

## INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA PRESERVAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM CAMUNDONGOS AMES DWARF COM 6 MESES DE IDADE

TATIANA DANDOLINI SACCON<sup>1</sup>; RAFAEL GIANELLA MONDADORI<sup>2</sup>; KELVIN RUAN ANDRADE<sup>3</sup>; CARLOS CASTILHO DE BARROS<sup>4</sup>; MICHAL M. MASTERNAK<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>Universidade Federal de Pelotas – [rgmondadori@gmail.com](mailto:rgmondadori@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [kelvinruan2@hotmail.com](mailto:kelvinruan2@hotmail.com)

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

<sup>5</sup>University Of Central Florida, Orlando - Estados Unidos – [abartke@siuimed.edu](mailto:abartke@siuimed.edu)

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

### 1. INTRODUÇÃO

Animais que possuem deficiência na secreção de hormônio do crescimento (GH) 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). 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). 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).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários em ovários de animais df/df com 6 meses de idade, já que dados de animais de 12 e 18 meses de idade já foram publicados por nosso grupo.

### 2. METODOLOGIA

Os camundongos, todas fêmeas, foram divididos em dois grupos, camundongos Ames Dwarf (df/df, n=4) e camundongos normais (N, n=4), todos com idade de 6 meses. 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. As amostras de ovários foram cedidas pela Universidade Central da Flórida, Flórida, USA. Para avaliação, os ovários foram histologicamente processados, cortados sequencialmente e corados com

hematoxilina-eosina. Utilizando microscópio óptico, os folículos ovarianos foram classificados, e quantificados a cada 6 cortes. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste t com o software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, USA), assumindo-se um nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folículos primordiais foi maior em animais *df/df* ( $p=0,002$ ). Os folículos primários, secundários e terciários foram maiores em animais normais comparado com os animais *df/df* ( $p=0,023$ ,  $p=0,005$  e  $p=0,019$ , respectivamente). Os dados estão apresentados na figura 1.

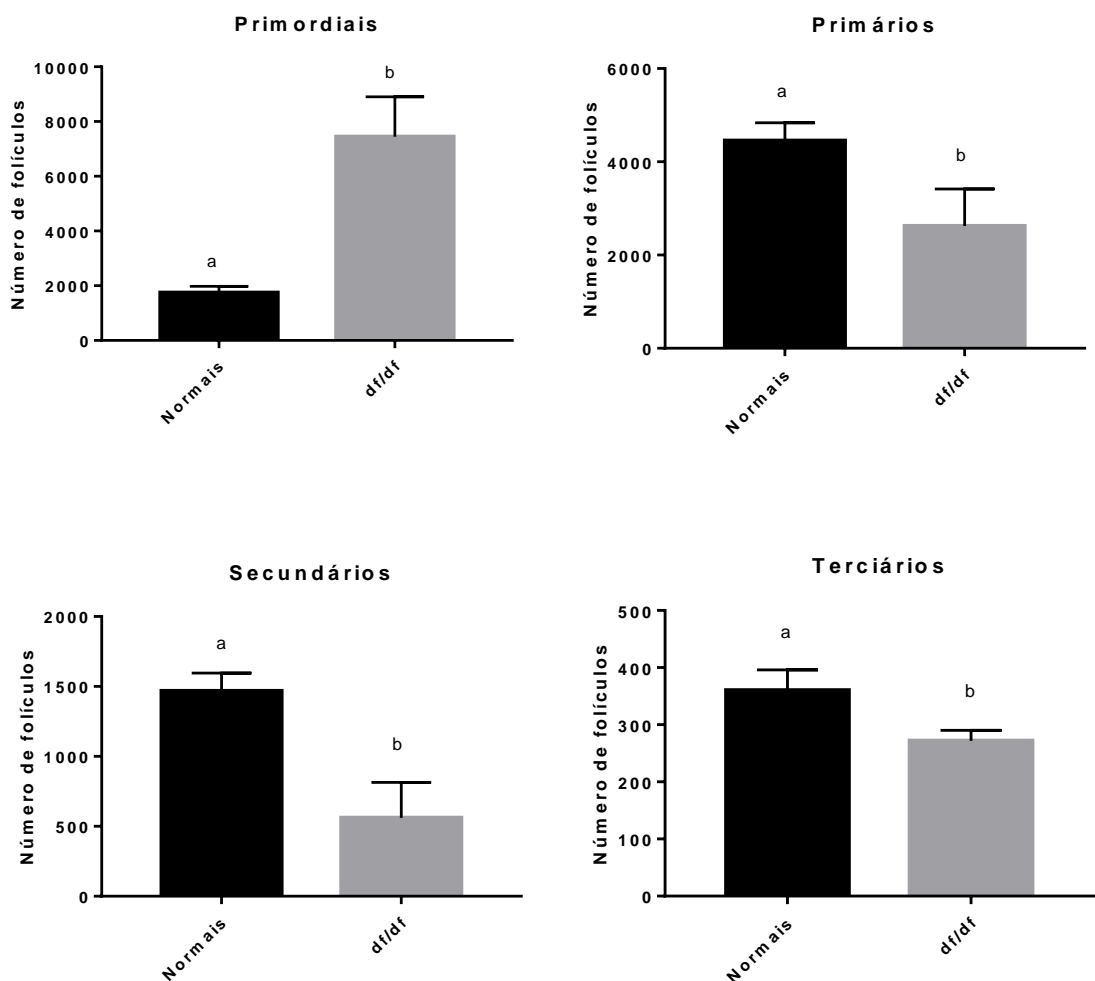


Figura 1. Número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários em animais Ames Dwarf (*df/df*) ( $n=4$ ) e Normais ( $n=4$ ). Diferentes letras significam diferença estatística.

Já é bem estabelecido em estudos de biologia reprodutiva que o eixo GH/IGF-I é importante para a função normal do ovário (CHANDRASHEKAR et al., 2004). Camundongos fêmeas *df/df* apresentam ciclos estrais normais e conseguem ovular (BARTKE et al., 2001), e a gestação normal pode ser estabelecida através do tratamento com prolactina após a ovulação (BARTKE, 1966). Outros resultados de nossos estudos também indicam que o eixo GH/IGF-I

e suas vias de sinalização tem um papel importante na vida reprodutiva feminina. Os animais df/df com 18 meses de idade apresentaram uma quantidade de folículos primordiais maior do que animais normais de mesma idade, 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 foi capaz de reverter este processo em animais df/df. Em contrapartida observamos que animais transgênicos que superexpressam GH, aos 12 meses de idade, possuem uma quantidade de folículos primordiais menor que os normais de mesma idade, mostrando que o aumento de GH leva a uma maior ativação da reserva ovariana, reafirmando o papel deste hormônio na vida reprodutiva (SACCON et al., 2016).

As porcentagens de folículos primordiais em relação ao número total de folículos variam muito entre camundongos df/df e normais. Aos 6 meses de idade, a diferença de porcentagem chega a ser de 47% mais folículos primordiais nos camundongos df/df. Aos 12 meses a diferença cai para 40% e aos 18 meses 20% (SACCON et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017). Mesmo que essa diferença tenha caído com o passar do tempo ainda é uma grande diferença de folículos primordiais, mostrando o quanto esses camundongos estão preservando sua reserva ovariana.

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).

#### 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 humana.

#### 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.
- BARTKE, A. Reproduction of female dwarf mice treated with prolactin. **J Reprod Fertil**, v. 11, n. 2, p. 203-6, Apr 1966.
- BARTKE, A. et al. Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 1, p. 21-8, Jan 2001.
- CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 17-27, Jul 2004.
- 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.
- 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.
- SACCON, T. D. 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**, Oct 19 2016.
- SCHNEIDER, A. et al. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, v. 7, p. 120, 2014
- SCHNEIDER, A. et al. Ovarian transcriptome associated with reproductive senescence in the long-living Ames dwarf mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 439, p. 328-336, Jan 05 2017.
- 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.
- 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.