

17 α E2 PROMOVE O ENVELHECIMENTO EM CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA O RECEPTOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

JOSÉ VICTOR ISOLA¹; BIANKA ZANINI²; DRIELE NESKE³, MICHAEL STOUT⁴;
MICHAL MASTERNAK⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

^{1,2,3,4}*Universidade Federal de Pelotas — jvvisola@ufpel.edu.br*

⁴*University of Oklahoma*

⁵*University of Central Florida*

1. INTRODUÇÃO

Os camundongos com knockout do gene do receptor do hormônio do crescimento (GHRKO) são caracterizados por uma redução severa na produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) e redução do tamanho adulto, além de apresentarem longevidade prolongada, maior porcentagem de gordura corporal e maior sensibilidade à insulina (MASTERNAK et al., 2012). Muitas características dos camundongos GHRKO são semelhantes às dos animais submetidos a restrição calórica (RC), incluindo redução da massa corporal, diminuição da produção de IGF-I, plasticidade metabólica robusta e longevidade prolongada (LIST et al., 2011). A utilização da RC poderia ser empregada em humanos visando alcançar seus benefícios, no entanto seu emprego em humanos parece improvável devido a efeitos adversos. Portanto, intervenções farmacológicas que mitiguem morbidades relacionadas à idade podem revelar-se estratégias alternativas apropriadas. Estudos recentes mostraram que o 17 α -estradiol (17 α -E2) prolonga a vida saudável de camundongos machos de maneira semelhante à RC (GARRATT et al., 2019). 17 α -E2 é um estrogênio não feminilizante, devido à sua ativação mínima dos receptores clássicos de estrogênio (ANSTEAD et al., 1997). O tratamento com 17 α -E2 causa reduções na ingestão de energia devido à ativação das vias anorexigênicas hipotalâmicas, reduzindo assim a ingestão de alimentos (GARRATT et al., 2019).

A longevidade reprodutiva de uma fêmea depende do tamanho inicial da reserva ovariana de folículos primordiais e da taxa de depleção desses folículos (TE VELDE et al., 1998). A ativação e o recrutamento contínuo de folículos primordiais durante a vida da fêmea acabam resultando em um esgotamento completo dessa reserva (RICHARDSON et al., 2014). As fêmeas GHRKO têm uma reserva folicular primordial maior em comparação aos camundongos WT, mas quando tratadas com IGF1 exógeno, elas demonstram uma diminuição significativa no número de folículos primordiais (SLOT et al., 2006), o que demonstra efeitos do eixo GH/IGF1 na ativação dos folículos primordiais. A preservação da reserva folicular primordial também é observada em camundongos submetidos à RC (GARCIA, et al., 2018). Como a falta de sinalização de GH e RC está relacionada ao envelhecimento e à depleção da reserva ovariana, os medicamentos que podem aumentar a longevidade também podem diminuir a ativação dos folículos primordiais. Coletivamente, estudos com longevidade sugerem que diferentes tratamentos que prolongam a expectativa de vida também prolongam a fertilidade por diminuírem a ativação dos folículos primordiais.

Em machos, o 17 α -E2 tem efeitos semelhantes à deficiência de sinalização do GH e à RC (STOUT et al., 2017). Apesar disso, as fêmeas parecerem menos responsivas ao tratamento com 17 α -E2 (GARRATT et al., 2019). Ainda assim

podemos hipotetizar que o tratamento com 17α -E2 pode reduzir a depleção da reserva ovariana. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a reserva ovariana de camundongos normais e GHRKO tratados com 17α -E2.

2. METODOLOGIA

Camundongos do tipo-selvagem (WT; $n = 10$) e GHRKO ($n = 10$) de seis meses foram alojados individualmente a $24 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Os animais tiveram acesso ad libitum a comida e água. Os animais foram divididos em grupo controle ($n = 5$ WT e 5 GHRKO), que recebeu ração comercial e grupo tratamento ($n = 5$ WT e 5 GHRKO), que recebeu a mesma ração acrescida de 17α -E2 (14,4ppm). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética e uso de animais da Universidade da Flórida Central.

Os animais foram eutanasiados e seus ovários foram extraídos e colocados em formaldeído a 10% para análises histológicas. Para análise histológica, os ovários foram removidos do formaldeído, desidratados em álcool e xilol e embebidos em Paraplast Plus®. Os ovários em Paraplast Plus® foram então cortados sequencialmente a $5 \mu\text{m}$ em um micrótomo. Todo o ovário foi cortado. Uma seção a cada seis cortes foi colocada em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas. Imagens das seções ovarianas foram capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio, utilizando o software TC Capture com as lentes 10x e 40x. Os folículos contados foram multiplicados por seis, para contabilizar o método de amostragem, e por dois, para contabilizar os dois ovários da fêmea.

Os folículos foram classificados como primordiais quando cercados por uma única camada de células da granulosa achatadas, como primários quando cercados por uma única camada de células da granulosa cuboides e como folículo de transição quando cercados por células achatadas e cuboides. Os folículos eram considerados secundários quando cercados por mais de uma camada de células da granulosa mas sem antro visível e quando o folículo tinha um espaço antral claramente definido, este era classificado como folículo terciário.

Para análise estatística, uma ANOVA two-way foi realizada no software GraphPad Prism 6. A análise considerou o efeito do genótipo (GHRKO vs WT), tratamento (E2 vs CONT) e sua interação. Quando a interação foi significativa, as médias foram comparadas entre os grupos pelo teste post hoc de Tukey. Um valor de P menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folículos primordiais, de transição, primários, secundários, terciários e totais está apresentado na Figura 1. O número de folículos primordiais foi maior em camundongos GHRKO em comparação com outros grupos. O grupo WT- 17α E2 apresentou o maior número de folículos primários em comparação aos demais. Para folículos secundários, não foram observados efeitos de genótipo, dieta ou interação. Para folículos terciários, apenas a dieta teve efeito, com mais folículos terciários observados nos grupos tratados com 17α E2. Um efeito da dieta por interação genotípica foi encontrado no total de folículos, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

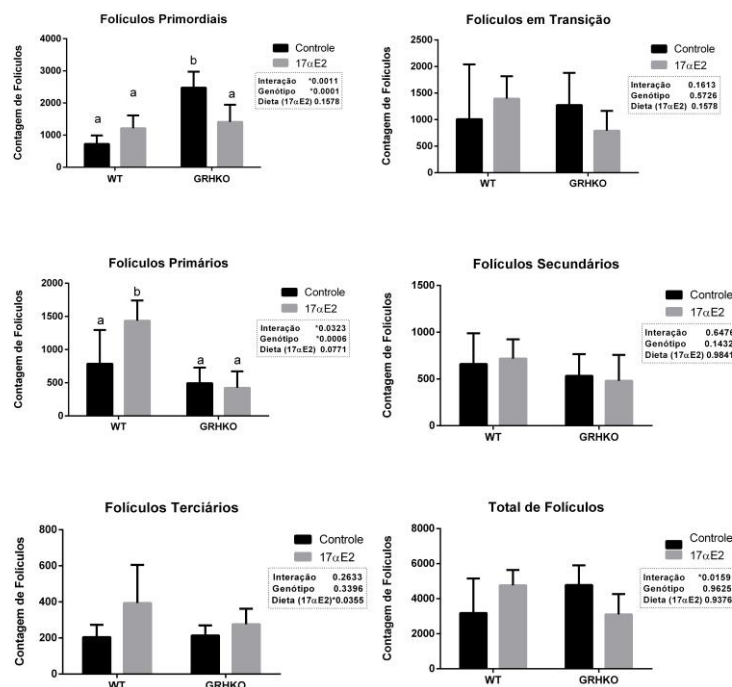


Figura 1 - Número de folículos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos do tipo selvagem (WT) e nocaute do receptor do hormônio do crescimento (GHRKO) tratados com 17α estradiol (17αE2) ou não (controle). * Letras diferentes indicam diferença estatística (p < 0,05)

A ativação reduzida dos folículos primordiais é sugerida pelo aumento do número de folículos primordiais e diminuição do número de folículos primários nos ovários de camundongos GHRKO (SLOT, et al 2006). O eixo GH/IGF-I é importante para a ativação dos folículos primordiais para iniciar seu crescimento, principalmente através da fosforilação da proteína FOXO3a (SACCON et al., 2017).

Curiosamente, o tratamento com 17α-E2 produziu uma interação ente dieta e genótipo no número de folículos primordiais. 17α-E2 reduziu o número de folículos primordiais nos camundongos GHRKO, porém não teve efeito na ativação folicular primordial em camundongos WT. O tratamento com 17α-E2 produziu efeitos do tipo RC em estudos anteriores. Os camundongos tratados com 17α-E2 sofrem redução do peso corporal, da massa adiposa e aumentam a sensibilidade à insulina (GARRATT et al., 2019). Esses efeitos são muito semelhantes ao fenótipo de camundongos GHRKO (LIST et al., 2011). Portanto, especulamos que o tratamento com 17α-E2 provocaria efeitos semelhantes na ativação dos folículos primordiais ovarianos. Outros demonstraram que a RC diminui a ativação dos folículos primordiais no ovário (GARCIA et al., 2018). No entanto, nossos dados sugerem que, embora a 17α-E2 esteja produzindo efeitos metabólicos semelhantes à deficiência de CR e GH, isso não se reflete no envelhecimento mais lento do ovário, como observado em outras terapias de extensão da vida.

4. CONCLUSÕES

Concluindo, observamos que os camundongos GHRKO apresentaram menor ativação dos folículos primordiais, preservando a reserva primordial. No entanto, 17α-E2 não teve efeito na reserva ovariana de camundongos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. **Steroids**, v.62, n.3, p.268-303, 1997.
- GARCIA, D. N.; SACCON, T. D.; PRADIEE, J.; RINCON, J. A. A.; ANDRADE, K. R. S.; ROVANI, M. T.; MONDADORI, R. G.; CRUZ, L. A. X.; BARROS, C. C.; MASTERNAK, M. M.; BARTKE, A.; MASON, J. B.; SCHNEIDER, A. (no prelo) Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience**, 2019.
- GARRATT, M.; LEANDER, D.; PIFER, K.; BOWER, B.; HERRERA, J. J.; DAY, S. M.; FIEHN, O.; BROOKS, S. V.; MILLER, R. A. 17-alpha estradiol ameliorates age-associated sarcopenia and improves late-life physical function in male mice but not in females or castrated males. **Aging Cell**, v.18, n.2, e.12920, 2019.
- LIST, E. O.; SACKMANN-SALA, L.; BERRYMAN, D. E.; FUNK, K.; KELDER, B.; GOSNEY, E. S.; OKADA, S.; DING, J.; CRUZ-TOPETE, D.; KOPCHICK, J. J. Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR^{-/-}) mouse. **Endocrinology Reviews**, v.32, n.3, p356-386, 2011.
- MASTERNAK, M. M.; BARTKE, A.; WANG, F.; SPONG, A.; GESING, A.; FANG, Y.; SALMON, A. B.; HUGHES, L. F.; LIBERATI, T.; BOPARAI, R.; KOPCHICK, J. J. & WESTBROOK, R. 2012. Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. **Aging Cell**, v.11, n.1, p.73-81, 2012.
- RICHARDSON, M. C.; GUO, M.; FAUSER, B. C. & MACKLON, N. S. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. **Human Reproduction Update**, v.20, n.3, p.353-69, 2014.
- 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.455, p.23-32, 2017.
- SLOT, K. A.; KASTELIJN, J.; BACHELOT, A.; KELLY, P. A.; BINART, N. & TEERDS, K. J. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. **Reproduction**, v.131, n.3, p.525-532, 2006.
- STOUT, M. B.; STEYN, F. J.; JURCZAK, M. J.; CAMPOREZ, J. G.; ZHU, Y.; HAWSE, J. R.; JURK, D.; PALMER, A. K.; XU, M.; PIRTSKHALAVA, T.; EVANS, G. L.; DE SOUZA SANTOS, R.; FRANK, A. P.; WHITE, T. A.; MONROE, D. G.; SINGH, R. J.; CASACLANG-VERZOSA, G.; MILLER, J. D.; CLEGG, D. J.; LEBRASSEUR, N. K.; VON ZGLINICKI, T.; SHULMAN, G. I.; TCHKONIA, T. & KIRKLAND, J. L. 17alpha-Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization. **The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v.72, n.1, p.3-15, 2017.
- TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. J. & FAUSER, B. C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, n.1-2, p.67-73, 1998.