à diminuição da liberação de gonadotrofinas que afetam a ovulação (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996).

Embora esses animais tenham a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal prejudicada, tornando-os inférteis, devido uma diminuição de hormônios reprodutivos, a fertilidade destes animais é restaurada quando suplementados com 50µg de leptina exógena duas vezes ao dia, via intraperitoneal (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996), ou quando feito transplante com 1g de tecido adiposo de camundongos selvagens da

mesma ninhada e do mesmo sexo (TREFF; KRISHER; TAO; GARNSEY *et al.*). Três semanas após a cirurgia os animais já podem ser acasalados e tem vida reprodutiva normal com partos mensais, com média de oito filhotes por ninhada (BARROS; ALMEIDA; MORI; VALERO *et al.*, 2009). O transplante de tecido adiposo restaura de maneira estável a fertilidade de camundongos *ob/ob* por um período de pelo menos um ano (BARROS; ALMEIDA; MORI; VALERO *et al.*, 2009).

Entretanto, a caracterização da reserva ovariana desse modelo experimental é escassa na literatura. Sabe-se que a obesidade prejudica a função do ovário, tanto que os camundongos *ob/ob* tem número reduzido de corpos lúteos, além de uma maior atresia folicular e apoptose (CABELLO; GARRIDO; MORAN; GONZALEZ DEL REY *et al.*, 2015), folículos pré-antrais e antrais com oócitos deformados (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* mostraram sinais precoces de apoptose em oócitos de animais *ob/ob*, sugerindo que o estresse oxidativo prejudica a função mitocondrial resultando em apoptose oócitaria (HOU; ZHU; DUAN; LIU *et al.*, 2016). O número de folículos em cada estágio da foliculogênese foi subnormal em estudo com camundongos *ob/ob* de sete semanas de idade (HAMM; BHAT; THOMPSON; MANN, 2004) em comparação aos controles, com menor número de folículos primordiais e totais (HAMM; BHAT; THOMPSON; MANN, 2004). Além disso, o número de folículos primários aumentou quando a leptina foi fornecida a camundongos *ob/ob*, sugerindo um aumento na ativação de folículos primordiais (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN *et al.*, 1996). O aumento da atresia folicular encontrada nesses camundongos pode ser devido a danos mitocondriais e deformação em oócitos e camadas celulares irregulares da granulosa, que foram associados a uma sobrecarga lipídica e à formação de gotículas lipídicas no tecido ovariano (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER *et al.*, 2012). Sabe-se que a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura também acelera a ativação de folículos primordiais (WANG; LUO; XU; XU *et al.*). Além disso, mulheres obesas em idade fértil são mais propensas a ter disfunção ovulatória, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), em razão da desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPO) (DOI; TOWERS; SCOTT; AL-SHOUMER, 2005).

2.5 Associação entre longevidade e fertilidade

Existem diversos modelos animais que tem por característica uma expectativa de vida prolongada. Por exemplo, os camundongos Ames dwarf (*df/df*), com deficiência do hormônio do crescimento (MCHUGH; GIL), apresentam baixos níveis de IGF-I, além de baixa inflamação e alta sensibilidade à insulina (BARTKE, 2005). Similarmente, camundongos submetidos à RC também tem menor ganho de peso, menos gordura corporal e maior sensibilidade à insulina (BARTKE, 2005). Interessantemente, camundongos *df/df* e submetidos à RC apresentam efeitos parecidos também na reserva ovariana, com um número de folículos primordiais maior, quando comparado a um grupo controle da mesma idade reprodutiva, além da consequente diminuição no número de folículos primários, secundários e terciários (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON *et al.*, 2019; SACCON; MOREIRA; CRUZ; MONDADORI *et al.*, 2017) (SCHNEIDER; ZHI; MOREIRA; LUCIA *et al.*, 2014). Assim fica claro que intervenções que aumentam a expectativa de vida, também preservam a reserva ovariana. O envelhecimento e a obesidade parecem estar sobrepostos em seus impactos nas mitocôndrias, contribuindo para aumento da inflamação e resistência à insulina (SALVESTRINI; SELL; LORENZINI, 2019). Estudo com animais nocaute para IL-1, realizado com fêmeas de idade avançada, demonstrou uma preservação da reserva ovariana, uma maior taxa de prenhez, e maior tamanho da ninhada em relação a fêmeas do grupo controle (URI-BELAPOLSKY; SHAISH; ELIYAHU; GROSSMAN *et al.*, 2014). A IL-1 é uma molécula de extrema importância no sistema imunológico inato (SIMS; SMITH, 2010), expressa no ovário (GERARD; CAILLAUD; MARTORIATI; GOUDET *et al.*, 2004), tem capacidade de induzir a expressão de inúmeros genes pró-inflamatórios (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010), mostrando a sua real importância na associação entre a inflamação e o envelhecimento reprodutivo, sugerindo que a inflamação pode afetar a ativação dos folículos.

Desta maneira, esperamos um efeito contrário em camundongos *ob/ob*, que são obesos crônicos, com alta inflamação, resistentes à insulina e com longevidade reduzida. Toda a literatura em outros modelos indica que deve haver uma depleção muito mais acelerada da reserva ovariana. No entanto a

literatura é escassa quanto a caracterização da reserva ovariana desses animais, menos ainda em relação a presença de células senescentes nos ovários desses animais.

3 Objetivos e Metas

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a reserva ovariana e modular senescência celular em camundongos geneticamente obesos.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar a reserva ovariana e presença de células senescentes em ovários de camundongos ob/ob e WT;
- Caracterizar a reserva ovariana e células senescentes em camundongos ob/ob submetidas ao tratamento com senolíticos (dasatinib + quercetina).

4 Materiais e métodos

4.1 Animais e desenho experimental

Os dois experimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação animal, experimento 1, número 3715-2014, experimento 2, número 24915-2020. 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 e gordura periovariana 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 e gordura periovariana. Um dos ovários e a gordura periovariana de ambos experimentos foram armazenados em formol 10% para análise histológica, e o outro ovário para expressão gênica foi armazenado no ultra freezer. 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 ± 2 °C), umidade (40-70%) e fotoperíodo (12h claro/escuro).

4.2 Teste de tolerância à insulina

Nos animais do experimento 2, aos 6 meses de idade foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI). Após jejum de 2 horas, com água *ad libitum*, foi mensurada a glicemia basal e, posteriormente, administrada insulina humana Novolin R® (5 UI/Kg de peso vivo) (SREEJAYAN *et al.*, 2008) via intraperitoneal. A glicemia foi medida por meio de uma gota de sangue da veia

caudal dos animais, nos tempos 0, 5, 20, 35 e 60 minutos após as injeções, com auxílio de glicosímetro comercial Accu-Chek Performa (ROCHE).

4.3 Análise histológica

Para ambos experimentos os ovários e a gordura periovariana foram retirados do formol tamponado 10%, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. As peças emblocadas em paraplast foram sequencialmente cortados no micrótomo semiautomático leica modelo RM2245 (Leica biosystems newcastle Ltda., Newcastle, UK) a uma espessura de 5µm. Alguns cortes de gordura periovariana foram colocados em lâminas histológicas para análises de sudan black e imunofluorescência. Todo ovário foi cortado e utilizado, foram selecionados 1 a cada 6 cortes e colocados em lâminas histológicas padrão. As lâminas, após secagem na estufa a 56°C por 24 horas, foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas e Enthellan (Sigma chemical company®, St. Louis, MO, EUA). As imagens dos cortes ovarianos e da gordura periovariana foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon corporation, Japan), utilizando objetivas de 4, 10 e 40x. A quantificação dos folículos se deu por aqueles que apresentassem o núcleo dos oócitos claramente visível. A quantidade final de folículos foi multiplicada duas vezes, mimetizando a quantidade de folículos dos dois ovários e foi multiplicada por seis para contabilizar a amostragem por seção.

Os folículos foram classificados da seguinte forma: folículo primordial aquele em que o oócito é rodeado por uma única camada de células da granulosa achatada; folículo em transição foi classificado como aquele em que ao menos uma célula da granulosa tem formato cuboide; folículo primário foi classificado como aquele em que um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa em formato cuboide; folículo secundário quando rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboides, sem antro visível; folículo terciário se um espaço antral estiver claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa em torno do oócito (PETERS, 1969) (MYERS; BRITT; WREFORD; EBLING *et al.*, 2004).

4.4 Análise da expressão gênica

O RNA total das amostras de ovário foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do RNA foi mensurada através de espectrofotômetro (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc.[®], Waltham, MA, EUA). A razão A260/A280 foi utilizada como indicativo de qualidade. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA utilizando kit comercial (iScript cDNA synthesis Kit, BIORAD[®], Hercules, CA, EUA). A reação foi conduzida em termociclador (MyCycle Thermo Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) com as seguintes temperaturas: 25°C por 5 minutos, 42°C por 20 minutos e 95°C por 1 minuto.

A reação de PCR em tempo real foi conduzida em duplicata, usando 4 µL de cDNA (20 ng), 5 µL de GoTaq (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, Madison, USA), 0.75 µL de cada primer (5 µM) e 4.5 µL de água ultra pura, no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). Para cada ensaio foram corridos 45 ciclos (95°C for 15 seg and 60°C for 1 min). Ao final de cada reação foi incluída uma curva de dissociação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. Foram avaliados como controles endógenos os genes *Gapdh* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *β2m* (Beta-2 microglobulin), *Actb* (Actin beta) and *Ppia* (Peptidylprolyl isomerase A). De acordo com resultados do software geNorm (Vandesonpele, 2002), o gene *β2m* foi o que apresentou maior estabilidade nos animais de 6 meses e de 12 meses.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene *β2m* na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene *β2m* na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle foram ponderados, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo controle (*fold change*) (MASTERNAK et al., 2005). Dessa forma, foi avaliada a expressão

relativa dos genes alvo separadamente, nos animais do experimento 1 (WT X *ob/ob*) e do experimento 2 (*ob/ob* controle X *ob/ob* tratadas).

Foram analisados os genes relacionados à reserva ovariana: hormônio anti-mulleriano (*Amh*). Genes relacionados a senescência celular: fator de diferenciação de crescimento 15 (*Gdf15*), inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (*p16^{INK4A}/CDKN2*), Metalopeptidase de matriz 12 (*Mmp12*), Ligand 2 da quimiocina (*Ccl2*), Tumor de proteína p53 (*TrpP53*), interleucina 1 alfa, (*IL-1a*), Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (*P21/cdkn1a*), Sestrin-2 (*Sesn2*), stanniocalcina-1 (*STC1*). A sequência de primers dos genes analisados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Pares de primers (*forward* e *reverse*) utilizados no experimento.

| Gene | Primers | Tamanho | Código |
|---|---|---------|----------------|
| β-2-Microglobulina (β2m) | F: AAGTATACTCACGCCACCCA R: CAGGCGTATGTATCAGTCTC | 217 | NM_00935.3 |
| Hormônio anti-mulleriano (Amh) | F:TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATG R: CAGGTGGAGGCTCTTGAACT | 66 | XM_006513119.3 |
| fator de diferenciação de crescimento 15 (Gdf-15) | F: GAGCTACGGGGTCGCTTC R: GGGACCCCAATCTCACCT | 130 | NM_001330687.1 |
| inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (p16 ^{INK4A} /CDKN2) | F: CCAACGCCCGAACT R: GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA | 79 | NM_001040654.1 |
| Metalopeptidase de matriz 12 (Mmp12) | F: GAGTCCAGCCACCAACATTAC R: GCGAAGTGGGTCAAAGACAG | 232 | NM_001320076.1 |
| ligand 2 da quimiocina (CCL2) | F: GAAGCCAGCTCTCTTCTCCTC R: TTGCTGGTGAATGAGTAGCAG | 150 | NM_011333.3 |
| Tumor de proteína p53 (TrpP53) | F: CCCCTGTATCTTTTGTCCCT R: AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG | 137 | NM_011640.3 |
| Interleucina 1 alfa (IL-1a) | F: GAGTCGGCAAAGAAATCAAGATG R: CAATGGCAGAACTGTAGTCTTCGT | 96 | NM_010554.4 |
| Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (P21/CDKN1A) | F: AAGTGTGCCGTTGTCTCTTC R: AGTCAAAGTTCCACCGTTCTC | 111 | NM_001111099.2 |
| Stanniocalcina-1(Stc1) | F: CTACTTTCCAGAGGATGATCGC R: ACTTCAGTGATGGCTTCCGG | 100 | NM_009285.3 |

4.5 Sudan black

Foi realizado o teste de coloração de lipofuscina com o corante sudan black em lâminas histológicas com cortes de ovário e tecido adiposo periovariano. O protocolo utilizado foi ajustado de (EVANGELOU *et al.*, 2017). As lâminas histológicas do tecido ovariano e gordura periovariana foram desparafinizadas com xilol, lavadas em gradiente de álcool etílico até chegar ao álcool 70% e reidratadas com água. Após diluir o sudan black em álcool etílico 70% evitando a sua precipitação, foi utilizada uma seringa de 10ml com filtro disco para gotejar sudan black em uma lâmina comum limpa e a lâmina contendo os cortes foi invertida sobre o sudan black por aproximadamente 2 minutos. Após o procedimento a lâmina com os cortes foi separada e imediatamente lavada com álcool etílico 50% e água destilada. As lâminas foram montadas com glicerol e em seguida observadas no microscópio de luz nas objetivas de 4, 10X. A quantidade de pixels nas imagens foi calculada utilizando o software Image J.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 8.0. O teste de t foi utilizado para as análises de variáveis com uma única medição (sudan black, contagem de folículos e expressão gênica), já o teste ANOVA de medidas repetidas foi usado para avaliar peso corporal e resposta ao TTI. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5 Resultados e Discussões

Experimento 1: Animais obesos vs selvagens aos 12 meses de idade

No experimento 1 foi avaliado a diferença entre animais obesos *ob/ob* e animais selvagens WT aos 12 meses de idade. O peso corporal (Figura 1A) e gordura periovariana (Figura 1B) foram maiores nos animais *ob/ob* quando comparado com os animais normais WT, como esperado, devido ao fenótipo desses modelos experimentais.

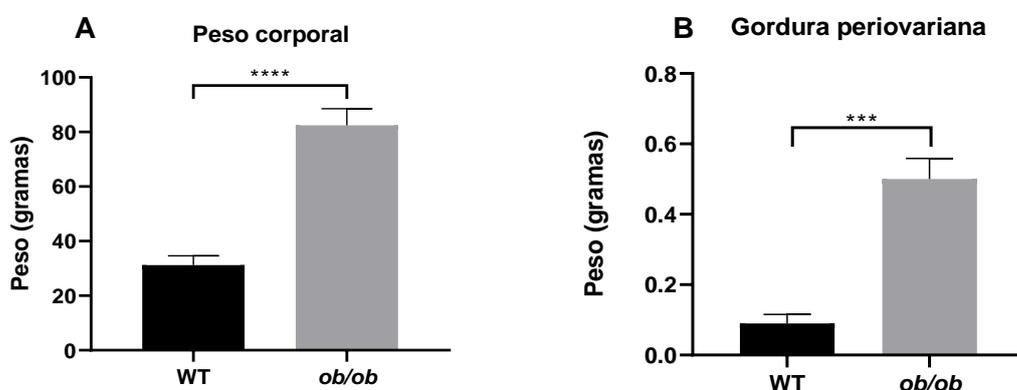


Figura 1. Peso corporal (A) peso da gordura periovariana (B) de camundongos fêmeas obesos (*ob/ob*) ou selvagens (WT) aos 12 meses de idade. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

A análise da quantidade de folículos está representada na Figura 2. Aos 12 meses de idade, camundongos *ob/ob* apresentaram reserva folicular ovariana semelhante aos camundongos selvagens da mesma idade. Havendo diferença apenas para número de folículos secundários (Figura 2D). Nenhuma diferença foi encontrada para o número de folículos primordiais (Figura 2A), de transição (Figura 2B), primários (Figura 2C), terciários (Figura 2E) e totais (Figura 2F), entre os camundongos *ob/ob* e WT.

Sabe-se que a RC sem desnutrição preserva a reserva ovariana através da diminuição da ativação dos folículos primordiais, melhorando sensibilidade à insulina, além de aumentar a expectativa de vida por meio de vias de detecção

de nutrientes que envolvem a regulação negativa de fatores como o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (GARCIA; SACCON; PRADIEE; RINCON et al., 2019; SACCON; MOREIRA; CRUZ; MONDADORI et al., 2017). Enquanto a obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica propicia efeito oposto na reserva ovariana pelas mesmas vias, acelerando o gasto da reserva ovariana (WANG; LUO; XU; XU et al., 2014). No modelo *ob/ob* a falta da leptina faz com que o consumo de alimentos aumente, uma vez que a leptina é responsável por inibir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) (BLUM, 1997). Baseado nisso, efeitos semelhantes à dieta rica em gordura e efeitos opostos ao da RC, como maior ativação dos folículos primordiais, podem ser esperados nos ovários de camundongos *ob/ob*. No entanto, o número de folículos primordiais e totais que encontramos para camundongos *ob/ob* e WT foi semelhante com dados já relatados para fêmeas magras, com idade semelhante aos animais do nosso estudo, e usando da mesma metodologia utilizada no nosso estudo (SACCON et al., 2017) (SALMINEN; KAARNIRANTA, 2012) (SCHNEIDER et al., 2017).

Como a literatura é escassa em relação a caracterização da reserva ovariana do modelo *ob/ob* de idade mais avançada, nesse estudo um de nossos objetivos foi realizar a caracterização da reserva desse modelo de obesidade. No entanto, nossos resultados não corroboram com os dados encontrados para fêmeas *ob/ob* jovens, uma vez que foram encontradas diferenças na reserva ovariana dessas fêmeas *ob/ob* em comparação com as fêmeas WT de mesma idade (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER et al., 2012). Em camundongos com três meses de idade, foi encontrado um número menor de folículos pré-antrais, mas não foi encontrada diferença no número de folículos antrais para as fêmeas *ob/ob* em comparação com o WT (SERKE; NOWICKI; KOSACKA; SCHRODER et al., 2012), embora este estudo não tenha definido se a diferença estava no número de folículos primordiais, primários ou secundários. Em outro estudo realizado com fêmeas *ob/ob* ainda mais jovens (sete semanas), foi encontrado um número menor de folículos primordiais e totais em comparação com o WT (HAMM; BHAT; THOMPSON; MANN, 2004). Entretanto, em ambos os estudos, os autores usaram uma metodologia de contagem folicular diferente e animais bem jovens. Portanto, as divergências podem ser devidas às diferentes metodologias aplicadas, e

também atribuídas a idade das fêmeas. Outra explicação poderia ser que a falta de leptina tem alguns efeitos no número de folículos primordiais, mas, como esses efeitos são leves, a diferença entre os camundongos *ob/ob* e WT desaparece com a idade, uma vez que o tamanho da reserva diminui significativamente nos dois grupos com a idade.

A quantidade de folículos secundários foi maior em camundongos *ob/ob* comparado com os animais WT. Isto se deve provavelmente a uma maior taxa de atresia e apoptose nos folículos mais avançados que são encontrados nesses animais (SWAIN et al., 2004) (HAMM; BHAT; THOMPSON; MANN, 2004). Houve um tendência de severa redução na quantidade de folículos terciários. Isto provavelmente se deve a deficiência na secreção de GnRH, LH e FSH que é essencial para suportar o crescimento saudável desse grupo de folículos (BARASH; CHEUNG; WEIGLE; REN et al., 1996).

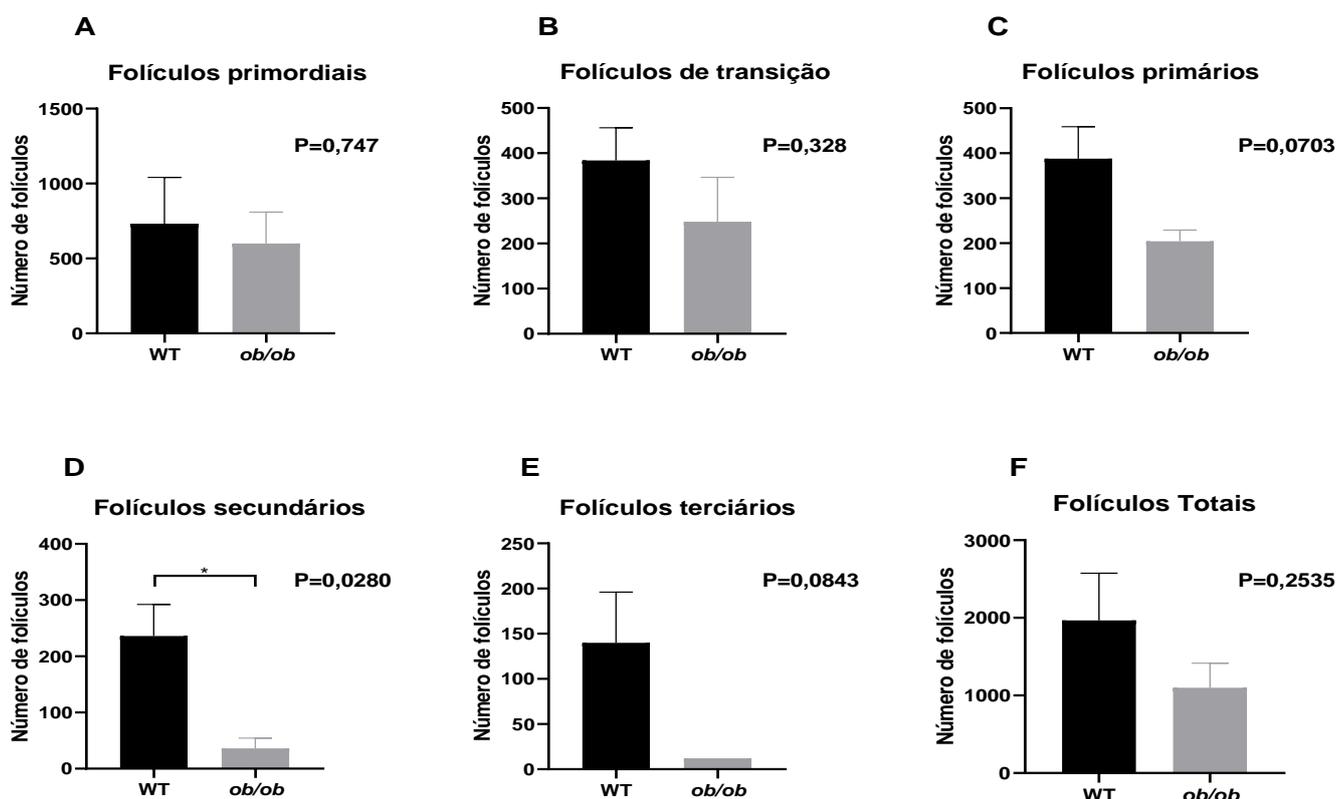


Figura 2. Quantidade média de folículos em diferentes estágios de crescimento em animais obesos (*ob/ob*) ou selvagens (WT) aos 12 meses de idade. Valores de $P < 0,05$

foram considerados significativos. Valores foram representados como média \pm erro padrão.

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 3A). 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.

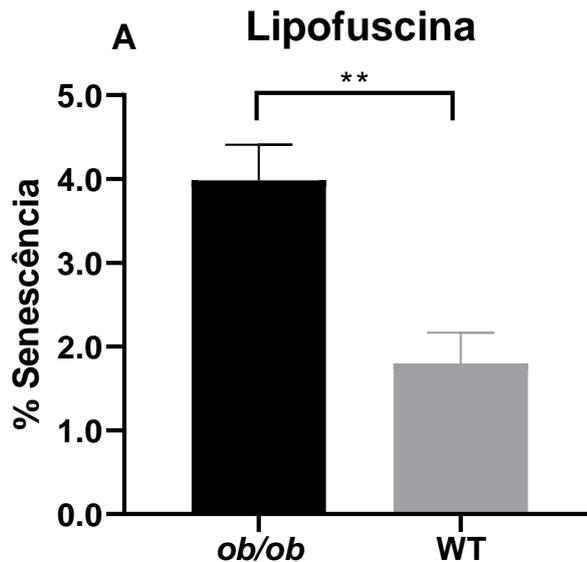


Figura 3. Porcentagem da área ovariana com marcação de lipofuscina (em % de pixels) feita com corante sudan black em fêmeas obesas (*ob/ob*) e magras (WT) aos 12 meses de idade. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos

Os gráficos da análise da expressão gênica estão representados na Figura 4. Não houve regulação em nível de expressão gênica do gene marcador relacionado à reserva ovariana *Amh* ($P = 0,2936$) Figura 4C, como esperado visto que é um marcador de diferenças no tamanho da reserva ovariana. Também não houve regulação em nível de expressão gênica dos genes marcadores de senescência analisados: *Ccl2* ($P = 0,2084$), *Stc1* ($P = 0,5745$), *Il1-a* ($P = 0,6489$), *Gdf-15* ($P = 0,2462$), *Trp53* ($P = 0,5186$), *Mmp12* ($P = 0,2739$), *P21* ($P = 0,4856$) e *Cddkn2* ($P = 0,1528$) (Figura 4A, B, D, E, F, G, H, I).

Uma característica fundamental da senescência celular é o surgimento do fenótipo secretor associado à senescência (SASP), que representa uma fonte considerável de sinais inflamatórios e de remodelação tecidual (LOPEZ-OTIN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Apesar de encontrarmos diferença na quantidade de senescência celular no grupo das fêmeas obesas através da técnica de sudan black, não encontramos diferença na expressão em nenhum dos genes testados. No entanto, estudo recente

determinou um compilado de fatores SASP bem estabelecidos para determinar a expressão em diversos tecidos de camundongos de diferentes idades, observaram uma diferença acentuada nos perfis de expressão dos diferentes tecidos (HUDGINS *et al.*, 2018). Não existe nenhum dado na literatura de senescência e qual o perfil de expressão de fatores SASP no ovário. Dessa maneira, são necessários mais estudos para que se possa caracterizar plenamente quais são os melhores marcadores de senescência para o ovário, visto que estudos demonstraram que existe uma grande diferença nos perfis de expressão, nos diferentes tecidos durante o processo de envelhecimento, a fim de estabelecer biomarcadores robustos de senescência celular em camundongos. Uma outra consideração importante é a respeito da limitação do uso da análise de expressão gênica, pois nem sempre a quantidade de mRNA refletirá na quantidade de proteína produzida e muitas vezes, mesmo com uma menor quantidade de mRNA, a quantidade de proteína pode ser maior, enquanto que uma superexpressão de determinado gene pode não refletir em uma maior quantidade de proteína.

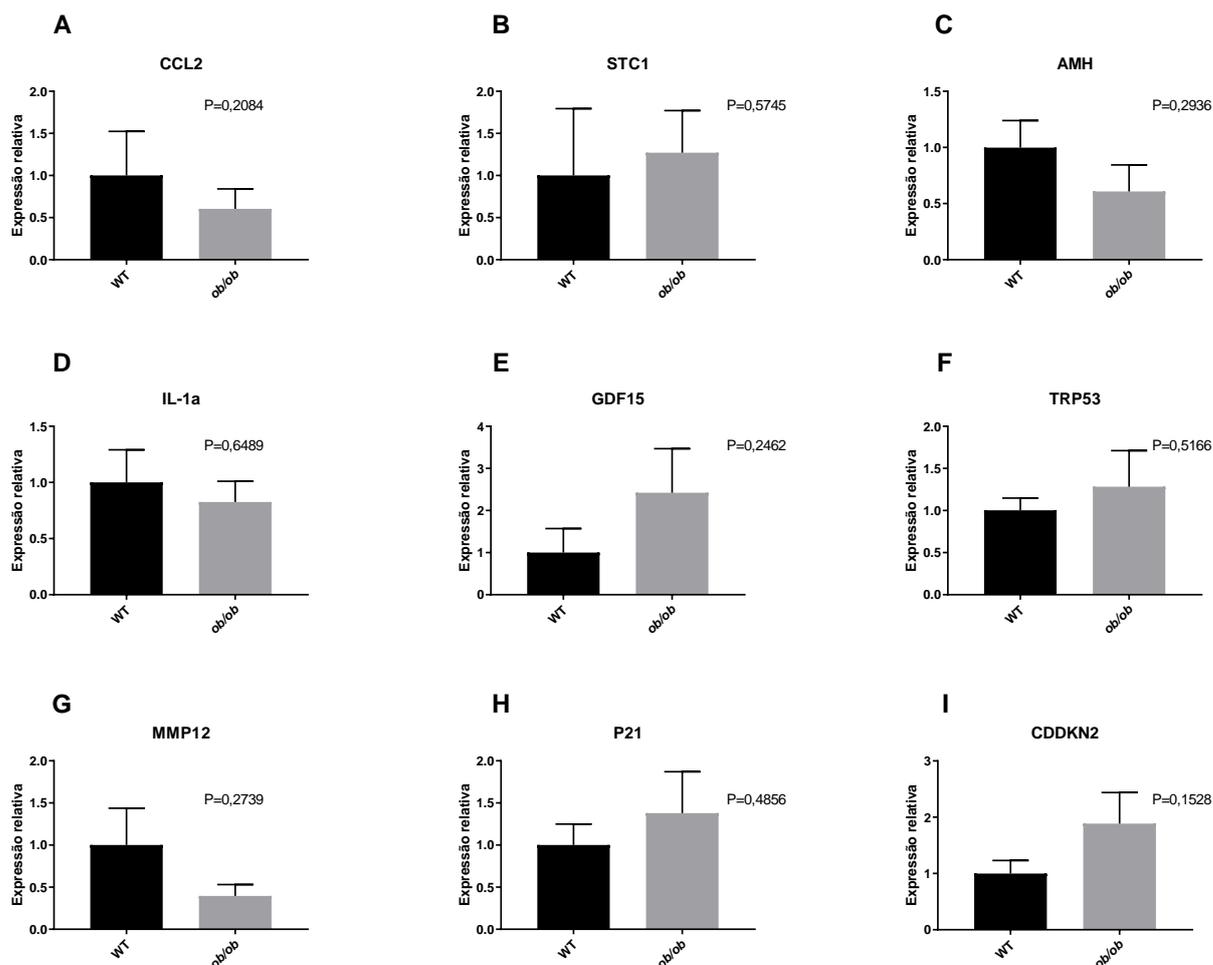


Figura 4. Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos. (A) Ligand 2 da quimiocina (CCL2), (B) Stanniocalcina-1 (Stc1), (C) Hormônio anti-mulleriano (Amh), (D) Interleucina 1 alfa (IL-1a), (E) Fator de diferenciação de crescimento 15 (Gdf-15), (F) Tumor de proteína p53 (TrpP53), (G) Metalopeptidase de matriz 12 (Mmp12), (H) Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (P21/CDKN1A), (I) inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (p16INK4A/CDKN2). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos

Experimento 2: animais obesos tratados com senolíticos aos 6 meses de idade

No experimento 2 foi avaliado o efeito de tratamento com senolíticos D+Q em animais obesos entre 2 e 6 meses de idade. A porcentagem do ganho de peso corporal (Figura 5A) foi menor no grupo D+Q quando comparado com grupo controle ($P=0,0040$), a partir da terceira semana de tratamento. O

resultado para o peso da gordura periovariana é mostrado na (Figura 5B) sendo que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos ($P=0,8359$).

Os achados de ganho de peso diferem com achados anteriores descritos na literatura. Palmer et al. (2019) mostraram que a eliminação das células senescentes não afetou o peso corporal, embora esse estudo tenha sido feito com animais (*db/db*), nocaute para o receptor de leptina. Em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com senolíticos (D+Q), demonstrou-se que o tratamento também não preveniu o ganho de peso corporal (SIERRA-RAMIREZ et al., 2020). Em ambos os estudos citados, foram utilizados camundongos machos, o que pode sugerir que existem diferenças na resposta ao senolíticos entre os sexos. As divergências nos resultados encontrados, também podem se dar pelo tempo e doses utilizadas nos tratamentos de estudos anteriores.

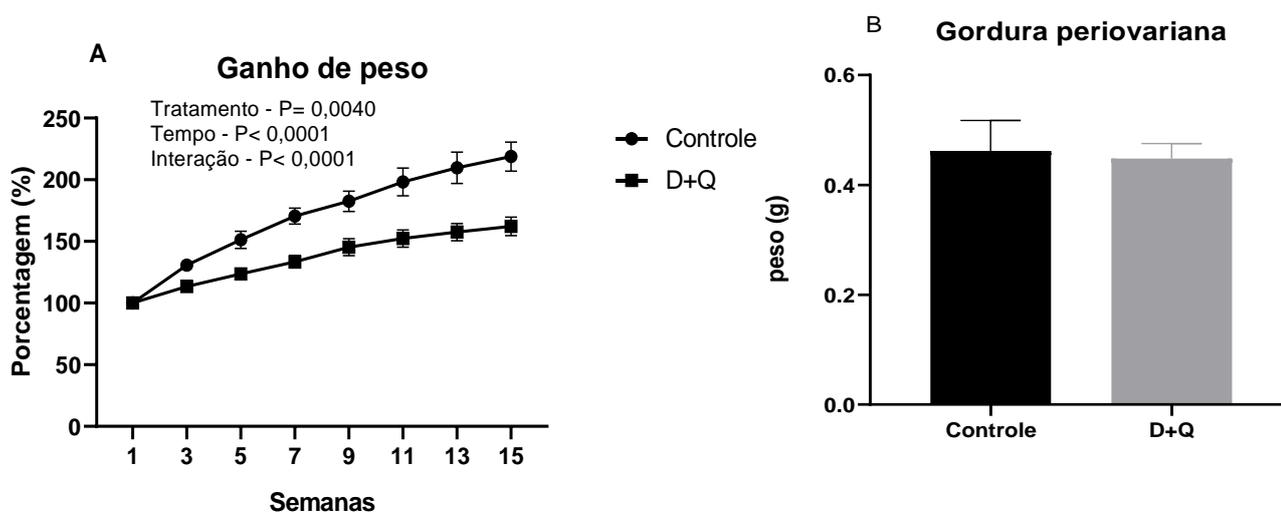


Figura 5. Porcentagem de ganho de peso corporal (A) de camundongos fêmeas *ob/ob* controle ou tratadas com dasatinib mais quercetina (D+Q). Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

O tratamento com senolíticos (D+Q) não afetou o metabolismo da glicose. O TTI realizado aos 6 meses de idade não apresentou diferença na glicemia (Figura 6A). Os achados de sensibilidade a insulina diferem com

achados anteriores de Palmer et al. (2019), onde houve um aumento da sensibilidade à insulina após o tratamento com senolíticos (D+Q). Camundongos com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica tratados com D+Q, mostraram uma melhora em sua sensibilidade à insulina durante um curto período de tempo (3 ciclos), mas esses efeitos benéficos desapareceram após 16 semanas de tratamento (SIERRA-RAMIREZ et al., 2020). Esses dados sugerem que os tratamentos crônicos com senolíticos exercem um efeito transitório na sensibilidade à insulina, que atinge o pico após várias semanas de tratamento, mas diminui com o tempo. Como no estudo citado anteriormente, após um determinado período de tratamento os benefícios na sensibilidade à insulina desaparecem, como o TTI foi realizado no final do experimento, pode ser que esse efeito possa ter sido transitório, já que houve diferença no ganho de peso desses animais tratados.

Dessa maneira, as doses de senolíticos podem ser otimizadas para aumentar seus efeitos benéficos, do ponto de vista nutricional, o uso de senolíticos para tratar a resistência à insulina deve ser acompanhado por intervenções nutricionais que reduzem a ingestão de carboidratos e gorduras. Além do que, os camundongos utilizados no estudo de Sierra-Ramirez et al. (2020) foram alimentados com dieta rica em gordura durante todo o tratamento com senolíticos. As fêmeas *ob/ob* por terem deficiência na produção da leptina, hormônio da saciedade, o que faz com que o consumo de alimentos aumente, já que a leptina é responsável por inibir a expressão do NPY, (BLUM, 1997) sendo assim, nossa hipótese é que essa sobrecarga de nutrientes, quando mantida juntamente com o tratamento, pode reduzir a eficácia dos tratamentos com senolíticos. Pesquisas futuras devem ser realizadas para ver se a combinação de senolíticos com intervenções nutricionais afetam a resposta aos senolíticos. Vale salientar que nos estudos mencionados anteriormente foram utilizados camundongos machos.

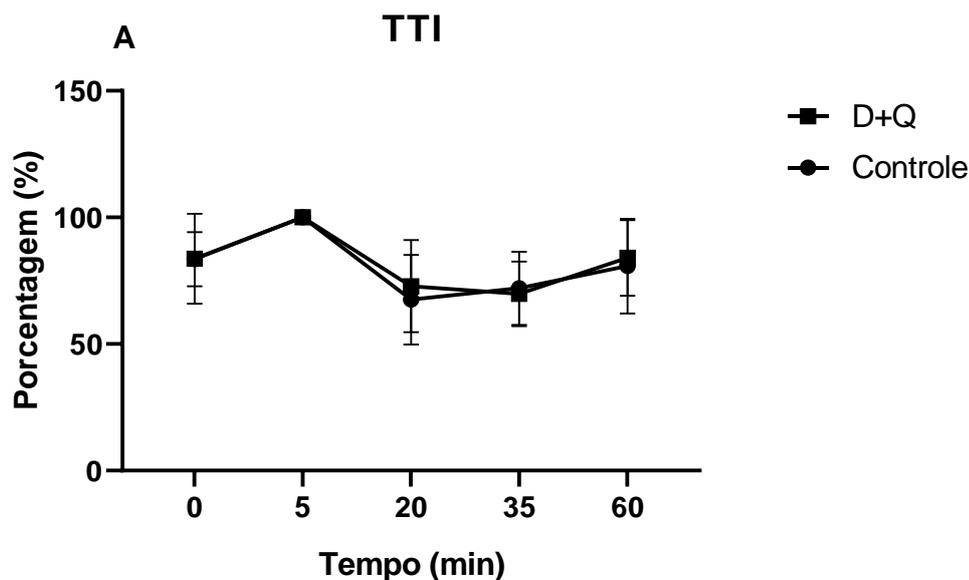


Figura 6. Teste de tolerância à insulina (TTI – A) em camundongos fêmeas *ob/ob* tratadas com senolíticos (D+Q) ou controle (grupo placebo) ao longo de 4 meses de experimento. Teste foi realizado quando as fêmeas tinham 6 meses de idade. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

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 7). 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 como já demonstrado em outros tecidos.

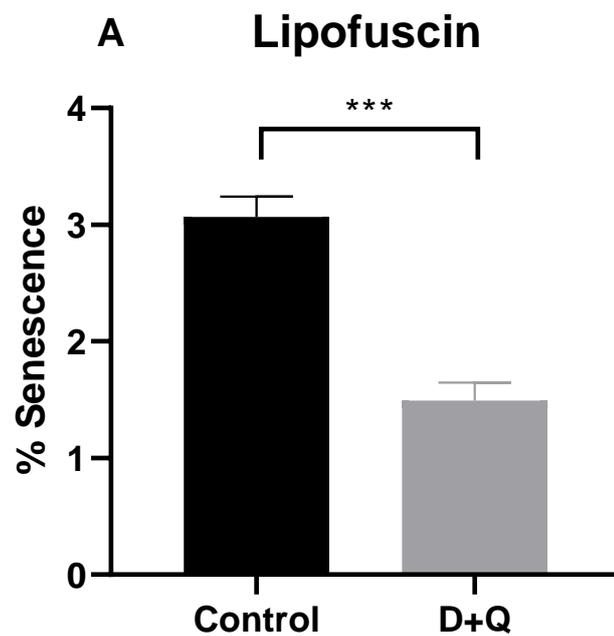
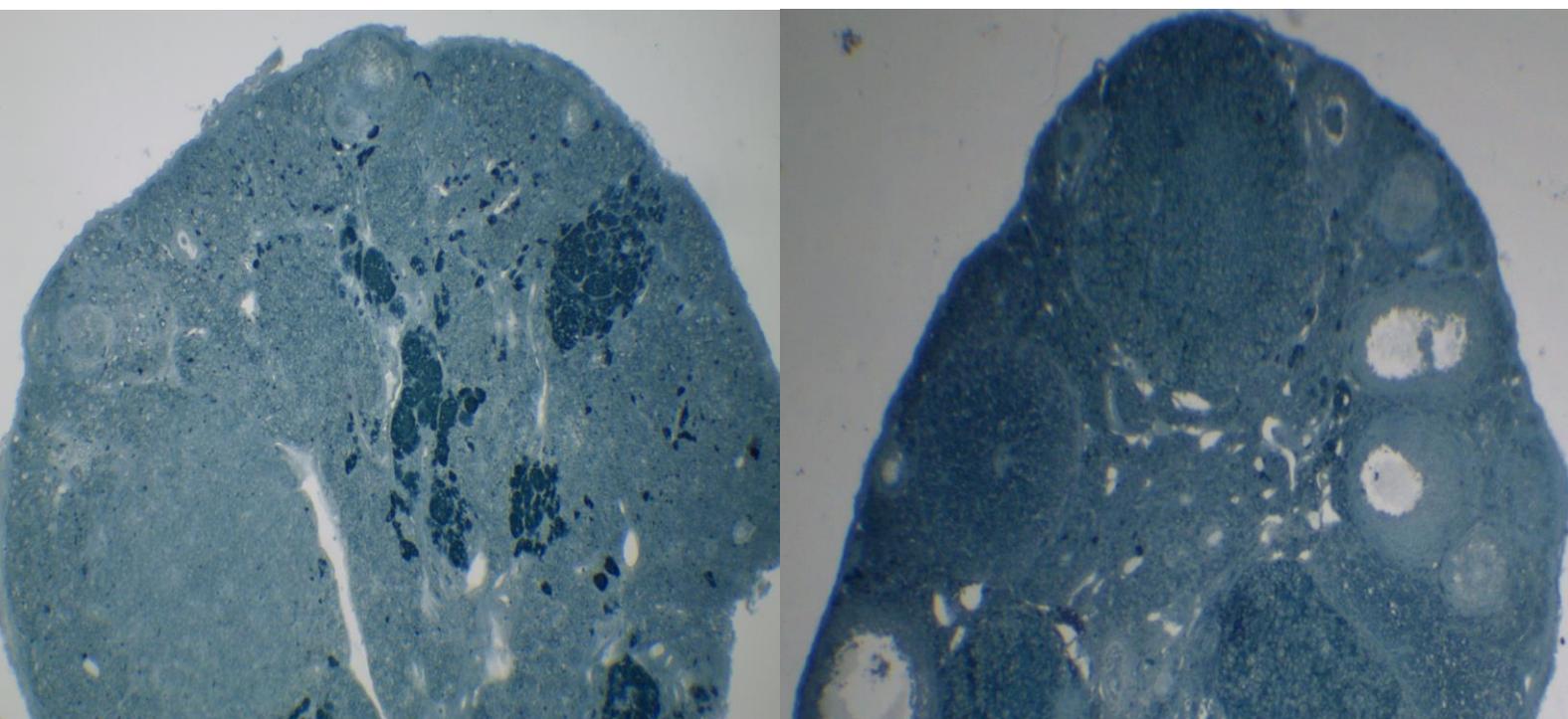


Figura 7. Porcentagem da área ovariana com marcação de lipofuscina (em % de pixels) feita com corante sudan black em fêmeas ob/ob controle e tratamento (D+Q) aos 6 meses de idade. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos



A análise da quantidade de folículos está representada na Figura 8. Ambos os grupos apresentaram reserva folicular ovariana semelhante, apesar de numericamente haver uma tendência de uma maior reserva ovariana no grupo tratamento. Nenhuma diferença foi encontrada para o número de folículos primordiais (Figura 7A), de transição (Figura 7B), primários (Figura 7C), secundários (Figura 7D), terciários (Figura 7E) e totais (Figura 7F), entre os camundongos *ob/ob* controle e tratamento. Para confirmar nossa hipótese é necessário um estudo com número maior de animais, testando mais tempos de tratamento, já que esse é um estudo preliminar composto por poucos animais por grupo, e analisado apenas por um período de tempo de tratamento. No entanto, assim como as fêmeas obesas tinham menos senescência e não tiveram alteração na reserva ovariana, é lógico que a diminuição da senescência pelo tratamento com D+Q não refletiu na reserva ovariana. Mais estudos são necessários para entender a influência da senescência na reserva ovariana, e se não há associação com esse fator se pode influenciar a qualidade dos oócitos e a fertilidade.

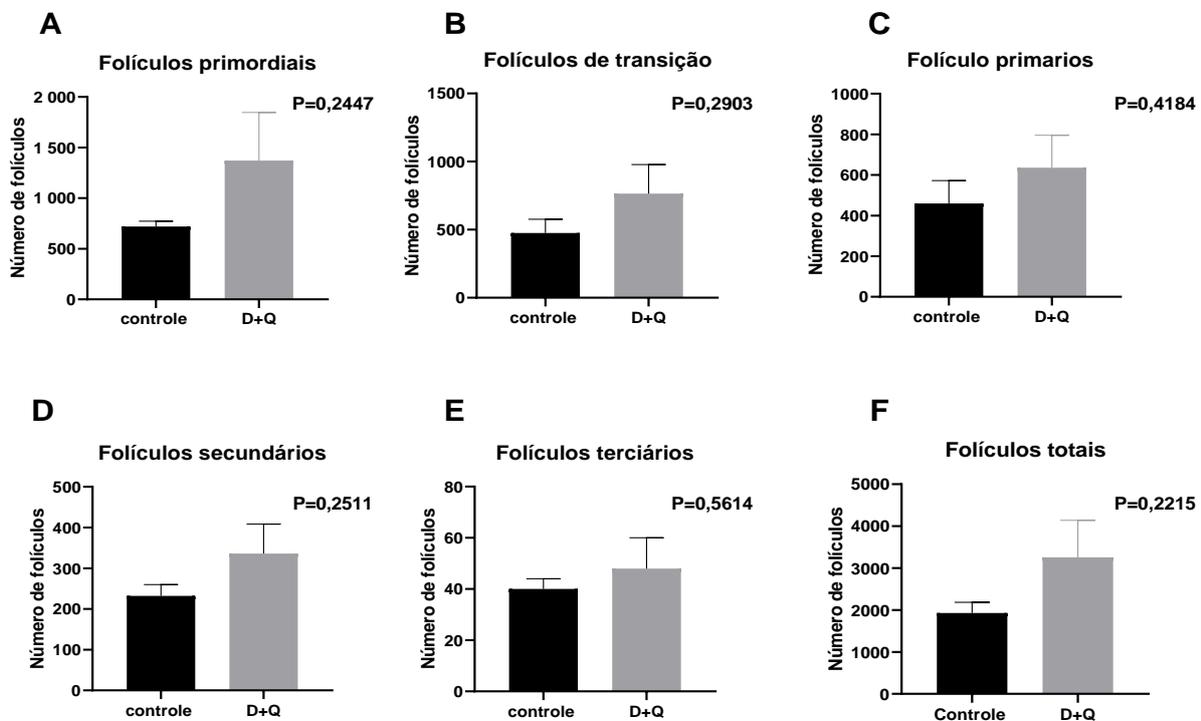


Figura 8. Análise da quantidade de folículos em diferentes estágios de crescimento de fêmeas obesas (*ob/ob*) controle ou tratadas com dasatinib mais quercetina. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Valores foram representados como média \pm erro padrão.

Os gráficos da análise da expressão gênica estão representados na Figura 9. Não houve regulação em nível de expressão gênica dos genes marcadores de senescência analisados: *Ccl2* ($P=0,2409$), *Stc1* ($P=0,4820$), *Il1-a* ($P=0,8408$), *Gdf-15* ($P=0,6634$), *Trp53* ($P=0,2806$), *Mmp12* ($P=0,6263$), *P21* ($P=0,1031$) e *Cdkn2* ($P=0,4601$) (Figura 7A, B, D, E, F, G, H, I). Também não houve regulação em nível de expressão gênica do gene marcador relacionado à reserva ovariana *Amh* ($P= 0,2873$; Figura 7C), como esperado visto que é um marcador de diferenças no tamanho da reserva ovariana. Nenhuma diferença estatística foi observada na expressão dos genes testados. Como mencionado no experimento 1, são necessários mais estudos para que se possa ter uma melhor caracterização dos melhores marcadores de senescência para o ovário, visto que estudos demonstraram que existe uma grande diferença nos perfis de expressão, nos diferentes tecidos durante o processo de envelhecimento assim como na obesidade. Também deve ser levado em consideração que temos diversas estruturas celulares nos ovários e que a expressão gênica de maneira geral pode não captar diferenças na expressão de tipos celulares específicos.

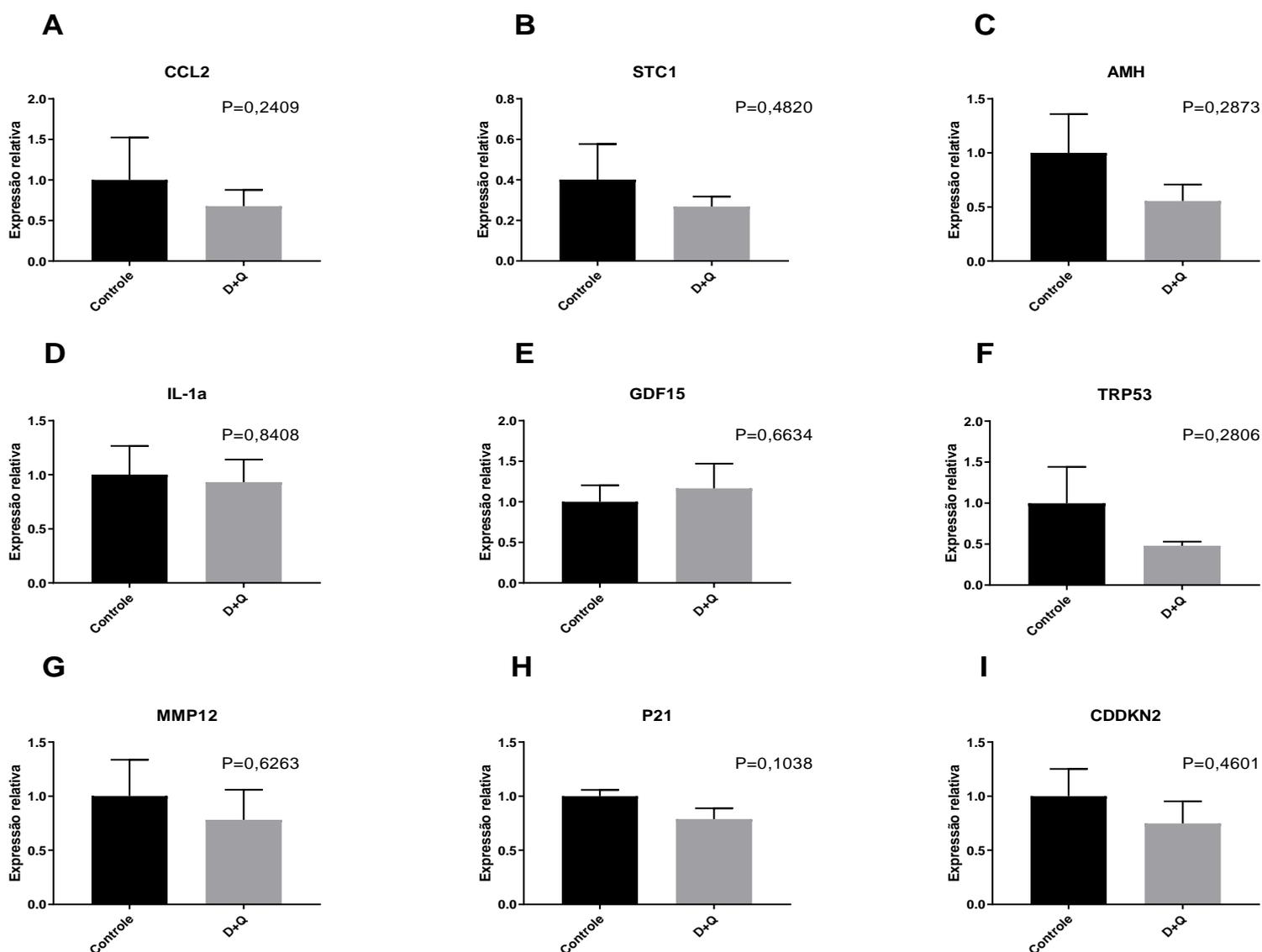


Figura 9. Análise da expressão gênica relativa de diferentes genes ovarianos. (A) Ligand 2 da quimiocina (*Ccl2*), (B) Stanniocalcina-1 (*Stc1*), (C) Hormônio anti-mulleriano (*Amh*), (D) Interleucina 1 alfa (*IL-1a*), (E) Fator de diferenciação de crescimento 15 (*Gdf-15*), (F) Tumor de proteína p53 (*Trp53*), (G) Metalopeptidase de matriz 12 (*Mmp12*), (H) Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (*P21/Cdkn1a*), (I) inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (*p16INK4A/Cdkn2*). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6. Considerações finais e perspectivas futuras

Concluindo, apesar de observarmos maior senescência nas fêmeas obesas aos 12 meses de idade, a obesidade não afetou a reserva ovariana de

forma significativa. Além disso, o tratamento com D+Q reduziu a carga senescente já aos 6 meses de idade, porém não refletiu na reserva ovariana de camundongos *ob/ob* tratados com (D+Q).

Mais estudos precisam ser desenvolvidos testando diferentes frequências de tratamento e em idades diferentes, visto que esse estudo demonstrou uma maior carga de senescência celular no ovário de fêmeas obesas quando comparado com magras. Ainda assim, quando essas fêmeas obesas foram tratadas, observou-se uma diminuição na carga de células senescentes juntamente com uma melhora no ganho de peso. Devemos considerar que as células senescentes são de diversas origens e tem características diferentes. Algumas são fisiologicamente necessárias, enquanto outras são patológicas. Entender que tipo de células senescentes está presente no ovário é necessário para descobrir a droga que terá melhores efeitos benéficos. Possivelmente o D+Q apesar de reduzir a senescência também pode reduzir células senescentes com efeitos benéficos no desenvolvimento normal do ciclo reprodutivo.

A obesidade nas mulheres não afeta apenas seu metabolismo, mas também sua saúde reprodutiva. Especificamente, as mulheres obesas estão em maior risco de subfertilidade ovulatória e infertilidade anovulatória em comparação com mulheres magras da mesma idade (KUMBAK *et al.* 2012, PENZIAS 2012). Nesse contexto, o tratamento com senolíticos torna-se uma importante ferramenta a fim de esclarecer seus possíveis efeitos benéficos para reserva ovariana, e a sua contribuição para uma melhora no perfil inflamatório dessas mulheres obesas que buscam auxílio para engravidar.

7 Referências Bibliográficas

AHIMA, R. S. Connecting obesity, aging and diabetes. **Nat Med**, 15, n. 9, p. 996-997, Sep 2009.

AHIMA, R. S.; DUSHAY, J.; FLIER, S. N.; PRABAKARAN, D. *et al.* Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **J Clin Invest**, 99, n. 3, p. 391-395, Feb 1 1997.

AHIMA, R. S.; SAPER, C. B.; FLIER, J. S.; ELMQUIST, J. K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol**, 21, n. 3, p. 263-307, Jul 2000.

AHMED, T. A.; AHMED, S. M.; EL-GAMMAL, Z.; SHOUMAN, S. *et al.* Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. **Adv Exp Med Biol**, Dec 5 2019.

ALONSO-FERNANDEZ, P.; DE LA FUENTE, M. Role of the immune system in aging and longevity. **Curr Aging Sci**, 4, n. 2, p. 78-100, Jul 2011.

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.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H. *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, 137, n. 7, p. 3144-3147, Jul 1996.

BARROS, C. C.; ALMEIDA, S. S.; MORI, M. A.; VALERO, V. B. *et al.* Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **Int J Obes (Lond)**, 33, n. 8, p. 938-944, Aug 2009.

BARTKE, A. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. **Endocrinology**, 146, n. 9, p. 3718-3723, Sep 2005.

BAZZANO, M. V.; TORELLI, C.; PUSTOVRH, M. C.; PAZ, D. A. *et al.* Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. **Reprod Biomed Online**, 31, n. 5, p. 655-667, Nov 2015.

BEALL, C.; HANNA, L.; ELLACOTT, K. L. J. CNS Targets of Adipokines. **Compr Physiol**, 7, n. 4, p. 1359-1406, Sep 12 2017.

BLUM, W. F. Leptin: The voice of the adipose tissue. **Hormone Research in Paediatrics**, 1997.

CABELLO, E.; GARRIDO, P.; MORAN, J.; GONZALEZ DEL REY, C. *et al.* Effects of resveratrol on ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in ob/ob mice. **Fertil Steril**, 103, n. 2, p. 570-579 e571, Feb 2015.

CASTRILLON, D. H.; MIAO, L.; KOLLIPARA, R.; HORNER, J. W. *et al.* Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, 301, n. 5630, p. 215-218, Jul 11 2003.

CIOFFI, J. A.; VAN BLERKOM, J.; ANTCZAK, M.; SHAFER, A. *et al.* The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. **Mol Hum Reprod**, 3, n. 6, p. 467-472, Jun 1997.

CHEHAB, F. F.; LIM, M. E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics**, 1996.

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

DE MELLO, A. H. *et al.* **Mitochondrial dysfunction in obesity** *Life Sciences*, 2018.

DOI, S. A.; TOWERS, P. A.; SCOTT, C. J.; AL-SHOUMER, K. A. PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 118, n. 1, p. 4-16, Jan 10 2005.

DONG, X. C.; COPPS, K. D.; GUO, S.; LI, Y. *et al.* Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. **Cell Metab**, 8, n. 1, p. 65-76, Jul 2008.

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.

EGAN, O. K.; INGLIS, M. A.; ANDERSON, G. M. Leptin Signaling in AgRP Neurons Modulates Puberty Onset and Adult Fertility in Mice. **J Neurosci**, 37, n. 14, p. 3875-3886, Apr 5 2017.

ELMQUIST, J. K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. *et al.* Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol**, 395, n. 4, p. 535-547, Jun 15 1998.

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

FINKELSTEIN, E. A.; KHAVJOU, O. A.; THOMPSON, H.; TROGDON, J. G. *et al.* Obesity and severe obesity forecasts through 2030. **Am J Prev Med**, 42, n. 6, p. 563-570, Jun 2012.

FLIER, J. S. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, n. 5, p. 1407-1413, May 1998.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, 395, n. 6704, p. 763-770, Oct 22 1998.

GARCIA, D. N.; SACCON, T. D.; PRADIEE, J.; RINCON, J. A. A. *et al.* Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience**, 41, n. 4, p. 395-408, Aug 2019.

GERARD, N.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GOUDET, G. *et al.* The interleukin-1 system and female reproduction. **J Endocrinol**, 180, n. 2, p. 203-212, Feb 2004.

GOSMAN, G. G.; KATCHER, H. I.; LEGRO, R. S. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. **Hum Reprod Update**, 12, n. 5, p. 585-601, Sep-Oct 2006.

HAMM, M. L.; BHAT, G. K.; THOMPSON, W. E.; MANN, D. R. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. **Biol Reprod**, 71, n. 1, p. 66-72, Jul 2004.

HOU, Y. J.; ZHU, C. C.; DUAN, X.; LIU, H. L. *et al.* Both diet and gene mutation induced obesity affect oocyte quality in mice. **Sci Rep**, 6, p. 18858, Jan 6 2016.

HUDGINS, A. D. *et al.* Age- and tissue-specific expression of senescence biomarkers in mice. **Frontiers in Genetics**, 2018.

JAN, V.; CERVERA, P.; MAACHI, M.; BAUDRIMONT, M. *et al.* Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. **Antivir Ther**, 9, n. 4, p. 555-564, Aug 2004.

KALICH-PHILOSOPH, L.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M. *et al.* Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Sci Transl Med**, 5, n. 185, p. 185ra162, May 15 2013.

KENNEDY, B. K.; BERGER, S. L.; BRUNET, A.; CAMPISI, J. *et al.* Geroscience: linking aging to chronic disease. **Cell**, 159, n. 4, p. 709-713, Nov 6 2014.

KEVENAAR, M. E.; MEERASAHIB, 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.

KIM, S.; PARKS, C. G.; DEROO, L. A.; CHEN, H. *et al.* Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18, n. 3, p. 816-820, Mar 2009.

KITAWAKI, J. *et al.* Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, 1999.

LI, L.; FU, Y. C.; XU, J. J.; LIN, X. H. *et al.* Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of

mammalian target of rapamycin signaling. **Reprod Sci**, 22, n. 1, p. 60-67, Jan 2015.

LIU, Z.; WU, K. K. L.; JIANG, X.; XU, A. *et al.* The role of adipose tissue senescence in obesity- and ageing-related metabolic disorders. **Clin Sci (Lond)**, 134, n. 2, p. 315-330, Jan 31 2020.

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.

MANCUSO, P.; BOUCHARD, B. The Impact of Aging on Adipose Function and Adipokine Synthesis. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 137, 2019.

MARQUES, P. *et al.* **Physiology of GNRH and Gonadotropin Secretion**. [s.l: s.n.].

ROJAS, J. *et al.* **Physiologic Course of Female Reproductive Function: A Molecular Look into the Prologue of Life** *Journal of Pregnancy*, 2015.

MCHUGH, D.; GIL, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. **J Cell Biol**, 217, n. 1, p. 65-77, Jan 2 2018.

MCMINN, J. E.; LIU, S. M.; LIU, H.; DRAGATIS, I. *et al.* Neuronal deletion of *Lepr* elicits diabetes in mice without affecting cold tolerance or fertility. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 289, n. 3, p. E403-411, Sep 2005.

MINCIULLO, P. L.; CATALANO, A.; MANDRAFFINO, G.; CASCIARO, M. *et al.* Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 64, n. 2, p. 111-126, Apr 2016.

MONTERO, J. C.; SEOANE, S.; OCANA, A.; PANDIELLA, A. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. **Clin Cancer Res**, 17, n. 17, p. 5546-5552, Sep 1 2011.

MORENO-NAVARRETE, J. M.; ORTEGA, F.; SABATER, M.; RICART, W. *et al.* Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. **Int J Obes (Lond)**, 34, n. 8, p. 1345-1348, Aug 2010.

MUNOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 7, p. 482-496, Jul 2014.

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

NEWSON, L. Menopause and cardiovascular disease. **Post Reprod Health**, 24, n. 1, p. 44-49, Mar 2018.

OLIVIERI, F.; PRATTICHIZZO, F.; GRILLARI, J.; BALISTRERI, C. R. Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. **Mediators Inflamm**, 2018, p. 9076485, 2018.

OLATINWO MO, BHAT GK, STAH CD, MANN DR. Impact of gonadotropin administration on folliculogenesis in prepubertal ob/ob mice. **Molecular and cellular endocrinology**. 2005;245(1-2):121

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.

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

PRESTWOOD, K. M.; RAISZ, L. G. Prevention and treatment of osteoporosis. **Clin Cornerstone**, 4, n. 6, p. 31-41, 2002.

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.

RICHARDSON, M. C.; GUO, M.; FAUSER, B. C.; MACKLON, N. S. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. **Hum Reprod Update**, 20, n. 3, p. 353-369, May-Jun 2014.

ROJAS, J. *et al.* Physiologic Course of Female Reproductive Function: A Molecular Look into the Prologue of Life. **Journal of Pregnancy**, 2015.

RYAN, N. K.; WOODHOUSE, C. M.; VAN DER HOEK, K. H.; GILCHRIST, R. B. *et al.* Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. **Biol Reprod**, 66, n. 5, p. 1548-1554, May 2002.

SACCON, T. D.; MOREIRA, F.; CRUZ, L. A.; MONDADORI, R. G. *et al.* Ovarian aging and the activation of the primordial follicle reserve in the long-lived Ames dwarf and the short-lived bGH transgenic mice. **Mol Cell Endocrinol**, 455, p. 23-32, Nov 5 2017.

SALVESTRINI, V.; SELL, C.; LORENZINI, A. Obesity May Accelerate the Aging Process. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 266, 2019.

SELESNIEMI, K.; LEE, H. J.; TILLY, J. L. Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. **Aging Cell**, v. 7, n. 5, p. 622–629, 2008.

SCHNEIDER, A.; ZHI, X.; MOREIRA, F.; LUCIA, T., Jr. *et al.* Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, 7, p. 120, Dec 29 2014.

SEPE, A.; TCHKONIA, T.; THOMOU, T.; ZAMBONI, M. *et al.* Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. **Gerontology**, 57, n. 1, p. 66-75, 2011.

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.

SIERRA-RAMIREZ, A. *et al.* Transient metabolic improvement in obese mice treated with navitoclax or dasatinib/quercetin. **Aging**, 2020.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, 10, n. 2, p. 89-102, Feb 2010.

SMITH, G. D.; JACKSON, L. M.; FOSTER, D. L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. **Theriogenology**, 57, n. 1, p. 73-86, Jan 1 2002.

SREEJAYAN, N. *et al.* Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. **Obesity**, 2008.

SWAIN, J. E. *et al.* Direct effects of leptin on mouse reproductive function: Regulation of follicular, oocyte, and embryo development. **Biology of Reproduction**, 2004

SUN, N.; YOULE, R. J.; FINKEL, T. The Mitochondrial Basis of Aging. **Mol Cell**, 61, n. 5, p. 654-666, Mar 3 2016.

TCHKONIA, T.; THOMOU, T.; ZHU, Y.; KARAGIANNIDES, I. *et al.* Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. **Cell Metab**, 17, n. 5, p. 644-656, May 7 2013.

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.

TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, 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.

TONET, A. C.; KARNIKOWSKI, M.; MORAES, C. F.; GOMES, L. *et al.* Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. **Braz J Med Biol Res**, 41, n. 1, p. 47-53, Jan 2008.

TREFF, N. R.; KRISHER, R. L.; TAO, X.; GARNSEY, H. *et al.* Next Generation Sequencing-Based Comprehensive Chromosome Screening in Mouse Polar Bodies, Oocytes, and Embryos. **Biol Reprod**, 94, n. 4, p. 76, Apr 2016.

URI-BELAPOLSKY, S.; SHAISH, A.; ELIYAHU, E.; GROSSMAN, H. *et al.* Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 34, p. 12492-12497, Aug 26 2014.

URZUA, U. *et al.* Parity-dependent hemosiderin and lipofuscin accumulation in the reproductively aged mouse ovary. **Analytical Cellular Pathology**, 2018.

VALDES, A. M.; ANDREW, T.; GARDNER, J. P.; KIMURA, M. *et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. **Lancet**, 366, n. 9486, p. 662-664, Aug 20-26 2005.

WANG, H. H.; CUI, Q.; ZHANG, T.; GUO, L. *et al.* Removal of mouse ovary fat pad affects sex hormones, folliculogenesis and fertility. **J Endocrinol**, 232, n. 2, p. 155-164, Feb 2017.

WANG, N.; LUO, L. L.; XU, J. J.; XU, M. Y. *et al.* Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism**, 63, n. 1, p. 94-103, Jan 2014.

WATANOBE, H. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. **J Physiol**, 545, n. 1, p. 255-268, Nov 15 2002.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, 3, n. 105, p. cm1, Jan 19 2010.

WEST, M. A.; LYTHGOE, D.; BARBEN, C. P.; NOBLE, L. *et al.* Cardiopulmonary exercise variables are associated with postoperative morbidity after major colonic surgery: a prospective blinded observational study. **Br J Anaesth**, 112, n. 4, p. 665-671, Apr 2014.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, 124, n. 3, p. 471-484, Feb 10 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.

YANG, L.; CHEN, L.; LU, X.; TAN, A. *et al.* Peri-ovarian adipose tissue contributes to intraovarian control during folliculogenesis in mice. **Reproduction**, 156, n. 2, p. 133-144, Aug 2018.

ZHANG, H.; RISAL, S.; GORRE, N.; BUSAYAVALLASA, K. *et al.* Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Curr Biol**, 24, n. 21, p. 2501-2508, Nov 3 2014.

ZHU, Y. L.; XU, Y. Q.; YANG, J.; LI, J. One-stage reconstruction of Achilles tendon and skin defects by the sliding gastrocnemius musculocutaneous flap without anastomosis. **J Trauma**, 66, n. 4, p. 1129-1134, Apr 2009.

ZHU, M. et al. Advancements in therapeutic drugs targeting of senescence. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 11, p. 1–26, 2020.

ZOU, K.; YUAN, Z.; YANG, Z.; LUO, H. *et al.* Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nat Cell Biol**, 11, n. 5, p. 631-636, May 2009.

Anexos

Anexo 1



PARECER Nº 127/2020/CEEA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.024915/2020-11

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Senescência celular no ovário de camundongos geneticamente obesos”, registrada com o nº 23110.024915/2020-11, sob a responsabilidade de **Augusto Schneider** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORAVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **09 de outubro de 2020**.

| Finalidade | (x) Pesquisa () Ensino |
|-------------------------|---|
| Vigência da autorização | 01/11/2020 a 31/12/2021 |
| Espécie/linhagem/raça | <i>Mus musculus</i> /C57BL/6 - ob/ob |
| Nº de animais | 16 |
| Idade | 21 dias |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição - UFPel |

Código para cadastro nº CEEA 24915-2020

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 13/10/2020, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1081696** e o código CRC **0A24A2AD**.

Referência: Processo nº 23110.024915/2020-11

SEI nº 1081696