

## Danos no DNA e número de células de granulosa nos folículos primordiais e primários em camundongos Ames Dwarf deficientes de GH

KAREN BUBOLZ VIGORITO<sup>1</sup>; DRIELE NESKE GARCIA<sup>2</sup>; JORGEA PRADIEE<sup>3</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>4</sup>; RAFAEL GIANELA MODADORI<sup>5</sup>; TATIANA DANDOLINI SACCON<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – karenbubolz@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – drika\_neske@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jorgeapradiee@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - rgmondadori@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – tatisaccon@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH) desempenha importante papel no processo de envelhecimento juntamente com o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (BARTKE, 2011). Os camundongos Ames Dwarf apresentam deficiência na secreção de GH circulante (BROWN-BORG et al., 1996) devido uma mutação no gene Prop – 1 (*Prophet of Pituitary Factor-1*). Curiosamente, eles vivem cerca de 40% a 75% mais que os camundongos de linhagem normal (BROWN-BORG et al., 1996) além de demonstrarem uma maior resistência ao estresse oxidativo (BARTKE et al., 2013).

Observou-se que a deficiência de GH/IGF-I está relacionada como prevenção para algumas doenças ligadas ao envelhecimento (JUNNILA et al., 2013). O envelhecimento é um redutor da fertilidade em razão da redução da reserva de óócitos ovarianos (VELDE et al., 1998) que em camundongos resultam em um estado de infertilidade natural ao meio de sua vida cronológica a medida que essas reservas se esgotam (GOSDEN, et al., 1983; PEREZ et al., 2007).

A degradação qualitativa dos óócitos implica em uma extrema redução da qualidade da fertilidade, eventos estes, que podem dispor de uma divisão irregular de cromossomos e redução da qualidade mitocondrial, o que inclui o acúmulo de mutações no DNA e baixa produção de ATP, bem como, a elevação do estresse oxidativo e a redução dos níveis antioxidantes (NELSON et al., 2013; MELDRUM et al., 2016; WILDING, 2015).

O dano no DNA pode ser problemático para as células que se dividem lentamente, pois há uma tendência para a lesão não reparada se aglomerar com o passar do tempo. Em contrapartida, quando há uma acelerada replicação celular, o dano de DNA não compensado, que não mata a célula e bloqueia a replicação, vai ter a tendência de causar falhas de replicação (BEST, 2009), e consequentemente poderá ocasionar mutagênese grave, o que possivelmente, pode acarretar no desenvolvimento de câncer (PANIER e BOULTON, 2014).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar danos no DNA de óócitos e células da granulosa de camundongos Ames Dwarf através da marcação da proteína H2ax além de, quantificar as células da granulosa.

### 2. METODOLOGIA

Os ovários foram cedidos pela Universidade Central da Flórida, Orlando, USA. Foram utilizados 10 animais divididos em dois grupos: camundongos normais (n=5)

e Ames Dwarf ( $n=5$ ) todos fêmeas, criados e mantidos sob condições adequadas de temperatura e luz ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 horas luz/12 horas escuro) (MASTERNAK et al., 2004). As fêmeas foram eutanasiadas aos 6 meses de idade e o par de ovários removido e armazenado em solução formol tamponado a 10%. Após, passaram pelo processo de parafina e foram seccionados para a montagem de lâminas histológicas as quais foram coradas com Hematoxilina-eosina (HE). As imagens dos cortes foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan), utilizando objetivas de 10 e 40X. Para o método de imunofluorescência foi utilizado o anticorpo policlonal marcador de dano ao DNA anti-H2A.X (fosfo S139) diluído de acordo com a padronização e o protocolo foi ajustado (SACCON et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2014). A quantificação de dano de DNA foi realizada através da contagem de pontos fluorescentes no núcleo e para verificação das análises estatísticas o programa Graph Pad Prism 7 foi utilizado, assumindo um nível de significância de 95%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram um menor número de focos de H2AX em oócitos e células da granulosa em camundongos Ames dwarf, tanto em folículos primordiais como primários (Tabela 1). Além disso, os camundongos Ames dwarf tinham menos células da granulosa em torno de oócitos de folículos primordiais e primários (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de focos de danos no DNA (h2Ax) em oócitos e células da granulosa e número de células da granulosa de folículos primordiais e primários em camundongos normais ( $n=5$ ) e Ames Dwarf ( $n=5$ ) com 6 meses de idade. Pelotas, 2018.

	Normais	Ames Dwarf	p value
<b>Número de focos de h2Ax em oócitos (<math>n=20</math>)</b>			
Folículos primordiais	5 ( $\pm 0.4$ )	2.3 ( $\pm 0.3$ )	<0.0001
Folículos primários	9.1 ( $\pm 1.3$ )	3.8 ( $\pm 0.4$ )	0.0004
<b>Número de focos de h2Ax em células da granulosa (<math>n=20</math>)</b>			
Folículos primordiais	4.5 ( $\pm 0.6$ )	2.3 ( $\pm 3.5$ )	0.004
Folículos primários	7.4 ( $\pm 0.8$ )	3.6 ( $\pm 0.5$ )	0.0006
<b>Número de células da granulosa (<math>n=20</math>)</b>			
Folículos primordiais	8 ( $\pm 0.4$ )	5.3 ( $\pm 0.5$ )	0.003
Folículos primários	17.9 ( $\pm 2.7$ )	12.3 ( $\pm 0.7$ )	0.02

Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média

Nosso estudo encontrou redução dos focos de H2AX nos ovários de camundongos df/df. Isto indica uma menor ocorrência de dano no DNA no ovário destes animais. Foi demonstrado que a mutação no gene prop1 em camundongos df/df causa atraso no envelhecimento ovariano (SCHNEIDER et al., 2014). Um estudo demonstrou uma atividade diminuída nos níveis da enzima catalase (CAT) em camundongos df/df que receberam GH exógeno em comparação aos camundongos df/df que receberam solução salina (BROWN-BORG e RAKOCZY,

2003). Similarmente, camundongos df/df submetidos a dano oxidativo mostraram capacidade de resistir ao estresse elevada quando comparados aos camundongos normais (SHARMA et al., 2010). Evidentemente, os animais deficientes em GH apresentam uma maior resistência para o estresse, melhor sinalização de insulina e inflamação reduzida, o que contribui para o retardado do envelhecimento (BARTKE et al., 2013).

No presente estudo também foi observado um menor numero de células da granulosa em torno de óocitos de camundongos df/df. O número de células de granulosa está relacionado com uma maior nutrição e tamanho do óocito e consequentemente maior ativação dos folículos primordiais (GOUGEON e CHAINY, 1987). Nossa estudo mostra que estes folículos primordiais e primários de camundongos df/df apresentam menor número de células da granulosa, corroborando com outros estudos de nosso grupo que mostra que camundongos df/df apresentam uma maior reserva ovariana (SCHNEIDER et al., 2017 e SACCON et al., 2016), sugerindo que o número de células pode contribuir na preservação da reserva ovariana.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o GH está altamente relacionado com um maior estresse oxidativo que por sua vez, implica em uma maior quebra de fita dupla e consequentemente gera mais danos ao DNA, tendo em vista que, os camundongos df/df apresentam maior resistência ao estresse e um menor número de danos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTKE, A. Pleiotropic effects of growth hormone signaling in aging. **Trends Endocrinol Metab** 22(11), p. 437- 442, 2011.
- BARTKE, A., SUN , L.Y., LONGO, V. Somatotropic signaling: trade- offs between growth, reproductive development, and longevity. **Physiol. Rev** 93, p. 571–598, 2013.
- BEST, B.P. Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. **Rejuvenation Res.** 12, p. 199-208, 2009.
- BROWN-BORG, H.M., BORG, K.E., MELISKA, C.J., BARTKE, A. Dwarf mice and the ageing process. **Nature** 384(6604), p.33, 1996.
- BROWN-BORG, H.M., RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mech Ageing Dev** (124), p. 1013-1024, 2003.
- GOSDEN, R. G., LAING, S. C., FELICIO, L. S., NELSON, J. F., FINCH, C. E. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. **Biol. Reprod.** 28, p. 255-260, 1983.
- GOUGEON, A., CHAINY GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **J Reprod Fertil.** 81(2), p. 433-4, 1987.

JUNNILA, R.K., LIST, E.O., BERRYMAN, D.E., MURREY, J.W., KOPCHICK. J.J. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. **Nat Rev Endocrinol** 9(6), p. 366-376, 2013.

MASTERNAK, M.M., AL-REGAIEY, K., BONKOWSKI, M.S., PANICI, J., SUN, L., WANG, J., PRZYBYLSKI, G.K., BARTKE, A. Divergent effects of caloric restriction on gene expression in normal and long-lived mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 69(8), p. 784-788, 2004.

MELDRUM, D.R., CASPER, R.F., DIEZ-JUAN,A., SIMON, C., DOMAR, A.D., FRYDMAN, R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? **Fertil Steril** 105(3), p. 548-559, 2016.

NELSON, D.M., TELFER, E.E., ANDERSON, R.A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. **Hum Reprod** 19(1), p. 67-83, 2013.

PANIER, S., BOULTON, SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes focus. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 15, p. 7-18, 2014.

PEREZ, G.I., JURISICOVA, A., WISE, L., LIPINA, T., KANISEK, M., BECHARD, A., TAKAI, Y., HUNT, P., RODER, J., GRYNPAS, M., TILLY, J.L. Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 104(12), p.29-34, 2007.

SACCON, T.D., MOREIRA, F., CRUZ, L.A., MONDADORI, R.G., FANG, Y., BARROS, C.C., SPINEL, L., BARTKE, A., MASTERNAK, M.M., SCHNEIDER, A. 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** 455, p. 23-32, 2016.

SCHNEIDER, A., ZHI, X., MOREIRA, F., LUCIA, T.JR., MONDADORI, R.G., MASTERNAK, M.M. Primordial follicle activation in the ovary of Ames Dwarf mice. **J Ovarian Res** 7, p.120, 2014.

SCNHEIDER, A., MATKOVICH, S.J., SACCON, T., VICTORIA, B., SPINEL, L., LAVASANI, M., BARTKE, A., GOLUSINSKI, P., MASTERNAK, M.M. Ovarian transcriptome associated with reproductive senescence in the long-living Ames dwarf mice. **Mol Cell Endocrinol** (439), p.328-336, 2017.

SHARMA, S., RAKOCZY, S., DAHLHEIMER, K., BROWN-BORG, H. The hippocampus of Ames dwarf mice exhibits enhanced antioxidative defenses following kainic acid-induced oxidative stress. **Exp Gerontol** (12), p. 936-949, 2010.

VELDE, E. R., SCHEFFER, G. J., DORLAND, M., BROEKMAN, F. J., FAUSER, B. C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol. Cell. Endocrinol** 145, p. 67-73, 1998.

WILDING, M. Potential long-term risks associated with maternal aging (the role of the mitochondria). **Fertil Steril** 103(6), p. 1397-1401, 2015.