

INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA PRESERVAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM CAMUNDONGOS AMES DWARF

TATIANA DANDOLINI SACCON¹; FABIANA MOREIRA²; RAFAEL GIANELLA MONDADORI³; LUIS AUGUSTO CRUZ⁴; ANDRZEJ BARTKE⁵; MICHAL M. MASTERNAK⁶; REBECA BELMONTE⁷; AUGUSTO SCHNEIDER⁸

¹*Universidade Federal de Pelotas – tati_dandolini@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - fabimorvet@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas - rgmondadori@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas- laugustocruz@gmail.com*

⁵*Southern Illinois University, Springfield - Estados Unidos – michal.masternak@ucf.edu*

⁶*University Of Central Florida, Orlando - Estados Unidos – abartke@siumed.edu*

⁷*Universidade Federal de Pelotas – beka_belmonte@hotmail.com*

⁸*Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Os camundongos Ames Dwarf (*df/df*) possuem deficiência na secreção de hormônio do crescimento (GH) e por isso tem níveis circulantes de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) e insulina muito baixos, vivendo em torno de 30-50% mais do que camundongos normais (AHMED; FARQUHARSON, 2010). Camundongos *df/df* carreiam uma mutação no gene Prop-1 (profeta do Pit1) que impede o desenvolvimento da glândula pituitária anterior (SORNSON et al., 1996), resultando em deficiência na secreção de GH (SORNSON et al., 1996).

O envelhecimento ovariano é um processo fisiológico com consumo folicular relacionado à redução na produção de hormônios esteroides, esse processo tem origem ainda na vida intrauterina, e então a partir da menarca até o início da transição menopausal ocorre todos os meses (BADALOTTI et al., 2013). Além disso, concomitante com o número reduzido de folículos, a qualidade dos ovócitos restantes nas fêmeas geralmente diminui com o avançar da idade, levando as taxas extremamente pobres de sucesso de tentativas de fertilidade natural e assistida (NAVOT et al., 1991).

Acredita-se que o eixo GH/IGF-1 funcional é importante para a eficiência máxima reprodutiva (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004). Foi demonstrado que o receptor para o hormônio do crescimento (GHR) tem direta relação na regulação do crescimento e desenvolvimento folicular, além de ter importância no crescimento tecidual de uma forma geral (AHMED; FARQUHARSON, 2010). A análise de cortes histológicos de ovários nos camundongos normais e com deleção do receptor do GH (GHRKO) de mesma idade mostraram que o camundongo GHRKO apresentava uma reserva maior de folículos (SLOT et al., 2006). Nesse sentido estudos mostraram que os camundongos GHRKO apresentam uma menor resposta a superovulação, mesmo conseguindo ovular normalmente, indicando um número menor de folículos aptos ao recrutamento (BACHELOT et al., 2002).

Diante do que foi apresentado, este estudo tem como objetivo analisar a quantidade de folículos nos estágios primordial, primário, secundário e total de folículos e o diâmetro destes folículos, bem como seus oócitos e núcleos em camundongos *df/df*, que não possuem secreção de GH e comprovar que estes podem ser um bom modelo de estudo para comprovar a relação entre o estado metabólico, o envelhecimento e a fertilidade.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado utilizando 8 camundongos fêmeas com 12 meses de idade, 4 camundongos normais e 4 camundongos *df/df*, os animais foram fornecidos pela University of Central Florida (EUA) e durante o experimento foram mantidos em estantes ventiladas, sob temperatura ($22\pm2^{\circ}\text{C}$) e umidade (40–60%) controladas. Estes animais passaram pelo processo de eutanásia, e o par de ovários foi coletado, e colocado em formol tamponado 10%, e logo após esse processo foram incluídos em parafina. Para avaliação, os ovários foram histologicamente processados, cortados sequencialmente e corados com hematoxilina-eosina. Utilizando microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x, os folículos ovarianos foram classificados, mensurados e quantificados a cada 6 cortes. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de t com o software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA), assumindo-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado um maior número de folículos primordiais nos camundongos *df/df* comparado aos normais (Tabela 1). Este dado nos revela que os folículos não estão evoluindo do estágio primordial para o primário, possivelmente devido ao reduzido nível sérico de IGF-I e insulina, indicando que estes camundongos podem ser um bom modelo de estudo para entender a relação entre o estado metabólico, o envelhecimento ovariano e a preservação da fertilidade. O número de folículos secundários e terciários não foi diferente ($P>0,05$) entre camundongos Ames Dwarf e normais. O número total de folículos tendeu ($P=0,07$) a ser maior em camundongos Ames Dwarf do que Normais.

Tabela 1. Número de folículos e diâmetro do núcleo, oócito e folículo em ovários de camundongos Ames Dwarf e normais. Pelotas, RS, 2015.

| | <i>Ames Dwarf (EP^a)</i> | <i>Normais (EP^a)</i> | <i>P</i> |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|----------|
| Folículo | | | |
| Total | 2.673 (± 209) | 1.668 (± 445) | 0,074 |
| Primordial | 1.548 (± 139) | 378 (± 125) | 0,001 |
| Primário | 840 (± 104) | 916 (± 302) | 0,797 |
| Secundário | 156 (± 19) | 330 (± 96) | 0,090 |
| Terciário | 129 (± 47) | 44 (± 24) | 0,209 |
| Diametro do núcleo (um) | | | |
| Primordial | 2,3 ($\pm 0,16$) | 2,6 ($\pm 0,3$) | 0,458 |
| Primário | 2,9 ($\pm 0,2$) | 3,4 ($\pm 0,4$) | 0,306 |
| Secundário | 5,8 ($\pm 0,5$) | 6,1 ($\pm 0,7$) | 0,700 |
| Terciário | 25,6 ($\pm 1,8$) | 19,6 ($\pm 2,6$) | 0,075 |
| Diâmetro do oócito (um) | | | |
| Primordial | 5,4 ($\pm 0,3$) | 6,7 ($\pm 0,4$) | 0,023 |
| Primário | 7,5 ($\pm 0,5$) | 9,2 ($\pm 1,2$) | 0,213 |
| Secundário | 21,7 ($\pm 1,2$) | 19,0 ($\pm 1,4$) | 0,178 |
| Terciário | 102,6 ($\pm 8,3$) | 107,4 (± 20) | 0,822 |
| Diâmetro do folículo (um) | | | |
| Primordial | 7,9 ($\pm 0,5$) | 8,8 ($\pm 0,6$) | 0,294 |
| Primário | 11,3 ($\pm 0,6$) | 13,9 ($\pm 1,4$) | 0,118 |
| Secundário | 41,9 ($\pm 5,3$) | 43,9 ($\pm 2,5$) | 0,742 |
| Terciário | 147,3 ($\pm 6,6$) | 165,7 ($\pm 16,4$) | 0,292 |

^aEP: erro padrão

A ativação da via do fator de transcrição ForkheadBox O3a (FOXO3a) é essencial para a iniciação do crescimento da reserva ovariana de folículo primordial (BROWN et al., 2010). Hiperfosforilação de FOXO3a resulta na sua exportação nuclear, culminando com a ativação global de folículos primordiais e falência ovariana prematura (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). A ativação da via FOXO3a é promovida pela insulina e IGF-I, e a redução da sinalização desta via parece estar envolvida na longevidade ovariana prolongada observada em animais GHRKO (BARTKE, 2008). Schneider et al. (2014) observaram em estudo com animais *df/df* uma menor expressão de FOXO3a nos ovários de camundongos mais velhos de ambos os genótipos (normal e *df/df*) e isso está associado a uma atividade ovariana reduzida. Mostraram também que as fêmeas *df/df* têm um nível mais baixo de FOXO3 fosforilada em oócitos de folículos primordiais/primário, que é um ativador importante do crescimento folicular (SCHNEIDER et al., 2014) e pode ser a causa da maior preservação da reserva ovariana observada no presente estudo.

Em estudo com animais GHRKO, Slot et al. (2006) verificaram que o número de folículos primordiais foi maior em animais GHRKO que em animais normais de mesma idade. Verificaram também que o tratamento desses animais GHRKO com IGF-I durante 14 dias resultou numa redução significativa do número de folículos primordiais por ovário para níveis semelhantes aos observados em normais (SLOT et al., 2006). Isso mostra que baixos níveis de IGF-1 acarretam no acúmulo de folículos primordiais, prolongando a duração da reserva ovariana. Estes resultados são semelhantes ao de nosso estudo e indicam que assim como a deficiência do GHR a deficiência de GH também causa atrasos no envelhecimento ovariano.

Xiang et al. (2012), relacionou os efeitos da RC na preservação ovariana, observaram que camundongos submetidos à RC apresentaram 47% mais folículos primordiais que camundongos submetidos a uma dieta controle, mostrando mais uma vez que reduções do eixo GH / IGF-1 ocasionadas pela RC também podem prolongar a atividade ovariana (XIANG et al., 2012).

Em relação ao diâmetro do folículo, oóцит e núcleo, foi encontrada diferença apenas no diâmetro de oócitos inclusos em folículos primordiais, sendo maior em camundongos normais do que em *df/df*. Não foi possível encontrar outros artigos discutindo esta relação de maneira específica, mas sabemos que o crescimento do oóцит está diretamente ligado e coordena o crescimento e ativação do folículo. Portanto, é interessante melhor explorar esta relação e entender se o oóцит é menor porque o folículo é menos desenvolvido ou se o menor tamanho do oóцит está freando o desenvolvimento folicular.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, observou-se que os camundongos Ames Dwarf apresentam um maior número de folículos primordiais em comparação a camundongos normais. Isto indica que a deficiência de GH, IGF-I e insulina acarreta no acúmulo de folículos primordiais e no o aumento da longevidade ovariana, podendo ser um importante fator regulador do envelhecimento ovariano em várias espécies mamíferas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. F.; FARQUHARSON, C. The effect of GH and IGF1 on linear growth and skeletal development and their modulation by SOCS proteins. *J Endocrinol*, v. 206, n. 3, p. 249-59, Sep 2010.

BACHELOT, A. et al. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 4104-12, Oct 2002.

BADALOTTI, M. et al. **Tratado de Reprodução Humana**. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana, 2013.

BARTKE, A. Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. **Aging Cell**, v. 7, n. 3, p. 285-90, Jun 2008.

BROWN, C. et al. Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKB alpha/Akt1. **Biol Reprod**, v. 82, n. 2, p. 246-56, Feb 2010.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 17-27, Jul 2004.

COSCHIGANO, K. T. et al. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3799-810, Sep 2003.

HOLZENBERGER, M. The GH/IGF-I axis and longevity. **Eur J Endocrinol**, v. 151 Suppl 1, p. S23-7, Aug 2004.

KALICH-PHILOSOPH, L. et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 185, p. 185ra62, May 15 2013.

MATTISON, J. A. et al. Studies of aging in ames dwarf mice: Effects of caloric restriction. **J Am Aging Assoc**, v. 23, n. 1, p. 9-16, Jan 2000.

NAVOT, D. et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. **Lancet**, v. 337, n. 8754, p. 1375-7, Jun 8 1991.

SCHNEIDER, A. et al. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, v. 7, n. 1, p. 284, Dec 29 2014.

SLOT, K. A. et al. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 525-32, Mar 2006.

SORNSON, M. W. et al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. **Nature**, v. 384, n. 6607, p. 327-33, Nov 28 1996.

XIANG, Y. et al. Calorie restriction increases primordial follicle reserve in mature female chemotherapy-treated rats. **Gene**, v. 493, n. 1, p. 77-82, Feb 1 2012.