

Influência do hormônio de crescimento na preservação da reserva ovariana e presença de macrófagos em ovários de camundongos Ames Dwarf

**MARIA ISABEL SCHIAVON COUSEN¹; KAREN BUBOLZ VIGORITO²;
JORGEA PRADIEE²; DRIELE NESKE²; TATIANA DANDOLINI SACCON²
AUGUSTO SCHNEIDER³**

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – isabelcousen@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas 2– karenbubolz@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tatisaccon@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jorgeaPradiee@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Camundongos *Ames Dwarf* (df/df) fazem parte de uma linhagem que carregam uma mutação no gene *Prop1* (profeta da pituitária¹), que reduz a secreção do hormônio do crescimento (GH) e consequentemente os níveis séricos do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (BARTKE, 2008; BARTKE et al., 2001; SORNSON et al., 1996). Além disso, camundongos df/df possuem uma sobrevida de 35-75%, quando comparados aos camundongos normais (BROWN-BORG et al., 1996).

Um declínio progressivo e o esgotamento da reserva ovariana é o principal determinante do 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 (SACCON et al., 2016). 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).

O processo de envelhecimento é responsável pela redução da fertilidade, dado o esgotamento das reservas ovarianas (TE VELDE et al., 1998). Bem como, ao aumento do estresse oxidativo e desencadeamento do processo inflamatório (NELSON; TELFER; ANDERSON, 2013). Vários relatos apoiam a ideia de que macrófagos agem diretamente nos folículos saudáveis e atresícos, bem como nos corpos lúteos, participando da apoptose e angiogênese (TURNER et al., 2011; WU et al., 2004). No entanto, poucos estudos têm sugerido que uma maior infiltração de macrófagos nos ovários pode estar envolvida na maturação de folículos em mamíferos (BARAVALLE et al., 2015; NTEEBBA et al., 2013).

Portando, o objetivo deste estudo foi avaliar o tamanho da reserva ovariana em camundongos df/df com 6 meses de idade, além de quantificar a infiltração de macrófagos.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado utilizando 10 camundongos fêmeas com 6 meses de idade, 5 camundongos normais e 5 camundongos *df/df*. Os animais foram fornecidos pela University of Central Florida (EUA) e durante o experimento foram mantidos em estantes ventiladas, sob temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (40–60%) controladas (MASTERNAK et al., 2004). Estes animais passaram pelo processo de eutanásia, e o par de ovários foi coletado, e colocado em formol tamponado 10%, após esse processo foram incluídos em parafina. Os ovários foram histologicamente processados, cortados sequencialmente. Para quantificação folicular as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina. Utilizando microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x, os folículos ovarianos foram classificados de acordo com o número de camadas em torno do oócito e quantificados a cada 6 cortes. O protocolo de imunofluorescência foi ajustado de acordo com o descrito previamente por nosso grupo (SACCON et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2014). Para quantificar infiltração macrocítica o anticorpo anti-CD68 (1:800 ab125212, Abcam®, Cambridge, UK) foi utilizado. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de t com o software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, USA), assumindo-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Número de folículos em ovários de camundongos Ames Dwarf e normais.

Classe Folículo	Normais	<i>Ames dwarf</i>	P
Primordial	1744(± 138)	7448(± 840)	0,002*
Primário	4452(± 223)	2620(± 460)	0,026*
Secundário	1468(± 74)	560(± 146)	0,005*
Terciário	360(± 21)	272(± 11)	0,019*
Totais	8024(± 167)	10900(± 244)	0,11

Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média

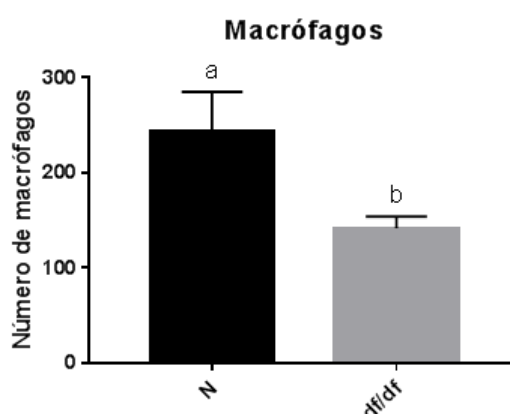


Figura 1. Número de macrófagos em ovários de camundongos *Ames dwarf* (*df/df*) e normais (N).

Nenhum registro de quantificação folicular ovariana em animais *df/df* com 6 meses de idade foi encontrado na literatura, indicando que este dado é inédito. Observamos que camundongos *Ames dwarf* apresentam uma preservação maior da reserva ovariana, dado a maior presença de folículos primordiais quando

comparados a animais normais (Tabela 1), bem como menor infiltração de macrófagos (Figura 1).

O menor envelhecimento ovariano dos camundongos df/df pode explicar a presença reduzida de macrófagos, pois há uma tendência desses se localizarem em tecidos ovarianos maduros, acredita-se que os mesmos podem desempenhar um papel funcional na vasculatura lútea, muito possivelmente por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas (TURNER et al., 2011).

Outros estudos já demonstraram que animais df/df de 12 e 18 meses, possuíam uma reserva maior de folículos primordiais do que animais normais de mesma idade, mostrando que esses folículos estão retidos nessa fase e que a ausência de GH está envolvida na ativação (SACCON et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017). Em contrapartida, animais que superexpressam GH, aos 12 meses, possuíam uma menor reserva ovariana quando comparados ao grupo controle, afirmando, assim, a relação desse hormônio com a função reprodutiva (SACCON et al., 2016). Similarmente aos animais df/df, camundongos com deleção para o receptor de GH (GHRKO) apresentam uma maior preservação do estoque germinativo se comparados aos normais, Slot et. al, 2006, verificaram que o tratamento desses animais GHRKO com IGF-I durante 14 dias resultou numa redução significativa do número de folículos primordiais, afirmando assim, a relação positiva do eixo GH/IGF1 na adequada função reprodutiva ovariana (SLOT et al., 2006). Nossos resultados indicam que o eixo GH/IGF-I e suas vias de sinalização desempenham um papel fundamental na vida reprodutiva feminina e que a presença de macrófagos no tecido ovariano, pode estar associada a uma resposta inflamatória e presença de células senescentes em animais normais. Assim, fica claro que o GH tem papel essencial na preservação da reserva ovariana.

4. CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível observar uma maior preservação da reserva ovariana nos camundongos Ames dwarf, assim como, uma menor infiltração de macrófagos quando comparados aos camundongos normais. Estes dados indicam que o eixo GH/IGF1 desempenham um papel regulatório no processo de envelhecimento ovariano, e que a deficiência de GH está relacionada com o prolongamento da vida fértil, bem como menor perfil inflamatório. Novos estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos na maior preservação da reserva ovariana e menor infiltração macrocitária nos ovários destes animais, possibilitando a criação de fármacos que mimetizem os efeitos benéficos presentes nestes animais modelos de envelhecimento, que forneçam tais vantagens na vida reprodutiva humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAVALLE, M. E. et al. Altered Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. **J Comp Pathol**, v. 153, n. 2-3, p. 116-30, Aug-Oct 2015.

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.

BARTKE, A. et al. Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 1, p. 21-8, Jan 2001.

BROWN-BORG, H. M. et al. Dwarf mice and the ageing process. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 33, Nov 7 1996.

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.

MASTERNAK, M. M. et al. Divergent effects of caloric restriction on gene expression in normal and long-lived mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 59, n. 8, p. 784-8, Aug 2004.

NELSON, S. M.; TELFER, E. E.; ANDERSON, R. A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. **Hum Reprod Update**, v. 19, n. 1, p. 67-83, Jan-Feb 2013.

NTEEBBA, J. et al. Diet-induced obesity alters immune cell infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. **Mol Reprod Dev**, v. 80, n. 11, p. 948-58, Nov 2013.

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, 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.

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.

TE VELDE, E. R. et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol Cell Endocrinol**, v. 145, n. 1-2, p. 67-73, Oct 25 1998.

TURNER, E. C. et al. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. **Reproduction**, v. 141, n. 6, p. 821-31, Jun 2011.

WU, R. et al. Macrophage contributions to ovarian function. **Hum Reprod Update**, v. 10, n. 2, p. 119-33, Mar-Apr 2004.