

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

TATIANA DANDOLINI SACCON<sup>1</sup>; FABIANA MOREIRA<sup>2</sup>; LUIZ AUGUSTO CRUZ<sup>3</sup>; RAFAEL GIANELLA MONDADORI<sup>4</sup>; CARLOS CASTILHO DE BARROS<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tatisaccon@gmail.com](mailto:tatisaccon@gmail.com)

<sup>2</sup>Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari – [fabimorvet@gmail.com](mailto:fabimorvet@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [augustocruz@gmail.com](mailto:augustocruz@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rgmondadori@gmail.com](mailto:rgmondadori@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [barroscapel@gmail.com](mailto:barroscapel@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Camundongos Ames Dwarf (df/df) carregam uma mutação no gene profeta da pituitária 1 (Prop-1) que impede o desenvolvimento da glândula pituitária anterior, resultando em deficiência na secreção de GH (SORNSEN et al., 1996). Estes animais tem níveis circulantes muito baixos de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) e vivem em torno de 30-50% mais do que animais normais (AHMED; FARQUHARSON, 2010; ZHOU; YU; GE, 2015). Em contrapartida, animais transgênicos que superexpressam GH (bGH), possuem níveis plasmáticos elevados de GH, o que resulta no aumento de IGF-I no plasma sanguíneo, e vivem cerca de 50% menos que animais normais (BARTKE, 2003; BARTKE et al., 1988).

Um declínio progressivo e esgotamento da reserva de folículos ovarianos é o principal determinante da idade ao início da menopausa (FORTUNE et al., 2013). Além disso, concomitante com o número reduzido de folículos, a qualidade dos oócitos restantes nas fêmeas geralmente diminui com o avançar da idade (RICHARDSON et al., 2014). Neste sentido, o eixo funcional GH/IGF-I é importante para a normal função do ovário (MAHRAN et al., 2015). O tempo de vida reprodutiva dos camundongos df/df é prolongada, indicado pela presença de atividade ovariana em uma idade avançada, quando os camundongos normais já esgotaram as reservas ovarianas foliculares. Esta condição parece ocorrer devido à redução da progressão de folículos do estágio primordial para o estágio primário em camundongos df/df (SCHNEIDER et al., 2014). Já camundongos bGH tem puberdade adiantada e a taxa de ovulação aumentada (NAAR et al., 1991), porém não há evidências sobre a redução de sua vida reprodutiva.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários em ovários de animais df/df, com deficiência no GH endógeno, com e sem tratamento de GH exógeno e animais bGH, que superexpressam o GH endógeno.

### 2. METODOLOGIA

Os camundongos, todas fêmeas, foram divididos em seis grupos, Ames Dwarf sem tratamento de GH (df/df salina, n=6), Ames Dwarf com tratamento de GH (df/df GH, n=6), camundongos normais sem tratamento de GH (N salina, n=6) e normais com tratamento de GH (N GH, n=6), todos com idade entre 16 e 18 meses. Os outros dois grupos foram divididos em transgênicos que superexpressam GH (bGH, n=6) e normais (N, n=6), com idade entre 10 e 12 meses. Os grupos df/df GH e N GH foram submetidos a um tratamento com GH

suíno por injeção via subcutânea (0,4 µg/g de peso corporal por dia), dado 2 vezes ao dia, começando na idade de 14 meses, durante 6 semanas. Os animais foram eutanasiados, 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, os folículos ovarianos foram classificados, mensurados e quantificados a cada 6 cortes. Foi classificado como folículo primordial aquele que o oócito é rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas.

O folículo em transição foi classificado como aquele que continha ao menos uma célula da granulosa cuboide. O folículo primário foi classificado como aquele que contem um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cuboides. Um folículo foi determinado como sendo um folículo secundário quando rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboides, sem antro visível, e um folículo foi determinado como sendo um de folículos terciário se um espaço antral estiver claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa em torno do oócito (LI et al., 2015).

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Graphpad Prism 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA). O teste de Two-Way ANOVA foi realizado para estimar a diferença entre os grupos df/df (genótipo, tratamento com GH e interação genótipo\*tratamento). O teste de t foi realizado para estimar a diferença entre os grupos bGH e N.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Número de folículos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos normais e Ames Dwarf com e sem tratamento de GH exógeno.

Folículo	Normal		Ames dwarf		P value		
	Salina(±SEM) (n=6)	GH (±SEM) (n=6)	Salina (±SEM) (n=6)	GH (±SEM) (n=6)	Genótipo	Tratamento	Genot*Trat
Primordial	988 (±66)	728 (±28)	2162(±250)	1554(±148)	<0.0001*	0.009*	0.26
Transição	560 (±67)	454 (±25)	758 (±49)	698 (±47)	0.0002*	0.10	0.64
Primário	1242 (±77)	1172 (±96)	1092 (±110)	1132(±106)	0.34	0.88	0.58
Secundário	244 (±40)	146 (±26)	122 (±23)	228 (±47)	0.58	0.91	0.009*
Terciário	56 (±4)	42 (±8)	32 (±10)	22 (±7)	0.008*	0.12	0.79
Total	3090 (±147)	2542 (±122)	4166 (±179)	3634(±327)	<0.0001*	0.01*	0.97

\*\*valor p significativo

**Tabela 2.** Número de folículos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos transgênicos que superexpressa GH (bGH).

Folículo	Normal (±SEM) (n=6)	bGH (±SEM) (n=6)	P value
Primordial	898 (±43)	540 (±40)	0.0001*
Transição	540 (±40)	344 (±33)	0.0037*

Primário	1200 ( $\pm 44$ )	918 ( $\pm 36$ )	0.0006*
Secundário	226 ( $\pm 31$ )	496 ( $\pm 56$ )	0.0017*
Terciário	38 ( $\pm 7$ )	126 ( $\pm 11$ )	<0.0001*
Total	2902 ( $\pm 102$ )	2306 ( $\pm 77$ )	0.0009*

\*valor p significativo

Nenhum registro de quantificação folicular ovariana de camundongos df/df e bGH foi encontrado na literatura, nos mostrando que este dado é inédito. Os resultados deste estudo indicam que o eixo GH/IGF-I e suas vias de sinalização tem um papel importante na vida reprodutiva feminina. Os animais df/df apresentaram uma quantidade de folículos primordiais maior do que animais normais, mostrando que esses folículos estão retidos nessa fase e que a ausência de GH está envolvida nesta ativação, já que o tratamento com GH exógeno por seis semanas reverteu este processo. Em contrapartida observamos que animais bGH possuem uma quantidade de folículos primordiais menor que os normais, mostrando que o aumento de GH leva a uma maior ativação da reserva ovariana, afirmando o papel deste hormônio na vida reprodutiva (Tabelas 1 e 2).

Em estudo com camundongos com deleção (*Knockout*) para o receptor de GH (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 restrição calórica (RC) na preservação ovariana, observaram que camundongos submetidos à RC apresentaram aumento de 47% no número de folículos primordiais em relação a camundongos submetidos a uma dieta controle, mostrando mais uma vez que reduções do alterações GH/IGF-1 ocasionadas pela RC também podem prolongar a atividade ovariana (XIANG et al., 2012). Ao contrário dos animais df/df, os camundongos bGH apresentam uma ativação da reserva ovariana muito mais intensa, provado pela quantidade de folículos primordiais menor que seus controles e pela maior quantidade de folículos secundários e terciários. Estes dados indicam que mesmo variação transientes no nível de GH para mais ou para menos são capazes de afetar a taxa de envelhecimento ovariano.

#### 4. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados podemos afirmar que o eixo GH/IGF-1 influencia na ativação dos folículos primordiais, e assim influenciando na preservação da reserva ovariana. Mais estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos na maior preservação da reserva ovariana nos camundongos com deficiência no eixo GH/IGF-1. Entender estes mecanismos pode mostrar um caminho para desenvolver fármacos que mimetizem os efeitos benéficos desses animais modelos de envelhecimento, além do aumento do tempo de vida reprodutiva em mulheres.

## 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.

BARTKE, A. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 4, p. 210-6, Oct 2003.

BARTKE, A. et al. Infertility in transgenic female mice with human growth hormone expression: evidence for luteal failure. **J Exp Zool**, v. 248, n. 1, p. 121-4, Oct 1988.

FORTUNE, J. E. et al. Triennial Reproduction Symposium: the ovarian follicular reserve in cattle: what regulates its formation and size? **J Anim Sci**, v. 91, n. 7, p. 3041-50, Jul 2013.

LI, L. 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**, v. 22, n. 1, p. 60-7, Jan 2015.

MAHRAN, Y. F. et al. Growth Hormone Ameliorates the Radiotherapy-Induced Ovarian Follicular Loss in Rats: Impact on Oxidative Stress, Apoptosis and IGF-1/IGF-1R Axis. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140055, 2015.

NAAR, E. M. et al. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. **Biol Reprod**, v. 45, n. 1, p. 178-87, Jul 1991.

RICHARDSON, M. C. et al. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 3, p. 353-69, May-Jun 2014.

SCHNEIDER, A. et al. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, v. 7, p. 120, 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.

SORNSEN, 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.

ZHOU, R.; YU, S. M.; GE, W. Expression and functional characterization of intrafollicular GH-IGF system in the zebrafish ovary. **Gen Comp Endocrinol**, Nov 30 2015.