

## **Variações oxidativas e histológicas dos ovários de camundongas LDLR -/- submetidas a diferentes dietas**

**Oxidative and histological variations of LDLR -/- female mice ovaries submitted to different diets**

**Variaciones oxidativas e histológicas de los ovarios de ratón LDLR -/- sometido a diferentes dietas**

Recebido: 17/04/2022 | Revisado: 28/04/2022 | Aceito: 02/05/2022 | Publicado: 05/05/2022

### **Juliana Maganha Abreu**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4038-8305>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [julimaganha@gmail.com](mailto:julimaganha@gmail.com)

### **Gérsika Bitencourt Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0849-2786>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [Gersika.santos@unifenas.br](mailto:Gersika.santos@unifenas.br)

### **Juliana Marques Mencarelli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0836-8075>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [julianamarquesmencarelli@yahoo.com.br](mailto:julianamarquesmencarelli@yahoo.com.br)

### **Ester Siqueira Caixeta**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7780-8436>  
Universidade Federal de Alfenas, Brasil  
E-mail: [ecaixeta@gmail.com](mailto:ecaixeta@gmail.com)

### **Jairo Pereira Neves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7733-869X>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [jairo.neves@unifenas.br](mailto:jairo.neves@unifenas.br)

### **Cloves Gomes de Carvalho Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7026-4253>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [cloves.filho@ifsuldeminas.edu.br](mailto:cloves.filho@ifsuldeminas.edu.br)

### **Flávia Helena Pereira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9331-7020>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [flavia.pereira@ifsuldeminas.edu.br](mailto:flavia.pereira@ifsuldeminas.edu.br)

### **Nelma de Mello Silva Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1114-2018>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [nelma.oliveira@unifenas.br](mailto:nelma.oliveira@unifenas.br)

### **Giulia Martins Di Santis**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1866-5986>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: [giudisantis@icloud.com](mailto:giudisantis@icloud.com)

### **Jose Antonio Dias Garcia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4024-3045>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [jadiasgarcia@gmail.com.br](mailto:jadiasgarcia@gmail.com.br)

## **Resumo**

**Objetivo:** avaliar as variações oxidativas e histológicas dos ovários de camundongas submetidas a diferentes dietas. **Metodologia:** foram utilizadas fêmeas de camundongos “wild type” (C57BL6) e LDLR -/-. Divididas em 4 grupos (n=10): WTS: alimentadas com dieta padrão; WTHL: alimentadas com dieta hiperlipídica; KOS: LDLR -/-, alimentadas com ração padrão; KOHL: LDLR -/-, receberam dieta hiperlipídica. Decorridos 60 dias, realizou-se a coleta do sangue a fim de verificar os níveis plasmáticos de glicose e de insulina, o HOMA<sub>ir</sub> foi calculado e foram mensurados os níveis séricos de lipídios. Após a eutanásia, os ovários foram coletados, pesados, examinados a fresco, um ovário foi enviado para a preparação histológica e o outro foi enviado para o preparo da avaliação do estresse oxidativo. **Resultados:** a ingestão de ração hiperlipídica ocasionou uma hipercolesterolemia, tanto no grupo KOHL quanto WTHL, quando comparados aos seus respectivos grupos controles. A hipercolesterolemia alimentar e genética associadas à resistência insulínica, verificada no grupo KOHL, aumentou a lipoperoxidação e a oxidação proteica ovariana. Nenhum grupo

apresentou alterações anatômicas ovarianas e nem diferenças entre os números de folículos e corpos lúteos. Conclusão: a associação entre a dislipidemia genética e alimentar ocasionou a resistência insulínica e o estresse oxidativo ovariano nos ovários, porém não causou alterações morfológicas e histológicas aos ovários de camundongas.

**Palavras-chave:** Dislipidemia; Camundongas knockout; Lipoperoxidação ovariana; Oxidação proteica do ovário.

### Abstract

**Objective:** to evaluate the oxidative and histological variations of female mice's ovaries submitted to different diets. **Methodology:** Wild female mice (C57BL6) and LDLR<sup>-/-</sup> were used. They were divided into 4 groups (n=10): WTS: fed a standard diet; WTHL: fed a high fat diet; KOS: LDLR<sup>-/-</sup>, fed a standard diet; KOHL: LDLR<sup>-/-</sup>, received a high fat diet. After 60 days, blood was collected in order to verify of plasma glucose and insulin levels, the HOMA<sub>IR</sub> was updated and serum lipid level were measured. After euthanasia, the ovaries were collected, weighed, freshly examined, one ovary was sent for histological preparation and the other was sent for preparation for oxidative stress assessment. **Results:** The ingestion of high-fat diet caused hypercholesterolemia, both the KOHL and WTHL groups, when compared to their respective control groups. In the KOHL group, severe hypercholesterolemia caused insulin resistance, verified by the increase in HOMA<sub>IR</sub>. Dietary and genetic hypercholesterolemia associated with insulin resistance, verified in the KOHL, group increased lipoperoxidation and ovarian protein oxidation. No group had ovarian anatomical alterations or differences between the numbers of follicles and corpora lutea. **Conclusion:** the association between genetic and dietary dyslipidemia caused ovarian oxidative stress and insulin resistance in the ovaries, but didn't cause morphological and histological changes to the ovaries of mice.

**Keywords:** Dyslipidemia; Knockout female mice; Ovarian lipoperoxidation; Ovarian protein oxidation.

### Resumen

**Objetivo:** evaluar las variaciones oxidativas e histológicas de los ovarios de ratones sometidos a diferentes dietas. **Metodología:** se usaron ratones hembra de tipo salvaje (C57BL6) y LDLR<sup>-/-</sup>. Se dividieron en 4 grupos (n = 10): WTS: alimentados con pienso estándar; WTHL: alimentados con dieta alta en grasas; KOS: LDLR<sup>-/-</sup>, alimentados con pienso estándar; KOHL: LDLR<sup>-/-</sup>, alimentados con dieta alta en grasas. Después de 60 días, se recolectó sangre para verificar los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, se calculó el HOMA<sub>IR</sub> y se midieron los niveles lípidios in suero. Después de la eutanasia, se recolectaron los ovarios, se pesaron, se examinaron recientemente, se enviaron, un ovario para la preparación histológica y otro para la preparación de la evaluación del estrés oxidativo. **Resultados:** la ingestión de alimentos hiperlipídicos generó hipercolesterolemia en los grupos KOHL como en WTHL, en comparación con sus respectivos grupos control. En el grupo de KOHL, la hipercolesterolemia severa provocó resistencia a la insulina, comprobada por el aumento de HOMA<sub>IR</sub>. La hipercolesterolemia dietética y genética asociada con la resistencia a la insulina, verificado en el grupo de KOHL, aumentó la lipoperoxidación y la oxidación de las proteínas ováricas. Ningún grupo presentó alteraciones anatómicas ováricas o diferencias entre el número de folículos y cuerpos lúteos. **Conclusión:** a asociación entre dislipidemia genética y dietética provocó estrés oxidativo ovárico y resistencia a la insulina en los ovarios, pero no provocó cambios morfológicos e histológicos en los ovarios de ratones.

**Palabras clave:** Dislipidemia; Ratones knockout; Lipoperoxidación ovárica; Oxidación de proteínas ováricas.

## 1. Introdução

Os ovários são órgãos fundamentais ao processo reprodutivo da fêmea, responsáveis pelo desenvolvimento e maturação do ovócito e pela esteroidogênese. Apresentam variação na sua forma, volume e dimensões, de acordo com estágio reprodutivo da fêmea (Guyton; Hall, 2002) e a sua espécie. O desenvolvimento e a maturação de vários folículos, processo conhecido como foliculogênese, culmina com a ovulação, que é a expulsão dos ovócitos. Ela deve ocorrer de maneira dinâmica e ordenada, para que o ovócito possa atingir o seu potencial de originar um novo indivíduo e perpetuar a espécie.

Alterações morfológicas, histológicas e fisiológicas dos ovários podem influenciar a fertilidade feminina. De acordo com Agarwal et al. (2003), o estresse oxidativo (eo) atua sobre a reprodução, na qual as espécies reativas do oxigênio (EROS) influenciam o oócito, o espermatozoide, o embrião e o seu microambiente. As EROS participam inclusive do desenvolvimento e da maturação folicular, da ovulação e do funcionamento do corpo lúteo (Tamate et al., 1995; Sugino et al., 1996; Jozwik et al., 1999; Sabatini et al., 1999).

Giacomini et al. (2013) sugeriram que o estresse oxidativo pode ser causado pela hiperlipidemia, para Hopps & Caimi (2013), a ligação entre a hiperlipidemia e o estresse oxidativo pode ser observada pela existência de uma correlação entre os níveis de colesterol total e da proteína carbonila.

Na Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), onde foram realizadas as pesquisas com camundongos LDLR<sup>-/-</sup> (knockout para receptor de LDL), alimentados com ou sem dietas hiperlipídicas, mostraram elevação dos níveis sanguíneos das lipoproteínas LDLc, VLDLc e triglicérides, causando uma dislipidemia mista (Garcia et al., 2011). Santos et al. (2017) demonstraram em seus estudos um aumento dos marcadores inflamatórios na dislipidemia genética associada a alimentar, que ocasionou a resistência insulínica nos camundongos LDLR<sup>-/-</sup>, trouxe danos ao sistema cardiovascular, Sarto et al. (2018) acrescentam que houve maior estresse oxidativo.

A ação da dislipidemia no desenvolvimento do estresse oxidativo ovariano e sobre a histologia do ovário ainda são questões em aberto, justificando a proposta desta pesquisa. Os estudos sobre reprodução e fertilidade podem ser enriquecidos pelo conhecimento das alterações histológicas do ovário e do estresse oxidativo ovariano, desencadeados pela dislipidemia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de estresse oxidativo no tecido ovariano pela quantificação de lipoperoxidação e da oxidação proteica. Também avaliou a existência de uma correlação entre o estresse oxidativo e as variações histológicas dos ovários de camundongas LDLR<sup>-/-</sup> submetidas a diferentes dietas.

## 2. Metodologia

O estudo realizado nesse artigo se caracteriza como uma pesquisa experimental. De acordo com a descrição de Koche (2011), na pesquisa experimental após a análise do problema e a elaboração de hipóteses, o pesquisador trabalha sobre as variáveis relacionadas ao fenômeno observado. Ao controlar a quantidade e a qualidade das variáveis, o estudo é capaz de estabelecer uma relação entre causas e efeitos, assim, o pesquisador pode controlar e avaliar os resultados dessas relações.

Os experimentos foram realizados em fêmeas de camundongos LDLR<sup>-/-</sup> (homozigotas para a ausência do gene do receptor de LDL) gerados no *background* C57BL6 e camundongos selvagens, wild type (WT), fêmeas com 70 dias ( $\pm$  5 dias), pesando  $22 \pm 2$ g. Os animais foram provenientes do biotério da pós-graduação da UNIFENAS com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. O uso de animais e o protocolo experimental foram encaminhados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade José do Rosário Vellano. Parecer N°: 23A/2017.

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais, cada um contendo 10 animais (n=10), assim constituídos: grupo WTS: animais wild type alimentadas com ração padrão (Nuvital®); grupo WTHL: animais wild type alimentadas com dieta hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico; grupo KOS: camundongas LDLR<sup>-/-</sup> alimentadas com dieta padrão (Nuvital®); grupo KOHL: camundongas LDLR<sup>-/-</sup> alimentadas com ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico. Todos os animais foram alimentados com as respectivas dietas por 60 dias e receberam água *ad libitum*.

Decorridos 60 dias, as camundongas foram anestesiadas por via intraperitoneal (ip) utilizando-se Xilazina/Ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®, respectivamente) na concentração de 6 - 40 mg/Kg. Realizou-se a coleta do sangue por via intracardíaca, encaminhado para análises da glicose, do perfil lipídico e de insulina, em seguida os animais foram eutanasiados por overdose de anestesia. Os ovários foram coletados, separados da gordura de forma cuidadosa, pesados, examinados a fresco, enviados para a preparação histológica, para o ensaio proteico e de peroxidação lipídica. Foi enviado um (1) ovário de cada animal para a preparação histológica e um (1) para preparação da avaliação do estresse oxidativo.

Para a mensuração sérica dos triglicérides (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDLc), foram utilizados ensaios enzimáticos (Hedrick, et al. 2001). A lipoproteína de baixa densidade (LDLc) foi determinada pela fórmula de Friedewald et al. (1972) e a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDLc), conforme descrito por Tian et al. (2006).

A quantificação da concentração de glicose foi feita pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit glicose PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica. O nível da insulina foi mensurado com o kit comercial ELISA específico (Dako Ltd High

Wycombe, Bucks, UK). Para determinar a resistência à insulina, o índice de HOMA (HOMA-ir) foi calculado pela fórmula:  $\{HOMA_{Air} = \text{insulinemia de jejum [mU/L]} \times \text{glicemia em jejum [mmol/L]} / 22,5\}$ .

Foi feita uma análise anatômica em cada ovário, em seguida foram pesados e um ovário de cada animal foi preparado para as análises histológicas e o outro ovário foi preparado para as análises de peroxidação lipídica e oxidação proteica.

Para realização das análises histológicas, os ovários foram fixados em formalina 10% por 48 horas, depois foram incluídos em parafina para cortes histológicos de 3µm de espessura, segundo Junqueira & Carneiro (1979). Os cortes histológicos foram depositados em lâminas histológicas e, uma parte das lâminas foi corada com hematoxilina/eosina (Junqueira & Carneiro, 1979). As lâminas foram escaneadas e observadas utilizando o programa de imagem Panoramic Viewer e de um sistema de análise de imagem digital Motic Images Plus 2.0.

Os folículos ovarianos foram qualificados em 4 classes baseadas nas características morfológicas e no número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito, a saber: 1. folículo primário (fp), o oócito é circundado por uma única camada de células foliculares planas ou cuboides, células da granulosa (Fair, 2003; Van Den Hurk & Zhao, 2005); 2. folículo secundário (fs), caracterizado pelo aumento em número e volume das células da granulosa e início da formação da zona pelúcida (Fair, 2003); 3. folículo antral normal (fa), aquele que apresenta uma cavidade antral bem definida contendo um oócito com um núcleo (Van Den Hurk & Zhao, 2005); 4. folículo antral atresico (faa), aquele que apresenta células da granulosa em processos degenerativos e muitas vezes com aparente degeneração oocitária (Moore & Persaud, 1994). O número de corpos lúteos (cl) também foi quantificado, sendo considerados aqueles com aspecto glandular (Moore & Persaud, 1994).

Para as análises de estresse oxidativo, as amostras dos ovários foram preparadas imediatamente após a eutanásia, elas foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato frio (PBS) (Ph 7,4) e os detritos foram removidos após centrifugação a 3500 g por 10 min. (Rotofix 32 A, Hettich, Tuttlingen, Germany). A região clara superior do sobrenadante foi recuperada e estocada a -70°C para análise proteica e de peroxidação lipídica (Kheradmand et al., 2010).

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida dos produtos de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Winterbourn (1981). Alíquotas do homogeneizado (150µL) foram misturadas com 750µL de ácido fosfórico 1,22M, 1350 µL de água deionizada e 750µL de TBA (0,67%). A seguir, as amostras foram aquecidas em banho de água fervente (95°C), durante 1 hora. Após o resfriamento em banho de gelo 4°C, em cubeta com capacidade de 3 mL, foi adicionado 1800 µL de metanol, 200 µL de NaOH (hidróxido de Sódio)1M e 1000 µL de amostra. A concentração de TBARS foi estimada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano). Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/g de proteína. Para comparação, a concentração proteica total foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Para a determinação das proteínas carboniladas, 500 µL das alíquotas do homogeneizado em PBS mais 500 µL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 µM foram incubadas por 1 h, com gotejamento de 500 µL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 20%, até a precipitação completa. Em seguida, foram adicionados à mistura 500 µL da solução Etanol/Acetato de Etila e esta foi centrifugada a 600g por 10 minutos. Ao pellet resultante foi adicionado novamente 500 µL da solução Etanol/Acetato de Etila e foi feita uma nova centrifugação (600g, 10 minutos). Finalmente, o pellet foi dissolvido com 1000 µL de Guanidina 6 M. A taxa da variação na absorbância foi medida espectrofotometricamente a 370 nm. Para comparação, a concentração proteica total foi determinada pelo método de Bradford (1976), os valores obtidos foram expressos em nmol/g de proteína.

Os dados coletados foram processados pelo teste de análise de variância (ANOVA – uma via), para comparação de dados contínuos, seguida de teste de Tukey, foram utilizados para comparar as médias entre diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ . As determinações séricas, e plasmáticas foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### 3. Resultados

Os ovários das camundongas de todos os grupos não apresentaram nenhuma anormalidade anatômica, ao serem analisados a fresco.

Os animais wild type que foram alimentados com ração hiperlipídica (WTHL) e as camundongas knockout LDLR -/- que foram alimentadas com ração hiperlipídica (KOHL) e com ração padrão (KOS) apresentaram peso corporal menor quando comparadas aos animais wild type que não foram alimentadas com dieta hiperlipídica (WTS) (Tabela 1). O peso corporal das camundongas não apresentou diferença entre os grupos WTHL, KOS e KOHL (tabela 1). A razão entre o peso ovariano (direito e esquerdo) e o peso corporal não revelou diferenças entre os grupos (Tabela 1).

**Tabela 1** - Comparação dos pesos corporal e ovariano de camundongas wild type alimentadas com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL), de camundongas LDLR-/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL).

Grupos	Peso Corporal (g)	Razão peso ovariano direito (mg)/peso da camundonga (g)	Razão peso ovariano esquerdo (mg)/peso da camundonga (g)
WTS	21,60±0,52 <sup>a</sup>	0,1640±0,0060	0,1758±0,0100
WTHL	18,26±0,60 <sup>b</sup>	0,1485±0,0091	0,1504±0,0097
KOS	16,15±1,18 <sup>b</sup>	0,2014±0,0256	0,1962±0,0308
KOHL	17,74±0,38 <sup>b</sup>	0,1916±0,0153	0,1902±0,0174

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0,05, Tukey teste). (N = 9).

Fonte: Autores.

Após as lâminas serem escaneadas e analisadas com o auxílio do programa de imagem Panoramic Viewer e de um sistema de análise de imagem digital Motic Images Plus 2.0, não foram encontradas diferenças entre os grupos de estudados neste trabalho, camundongas wild type alimentadas com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL), camundongas LDLR-/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL), ao se analisar o número de folículos primários, secundários, antrais normais, antrais atrésicos e corpos lúteos (Tabela 2).

**Tabela 2** - Número de folículos primários, secundários, antrais normais, antrais atrésicos e corpos lúteos encontrados nos ovários de camundongas wild type alimentadas com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL), camundongas LDLR-/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL).

Grupos	Número de Folículos Primários	Número de Folículos Secundários	Número de Folículos Antrais Normais	Número de Folículos Antrais Atrésicos	Número de Corpos Lúteos
WTS	4,778 ±0,939	3,333 ±0,4082	2.875 ± 0.3637	1.250 ± 0.2958	1,444 ±0,3768
WTHL	5,111 ±1,086	4,000 ±0,6236	3.056 ± 0.6339	1.278 ± 0.2893	1,111 ±0,4843
KOS	9,444 ±2,148	6,444 ±1,203	3.111 ± 1.006	1.111 ± 0.2606	0,7778 ±0,2778
KOHL	7,375 ±1,267	5,500 ±1,180	3.500 ± 0.7559	2.000 ± 0.2673	1,875 ±0,5806

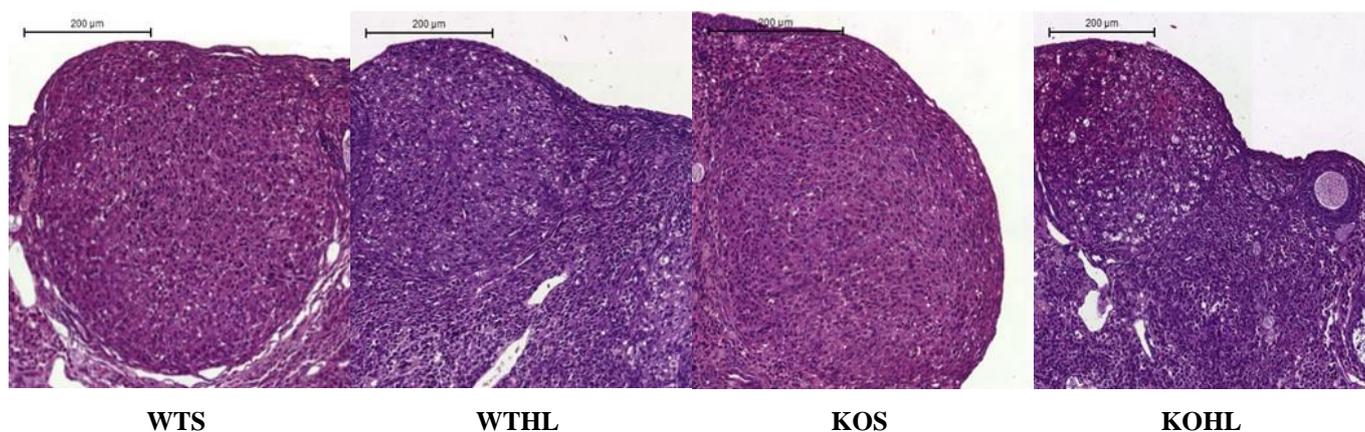
Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados com um número de 9 animais por grupo.  
Fonte: Autores.

O programa de imagem Panoramic Viewer e o sistema de análise de imagem digital, Motic Images Plus 2.0 também foram utilizados para obter imagens micrográficas dos corpos lúteos (Figura 1), dos folículos primários (Figura 2), dos folículos secundários (Figura 3), dos folículos antrais normais (Figura 4) e dos antrais atrésicos (Figura 5), das camundongas wild type

alimentadas com dieta padrão (WTS) ou dieta hiperlipídica (WTHL), das camundongas LDLR<sup>-/-</sup> alimentadas com dieta padrão (KOS) ou dieta hiperlipídica (KOHL).

A Figura 1 refere-se às imagens dos corpos lúteos, obtidas através do escaneamento das lâminas de ovários das camundongas dos grupos wild type e knockout que receberam ou não dieta hiperlipídica, utilizando-se o sistema de análise digital Motic Images Plus-2.0 e o programa de imagem Panoramic Viewer.

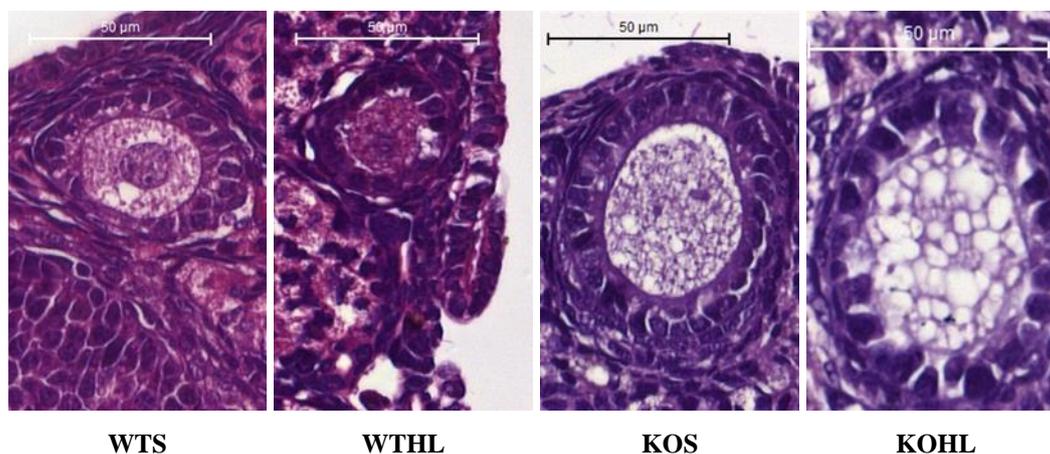
**Figura 1** – Análise micrográfica do corte histológico do ovário de camundongas na fase lútea, coloração HE. WTS: animais wild type alimentados com dieta padrão (Nuvital®), WTHL: animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico), KOS: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão (Nuvital®), KOHL: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico).



Fonte: Autores.

A Figura 2 apresenta imagens dos folículos primários, obtidas através do escaneamento das lâminas de ovários das camundongas dos grupos wild type e knockout que receberam ou não dieta hiperlipídica, utilizando-se o sistema de análise digital Motic Images Plus-2.0 e o programa de imagem Panoramic Viewer.

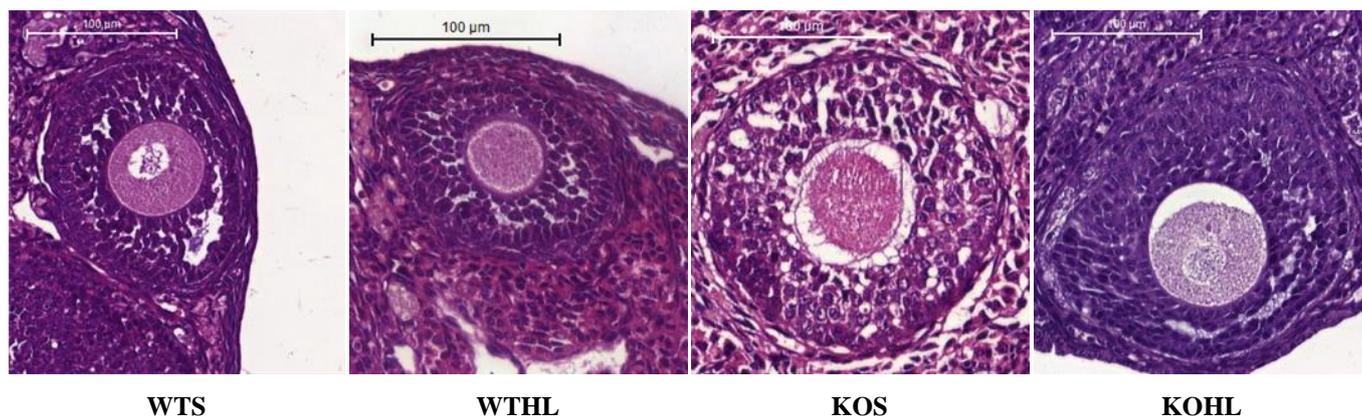
**Figura 2** - Análise micrográfica do corte histológico do ovário de camundongas, evidenciando os folículos primários, coloração HE. WTS: animais wild type alimentados com dieta padrão (Nuvital®), WTHL: animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico), KOS: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão (Nuvital®), KOHL: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico).



Fonte: Autores.

Imagens dos folículos secundários, obtidas através do escaneamento das lâminas de ovários das camundongas dos grupos wild type e knockout que receberam ou não dieta hiperlipídica, utilizando-se o sistema de análise digital Motic Images Plus-2.0 e o programa de imagem Panoramic Viewer, são apresentadas na figura 3.

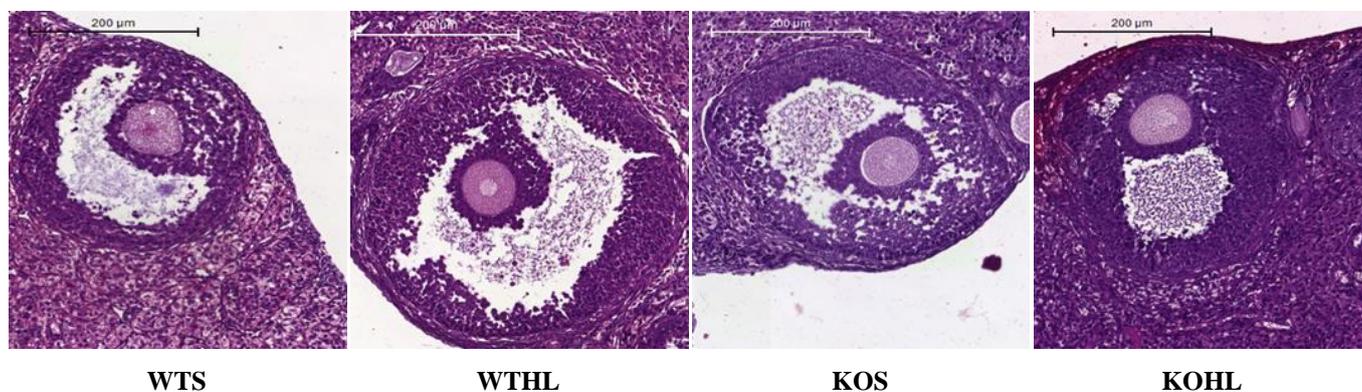
**Figura 3** - Análise micrográfica do corte histológico do ovário de camundongas, evidenciando os folículos secundários, coloração HE. WTS: animais wild type alimentados com dieta padrão (Nuvital®), WTHL: animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido fólico), KOS: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão (Nuvital®), KOHL: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido fólico).



Fonte: Autores.

As imagens dos folículos antrais foram obtidas através do escaneamento das lâminas de ovários das camundongas dos grupos wild type e knockout que receberam ou não dieta hiperlipídica, utilizando-se o sistema de análise digital Motic Images Plus-2.0 e o programa de imagem Panoramic- Viewer e estão representadas pela figura 4.

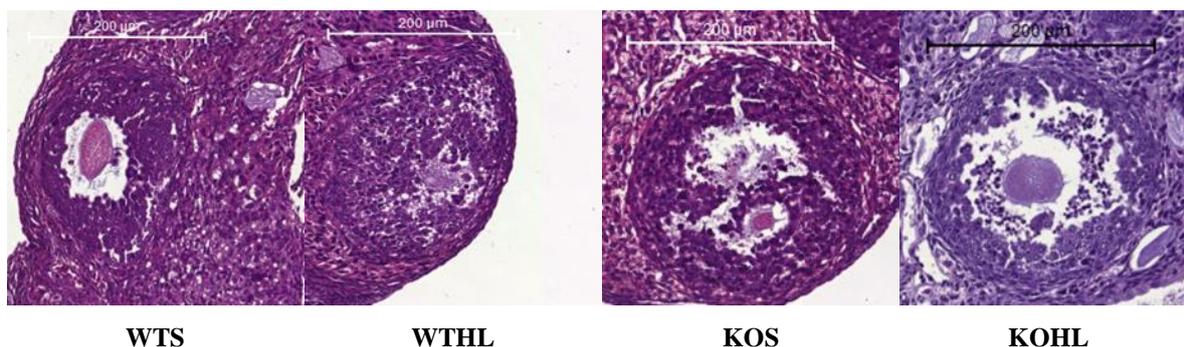
**Figura 4** - Corte histológico do ovário de camundongas, micrografia mostrando os folículos antrais, coloração HE. WTS: animais wild type alimentados com dieta padrão (Nuvital®), WTHL: animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido fólico), KOS: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão (Nuvital®), KOHL: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido fólico).



Fonte: Autores.

A figura 5 refere-se às imagens dos folículos antrais atresicos, obtidas através do escaneamento das lâminas de ovários das camundongas dos grupos wild type e knockout que receberam ou não dieta hiperlipídica, utilizando-se o sistema de análise digital Motic Images Plus-2.0 e o programa de imagem Panoramic Viewer.

**Figura 5** - Corte histológico do ovário de camundongas, micrografia mostrando os folículos antrais atresicos, coloração HE. WTS: animais wild type alimentados com dieta padrão (Nuvital®), WTHL: animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico), KOS: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta (Nuvital®), KOHL: animais LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico).



Fonte: Autores.

Pelas quantificações séricas do perfil lipídico, verificou-se que as camundongas LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica (KOHL) apresentaram dislipidemia severa com aumento do CT e sua fração LDLc e diminuição da sua fração HDLc quando comparadas às camundongas de todos os grupos experimentais. O consumo de uma dieta hiperlipídica em animais wild type (WTHL) aumentou as concentrações séricas de CT e da fração LDLc, com diminuição da fração HDLc quando comparadas com as camundongas do grupo WTS. Não houve diferenças nas concentrações séricas de CT e da fração LDLc entre os grupos WTHL e KOS. Verificou-se aumento nas concentrações séricas de CT e da fração LDLc no grupo KOS em relação ao grupo WTS. Contudo, as camundongas do grupo KOS apresentaram maior concentração sérica de HDLc, semelhante ao grupo WTS (Tabela 3).

O consumo de uma dieta hiperlipídica elevou a concentração de insulina no grupo LDLR<sup>-/-</sup> (KOHL) quando comparado aos demais grupos. No grupo wild type alimentado com dieta hiperlipídica (WTHL) e LDLR<sup>-/-</sup> alimentado com dieta padrão (KOS) o valor da insulina foi maior ao se comparar ao grupo wild type alimentado com dieta padrão (WTS) (Tabela 3).

As camundongas LDLR<sup>-/-</sup> que receberam dieta hiperlipídica (KOHL) apresentaram resistência à insulina, verificada pelo aumento no valor de Homa-ir quando comparadas às camundongas dos outros grupos. Os animais LDLR<sup>-/-</sup> que receberam dieta padrão (KOS) apresentaram Homa-ir maior que os animais wild type que receberam dieta padrão (WTS), mas não diferiram dos animais wild type que receberam dieta hiperlipídica (WTHL) (Tabela. 3).

**Tabela 3** - Comparação dos níveis séricos de CT, LDLc, HDLc, glicose e insulina entre animais wild type alimentados com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL) e LDLr-/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL).

Grupos	WTS	WTHL	KOS	KOHL
N (número da amostra)	9	9	9	9
<b>Colesterol Total (CT) (mg/dL)</b>	105,27 ± 3,36 <sup>c</sup>	141,77 ± 4,97 <sup>b</sup>	174,23 ± 20,40 <sup>b</sup>	232,58 ± 19,37 <sup>a</sup>
<b>LDLc (mg/dL)</b>	39,21 ± 2,13 <sup>c</sup>	97,56 ± 4,91 <sup>b</sup>	111,87 ± 29,46 <sup>b</sup>	197,43 ± 22,05 <sup>a</sup>
<b>HDLc (mg/dL)</b>	58,25 ± 2,45 <sup>a</sup>	33,87 ± 1,99 <sup>b</sup>	50,27 ± 1,79 <sup>a</sup>	25,16 ± 4,26 <sup>c</sup>
<b>Glicose (mMol/L)</b>	4,5 ± 0,3	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,6 ± 0,3
<b>Insulina (mU/L)</b>	2,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,8 <sup>a</sup>
<b>Homair</b>	0,5 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,05 <sup>b,c</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,02 <sup>a</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05, Tukey teste). (N = 9). Fonte: Autores.

Quando os animais LDLR-/- foram alimentados com dieta hiperlipídica (KOHL), houve aumento da lipoperoxidação ovariana ao se comparar com as camundongas wild type que receberam ração hiperlipídica (WTHL) ou foram alimentadas com dieta padrão (grupos e WTS) (Tabela 4). Os animais LDLR -/- que receberam dieta padrão (KOS) apresentaram maior lipoperoxidação ovariana quando comparados aos animais wild type que consumiram dieta padrão (WTS) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Lipoperoxidação do tecido ovariano de fêmeas camundongos wild type alimentados com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL) e camundongas LDLR -/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL).

Grupos	Lipoperoxidação ovariana
<b>WTS</b>	0,040133 ± 0,007075 <sup>b</sup>
<b>WTHL</b>	0,055112 ± 0,008901 <sup>b,c</sup>
<b>KOS</b>	0,090833 ± 0,01396 <sup>a,c</sup>
<b>KOHL</b>	0,123627 ± 0,007518 <sup>a</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. Fonte: Autores.

As camundongas LDLR -/- que receberam dieta padrão (KOS) e dieta hiperlipídica (KOHL) apresentaram aumento na oxidação proteica quando comparadas às camundongas wild type que receberam dieta padrão (WTS) e dieta hiperlipídica (WTHL) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Oxidação proteica do tecido ovariano de fêmeas de camundongos wild type (alimentados com dieta padrão (WTS) e com dieta hiperlipídica (WTHL) e camundongas LDLr-/- alimentadas com dieta padrão (KOS) e com dieta hiperlipídica (KOHL).

Grupos	Oxidação proteica ovariana (nmol/g de proteína)
<b>WTS</b>	1,16E-8 ± 2,9E-9 <sup>b</sup>
<b>WTHL</b>	2,78E-8 ± 1,1E-8 <sup>b</sup>
<b>KOS</b>	1,53E-7 ± 1,0 E 8 <sup>a</sup>
<b>KOHL</b>	1,51E-7 ± 4,6E-9 <sup>a</sup>

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. Fonte: Autores

#### 4. Discussão

O presente trabalho avaliou o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica sobre a histologia ovariana e sobre o estresse oxidativo do tecido ovariano de fêmeas de camundongos wild type e LDLR<sup>-/-</sup>. Verificamos que após 60 dias de consumo de uma dieta hiperlipídica por fêmeas de camundongos wild type (WTHL) e por LDLR<sup>-/-</sup> (KOHL) não houve alterações na razão entre o peso ovariano (direito e esquerdo) e o peso corporal, não verificamos anormalidades anatômicas ovarianas e não observamos diferenças entre o número de folículos primários, secundários, antrais normais, antrais atresicos e corpos lúteos das camundongas de todos os grupos. Entretanto, houve o desenvolvimento de uma dislipidemia hipercolesterolêmica nas camundongas do grupo WTHL em relação ao grupo WTS e no grupo KOHL comparado ao seu controle KOS. No grupo KOHL, a ingestão de uma dieta hiperlipídica associada à hipercolesterolemia genética, foi marcada pelo aumento do HOMA-ir., caracterizando uma resistência insulínica, houve também a elevação da lipoperoxidação e da oxidação proteica do tecido ovariano, sugerindo o desenvolvimento do estresse oxidativo ovariano.

Nesta pesquisa, a análise dos resultados obtidos sobre a anatomia e a histologia ovariana, conjuntamente com a comparação do peso ovariano e o peso corporal dos animais, revelaram que a ingestão de uma dieta hiperlipídica durante 60 dias não ocasionou alterações morfológicas e histológicas aos ovários. Nos animais knockout (LDLR<sup>-/-</sup>), ausentes para o receptor de LDL, que receberam ou não dieta hiperlipídica (KOHL e KOS), também não ocorreram alterações morfológicas e histológicas ovarianas, não influenciando o processo de foliculogênese dessas camundongas.

Contudo, verificou-se que a ingestão de uma dieta hiperlipídica durante 60 dias causou uma dislipidemia hipercolesterolêmica nas camundongas do grupo WTHL e do KOHL, quando comparadas a seus respectivos grupos controles, com níveis de HDLc diminuídos. Resultado semelhante ao encontrado em trabalhos realizados em nosso laboratório na UNIFENAS (Garcia et al., 2011; Abreu et al., 2021) e em outras pesquisas (Martins et al., 2020).

A ingestão de uma dieta hiperlipídica associada à hipercolesterolemia genética no grupo KOHL gerou uma resistência insulínica, marcada por aumento do HOMA-ir., resultado descrito também por Abreu et al. (2021), aumentou a lipoperoxidação e a oxidação proteica do tecido ovariano. Há evidências sugerindo que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da resistência insulínica (Evans et al., 2002; Henriksen et al., 1997). O estresse oxidativo induz a um processo inflamatório que pode contribuir para o aumento da resistência insulínica (Abreu et al., 2021), já que locais específicos da transdução de vias de sinalização da insulina podem sofrer interferência de proteínas inflamatórias (Souza, 2018). E em todas partes dos ovários há receptores de insulina amplamente distribuídos, incluindo células de granulosa, da teca, do estroma e do oócito (Louhio et al., 2000).

Nesta pesquisa, o aumento da lipoperoxidação do tecido ovariano, indicando a ocorrência do estresse oxidativo no ovário pode estar causando a resistência insulínica também pela destruição das membranas das células ovarianas e consequente eliminação dos receptores de insulina ovarianos. Benzie (1996) afirmou que a lipoperoxidação consiste em uma série de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, causando a destruição de sua estrutura, colapso dos mecanismos de troca de metabólitos e, até a morte celular.

Neste trabalho, o aumento da oxidação proteica do tecido ovariano, medida pela proteína carbonila também pode estar relacionado à resistência insulínica, pela subtração das proteínas constituintes dos receptores de insulina. A carbonilação de proteínas ou enzimas altamente envolvidas com as vias de sinalização para insulina têm sido observadas sob condições de resistência à insulina (Carvalho-Filho et al. 2009; Curtis et al. 2012).

Além disso, sob condições de estresse oxidativo, altos níveis de EROS podem causar oxidação irreversível de macromoléculas, incluindo os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas e então levem a efeitos adversos como a alterações nas vias de sinalização ou ativação de vias de estresse sinalização (Gratas-Delamarche, 2014).

Entretanto, não se observou diferenças entre a dislipidemia alimentar (grupo WTHL) e a dislipidemia genética (grupo KOS), assim como não se notou diferenças entre estes dois grupos no HOMA-ir e nos índices de lipoperoxidação ovariana. Indicando que há necessidade de associação da dislipidemia genética à alimentar para o surgimento do estresse oxidativo ovariano e resistência insulínica do tecido ovariano.

## 5. Conclusão

A dislipidemia alimentar ou a dislipidemia genética isoladas não causaram alterações morfológicas e histológicas nos ovários, também não causaram o estresse oxidativo ovariano e resistência à insulina.

Quando houve associação entre a dislipidemia alimentar e a genética, ocorreu o estresse oxidativo ovariano e consequente resistência insulínica neste tecido. Entretanto, não provocaram alterações morfológicas e histológicas nos ovários de camundongas.

Como a associação entre a dislipidemia alimentar e a genética causaram o estresse oxidativo ovariano e a resistência insulínica neste tecido, sugere-se em trabalhos futuros investigar uma possível influência dessa associação em outras etapas importantes da reprodução, como o potencial do ovócito, a formação do zigoto, o processo de clivagem até a formação do embrião e o desenvolvimento fetal, que são essenciais para a fertilidade da fêmea.

## Referências

- Abreu, J. M., et al. (2021). Dyslipidemia's influence on the secretion ovarian's steroids in female mice. *Research, Society and Development*. v. 10, n. 13.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*. 79 (4), 829-843.
- Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Published online*: 06 Jul 2009. 233-261. <https://doi.org/10.3109/09637489609012586>
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.
- Carvalho-Filho, M. A., et al. (2009). Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia*. 52, 2425-34. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-009-1498-1>
- Curtis, J. M., et al. (2012). Protein carbonylation and metabolomic control systems. *Trends Endocrinol Meta*. 23, 399-406. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3408802>.
- Evans, J. L., et al. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 23:599 – 622.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. Amsterdam, NL. (78), 203-216.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, 18(6), 499-502.
- Garcia, J. A. D., et al. (2011). Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos (Antiinflammatory effect of high density lipoprotein on the cardiovascular system of hyperlipidemic mice). *Rev Port Cardiol*. 30 (10), 763–769.
- Giacomini, M. M., Hahn, S., & Siqueira, L. O. (2013). Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 34 (2).
- Gratas-Delamarche A., et al. (2014). Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory. *Free Radic Res*. 48(1), 93-108.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2002). *Tratado de fisiologia médica*. 10ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Hafez, E.S.E. & Hafez, B. (2004). *Reprodução Animal*. 7ed. Manole.
- Hedrick, C. C., Castellani, L. W., Wong, H., & Lusis, A. J. (2001). In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *Journal of lipid research*. 42(4), 563-570.
- Henriksen, E. J., et al. (1997). Stimulation by -lipoic acid of glucose transport activity in skeletal muscle of lean and obese Zucker rats. *Life Sci*. 61:805– 812.

- Hopps, E. & Caimi, G. (2013). Protein oxidation in metabolic syndrome. *Clinical and Investigative Medicine*. E1-E8.
- Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M. & Szamatowicz, M. (1999). Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular human reproduction*. 5(5), 409-413.
- Junqueira, L. C. U & Carneiro, J. (1979). *Histologia básica*. 4ª ed. Guanabara Koogan.
- Kheradmand, A., Alirezaei, M. & Birjandi, M. (2010). Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regul Pept*. Jun 8;162(1-3):84-9. doi: 10.1016/j.regpep.2010.02.008. Epub 2010 Feb 19. PMID: 20171996.
- Koche, J. C. (2011). *Fundamentos de metodologia científica*. Petrópolis: Vozes.
- Louhio, H., et al., (2000). The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular human reproduction*. 6 (8), 694-698.
- Martins, A. M., et al. (2020). Grape juice attenuates left ventricular hypertrophy in dyslipidemic mice. *Plos one*. v. 15, n. 9, p. e0238163.
- Moore, K. L. & Persaud, T. V. N. (1994). *Embriologia Clínica*. 5ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Sabatini, L., et al. (1999). Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 72(6), 1027-1034.
- Santos, I. S., et al. (2017). Insulin resistance is associated with carotid intima-media thickness in non-diabetic subjects. A cross-sectional analysis of the ELSA-Brasil cohort baseline. *Atherosclerosis*. v. 260, p. 34-40.
- Sarto, D. A. Q. S., et al. (2018). Dry Extract of *Passiflora incarnata* L. leaves as a Cardiac and Hepatic Oxidative Stress Protector in LDLr<sup>-/-</sup> Mice Fed High-Fat Diet. 61.
- Souza, C. T. (2018). Envolvimento da inflamação subclínica e do estresse oxidativo na resistência à insulina associada a obesidade. *HU rev*. 211-220.
- Sugino, N., et al. (1996). Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction*. 11(5), 1073-1078.
- Tamate, K., Sengoku, K., & Ishikawa, M. (1995). The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 21(4), 401-409.
- Tian, J, et al. (2006). Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 345(3), 1004-1009.
- Van Den Hurk, R. & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. (63), 1717–1751. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114>.
- Winterbourn, C. C. (1981). Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *FEBS Letters*. 128 (2), 339-342 [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80112-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80112-3).