

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

O papel do hormônio do crescimento na reserva ovariana em camundongos
modelo de restrição calórica

Tatiana Dandolini Saccon

Pelotas, 2016

Tatiana Dandolini Saccon

O papel do hormônio do crescimento na reserva ovariana em camundongos
modelo de restrição calórica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Coorientadores: Prof. Dra. Renata Torres Abib

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros

Pelotas, 2016

Tatiana Dandolini Saccon

O papel do hormônio do crescimento na reserva ovariana em camundongos
modelo de restrição calórica.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre
em Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade
de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 03 de março de 2016

Banca Examinadora:

.....

Prof. Dra. Renata Torres Abib

Doutora em Ciências Biológicas

.....

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros

Doutor em Biotecnologia

.....

Prof. Dr. **Joabel Tonello Dos Santos**

Doutor em Medicina Veterinária

Agradecimentos

Aos meus pais, Nivaldo e Lúcia Saccon, que me deram todo o apoio necessário para eu chegar aonde cheguei. Sem eles nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Anderson Wojciechowski, que esteve comigo em todas as etapas me dando apoio e me incentivando sempre.

Ao meu orientador, Augusto Schneider, que foi prestativo e paciente com minhas dúvidas e sempre esteve disposto a ajudar.

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia – UFPel - por ceder espaço para realização do meu trabalho, ao Professor Rafael Gianella Mondadori e aos técnicos, Eliane, Luis Augusto e Luis Otávio, que estiveram presente me dando apoio sempre que precisei.

À Faculdade de Medicina Veterinária - UFPel – Grupo Repropel – por ceder espaço para realização do meu trabalho e à Fabiana Moreira por me ajudar em tudo e por me passar um pouco de seu conhecimento.

Aos meus coorientadores, Renata Torres Abib e Carlos Castilho de Barros, por estar sempre dispostos a ajudar.

Às minhas amigas queridas, Aline Longo e Caroline Cardozo Bortolotto, que sempre me deram apoio.

Obrigada.

Resumo

SACCON, Tatiana Dandolini. O papel do hormônio do crescimento na reserva ovariana em camundongos modelo de restrição calórica. 2016. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários, bem como o diâmetro de núcleo, oócito e folículo, e os níveis das proteínas Forkhead Box O3a (FOXO3a) e Forkhead Box O3a Fosforilada (p-FOXO3a) em ovários de animais Ames Dwarf (df/df), com deficiência na secreção de hormônio do crescimento (GH), com e sem tratamento de GH exógeno e animais que superexpressam o GH endógeno (bGH). Os grupos que receberam GH exógeno foram submetidos a um tratamento com o hormônio suíno por injeção via subcutânea, dado duas vezes ao dia, começando na idade de quatorze meses, durante seis semanas. Após a eutanásia os ovários foram retirados. Foi realizada análise histológica para contagem de folículos ovarianos e diâmetros oocitários, nucleares e foliculares e análise de imunohistoquímica para avaliar a presença de proteínas FOXO3a e p-FOXO3a. Os grupos de animais df/df apresentaram uma quantidade de folículos primordiais, em transição e totais maiores que os animais normais ($p < 0,0001$, $p = 0,0002$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Os grupos que receberam o tratamento com GH apresentaram menor quantidade de folículos primordiais e totais ($p = 0,009$ e $p = 0,018$, respectivamente). O grupo de animais bGH apresentou uma quantidade de folículos primordiais, em transição, primários e totais menores que o grupo controle ($p = 0,0001$, $p = 0,0037$, $p = 0,0006$ e $p = 0,0009$, respectivamente). Na imunohistoquímica foi observado que em folículos primordiais dos grupos de animais normais a quantidade de proteínas FOXO3a e p-FOXO3a foi menor comparado aos grupos de animais df/df ($p = 0,009$ e $p = 0,01$, respectivamente). Os grupos com tratamento com GH apresentaram uma quantidade de proteína FOXO3a menor ($p = 0,03$) e p-FOXO3a maior ($p = 0,01$), em folículos primordiais, comparado com seus grupos controles. O grupo de animais bGH apresentou em folículos primários uma maior quantidade de p-FOXO3a comparada ao grupo controle ($p = 0,006$). Os animais df/df apresentam uma maior reserva ovariana e o tratamento com GH na vida adulta foi capaz de ativar a reserva tanto em animais normais quanto em df/df. O contrário foi observado em animais bGH, que apresentaram uma reserva ovariana menor que animais normais. Ainda, a presença de p-FOXO3a parece estar diretamente relacionada a ativação do crescimento folicular e estar sobre o controle do GH.

Palavras-Chave: hormônio do crescimento; reserva ovariana; restrição calórica; envelhecimento

Abstract

SACCON, Tatiana Dandolini. The role of growth hormone in the size of the ovarian reserve in a mice model of caloric restriction. 2016. Dissertation (Master Degree in Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The objective of this study was to evaluate the number of primordial, primary, secondary and tertiary follicles, as well as the diameter of the nucleus, oocyte and follicle, and the levels of proteins Forkhead Box O3a (FOXO3a) Forkhead Box O3A phosphorylated (p-FOXO3a) in ovaries of Ames Dwarf mice (df/df), with deficient secretion of endogenous growth hormone (GH), receiving or not treatment with exogenous GH; and mice that over express the endogenous GH (bGH). The groups that received exogenous GH were subjected to a treatment with the hormone by subcutaneous injection, given twice a day, starting at the age of fourteen months, during six weeks. After the euthanasia ovaries were removed. Histological analysis was performed to count ovarian follicles and oocyte, nuclear and follicular diameters, and immunohistochemical analysis to evaluate the presence of proteins FOXO3a and p-FOXO3a. The groups of df/df mice had higher number of primordial, in transition and total follicles than normal mice ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$ and $p < 0.0001$, respectively). The groups that received the treatment with GH had lower numbers of primordial and total follicles ($p = 0.009$ and $p = 0.018$, respectively). The group of bGH mice had lower numbers of of primordial, in transition, primary and total follicles than the control group ($p = 0.0001$, $p = 0.0037$, $p = 0.0006$ and $p = 0.0009$, respectively). In the immunohistochemistry was observed that in the primordial follicles of normal groups animals the quantity of proteins FOXO3a and p-FOXO3a was lower compared to groups of df/df mice ($p = 0.009$ and $p = 0.01$, respectively). The groups treated with GH had lower quantity of protein FOXO3a ($p = 0.03$) and higher quantity of FOXO3a ($p = 0.01$), in primordial follicles, compared with their control groups. The group of bGH mice presented a higher quantity of p-FOXO3a in primary follicles compared to control group ($p = 0.006$). df/df mice had a larger ovarian primordial follicle reserve than normal mice and the treatment with GH in adult life was able to activate reserve both normal and df/df animals. The opposite was observed in bGH, which presented a smaller ovarian reserve. In addition, the presence of the p-FOXO3a seems to be direct related to activation of primordial follicle growth and under the control of GH.

Key-words: growth hormone; ovarian reserve; caloric restriction; aging

Sumário

1 Revisão da Literatura	8
2 Introdução	14
3 Metodologia.....	16
4 Resultados	19
5 Discussão.....	29
6 Conclusão	32
Referências	33

1 Revisão da Literatura

O termo “reserva ovariana” refere-se ao potencial funcional do ovário e reflete o número e qualidade dos oócitos (RICHARDSON et al., 2014). A reserva ovariana é constituída por folículos primordiais, que são folículos em estado de dormência, juntamente com folículos já recrutados, que estão nas fases de desenvolvimento pré-antrais (primários e secundários) e antrais (terciários) (ZOU et al., 2009). A reserva de folículos ovarianos primordiais é estabelecida durante o desenvolvimento embrionário na maioria dos mamíferos, inclusive nos seres humanos, ou logo após o nascimento, que é o caso dos roedores. Esta reserva finita de folículos primordiais constitui a totalidade de oócitos que está disponível para uma fêmea durante sua vida reprodutiva, pois as células germinativas não podem se proliferar. Portanto, o tempo de vida reprodutiva de uma fêmea depende do tamanho inicial da reserva de folículos ovarianos primordiais e a taxa de esgotamento presente no ovário (FORTUNE et al., 2013). Com a diminuição gradual do número de folículos com a idade, uma sequência de eventos reprodutivos ocorre, começando com baixa fecundidade e esterilidade natural e progredindo através de irregularidades no ciclo menstrual até uma cessação completa da menstruação na menopausa (RICHARDSON et al., 2014).

Um folículo primordial é definido como um oócito rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas (LI et al., 2015). Estes folículos permanecem em estado de dormência por um tempo prolongado até que são ativados e começam a crescer, culminando com a ovulação ou atresia em algum momento do ciclo de crescimento. Um folículo primordial ativado não retorna a reserva (BAKER, 1963). O folículo primordial ativado se torna um folículo primário, que é aquele que contém um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cuboides no lugar das achatadas. Um folículo é determinado como sendo um folículo secundário se for rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboides, sem antro visível. Um folículo é determinado como sendo um de folículos antral ou terciário se possuir um espaço antral claramente definido e preenchido por líquido folicular e uma camada de células da granulosa de cumulus em torno do oócito. (LI et al., 2015). Podemos observar as características de cada folículo na Figura 1.

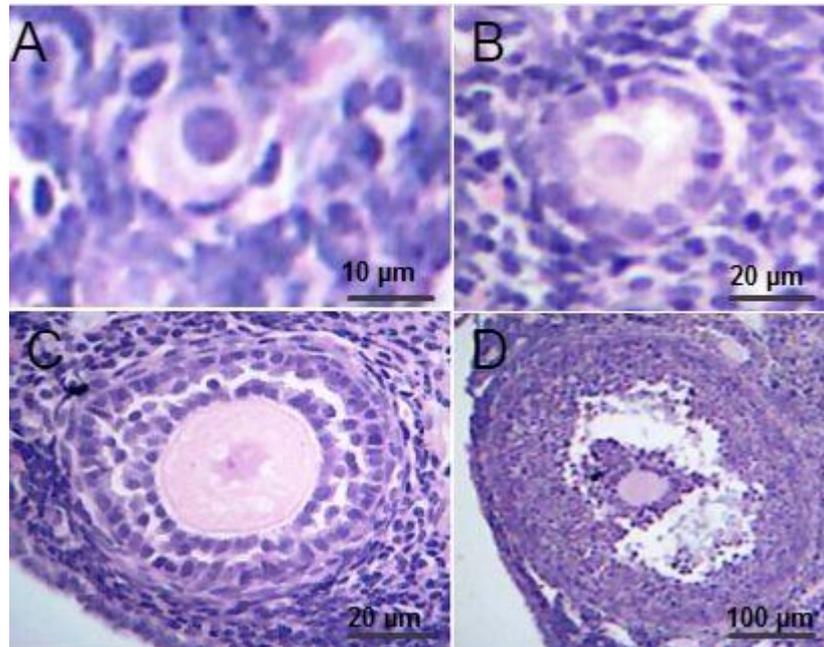


Figura 1. Imagem histológica de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Folículo primordial; (B) Folículo primário; (C) folículo secundário; (D) folículo antral ou terciário.

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio anabólico com efeitos pleiotrópicos sobre o crescimento, a diferenciação e o metabolismo das células (MAHRAN et al., 2015). O GH é liberado pela hipófise sob controle hipotalâmico. Embora os receptores de GH sejam encontrados em todo o corpo, a maioria dos efeitos de GH são mediadas pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), um hormônio produzido, principalmente no fígado, mas também em vários outros órgãos que são alvos do GH (ROCHA et al., 2007). Porém na maioria dos órgão que não o fígado o IGF-I é produzido de maneira independente do controle do GH (SCHNEIDER et al., 2014). Hormônios do eixo somatotrópico desempenham funções reguladoras na reprodução. Além disso, o eixo GH/IGF-I aumenta a sensibilidade de ovários para gonadotropinas e, assim, aumenta a estimulação e o desenvolvimento folicular (MAHRAN et al., 2015).

A ausência de ação de GH, seja através da falta de sua secreção hipotalâmica ou pela ausência de seus receptores nos diferentes tecidos do corpo, resulta em um fenótipo de reduzido tamanho corporal adulto (anão ou dwarf do inglês) com longevidade prolongada em roedores. Uma linhagem de

camundongos muito estudada e que são conhecidos por apresentar alterações no eixo somatotrópico é o Ames dwarf (*df/df*) (ROCHA et al., 2007). Camundongos *df/df* foram inicialmente descritos na literatura por Schaible e Gowen em 1961 (SCHAIBLE; GOWEN, 1961). Sornson e colaboradores em 1996 mostraram que o fenótipo destes animais é devido a uma mutação recessiva espontânea no gene profeta da pituitária 1 (Prop-1) (SORNISON et al., 1996). Camundongos homocigotos com esta mutação desenvolvem anormalidades em sua glândula pituitária, que carece de três tipos de células: somatotrópicas, lactotróficas e tireotróficas. Conseqüentemente, estes animais *df/df* possuem níveis plasmáticos indetectáveis destes hormônio que seriam produzidos por essas células, isto é, GH, prolactina e hormônio estimulador da tireóide, respectivamente (ZHOU, R.; YU; GE, 2015). Esses camundongos por possuírem esta deficiência de secreção do GH possuem níveis circulantes de IGF-I e insulina muito baixos, tem tamanho corporal diminuído e vivem em torno de 30-50% mais do que animais normais (AHMED; FARQUHARSON, 2010). Em contrapartida, camundongos transgênicos que superexpressam o GH (bGH) foram produzidos para estudar os efeitos do GH (SELDEN et al., 1986), e possuem níveis plasmáticos elevados de GH, resultando no aumento de IGF-I no plasma sanguíneo (MATHEWS et al., 1988), crescimento somático acelerado e peso corporal aumentado comparado a animais normais. De maneira interessante o tempo de vida desses animais é drasticamente reduzido em cerca de 50% (BARTKE, 2003). Isto indica que o GH/IGF-I tem papel central no crescimento corporal e longevidade.

A restrição calórica (RC) é um regime alimentar em que um organismo é submetido à redução da ingestão de alimentos sem que haja desnutrição e tem sido praticada como um método para aumentar a longevidade e a qualidade de vida a mais de 500 anos (SPEAKMAN; MITCHELL, 2011). Muitas características fenotípicas de animais sujeitos a RC são compartilhados pelos animais com a repressão da atividade do eixo GH/IGF-I, animais *df/df* e *Knockout* (nocauteados) para o receptor de GH (GHRKO), que são animais produzidos como um resultado da eliminação do gene para o receptor de GH e de proteínas de ligação a GH (ZHOU, Y. et al., 1997). Ou seja, redução do peso corporal, redução do GH e dos níveis de IGF-I, diminuição dos níveis plasmáticos de insulina e glicose, redução da fertilidade e puberdade atrasada. Com base nestas semelhanças, é possível que RC e a redução do eixo GH/IGF-I podem aumentar o tempo de vida por meio

de processos semelhantes (PANICI et al., 2010). McKee Alderman et al verificaram, através de uma revisão sistemática, que os animais df/df, por possuírem as mesmas características de animais submetidos a RC, é o melhor modelo animal para estudar todos os efeitos da RC, incluindo os efeitos na fertilidade (MCKEE ALDERMAN et al., 2010). De fato camundongos df/df submetidos a RC tem apenas um pequeno aumento na expectativa de vida (ARGENTINO et al., 2005), enquanto que camundongos GHRKO não tem nenhum benefício da RC, indicando a sobreposição dos mecanismos de ação (BONKOWSKI et al., 2006).

Além disso, mais recentemente tem sido proposto que os efeitos da ausência de sinalização do GH são dependentes do momento da vida em que isto ocorre. Um estudo comprovou que o tratamento transitório com GH exógeno no início da vida pode reduzir a longevidade e diminuir a resistência ao estresse celular em animais df/df. Injeções diárias de GH em camundongos df/df, entre a segunda e a oitava semana de vida, reduziu a longevidade destes animais, não sendo possível diferenciar dos animais normais (PANICI et al., 2010). Outro estudo avaliou o efeito do tratamento de GH em animais submetidos à RC e verificaram que os efeitos positivos da RC foram revertidos pelo tratamento hormonal (GESING et al., 2014). Desta maneira fica claro que mais estudos são necessários para entender os efeitos do momento do tratamento assim como de reversão dos efeitos benéficos de maneira mais tardia na vida do animal.

Sabe-se pelos estudos de reprodução que o eixo funcional GH/IGF-I é importante para a função normal do ovário, como mencionado anteriormente (MAHRAN et al., 2015). Apesar das fêmeas df/df serem inférteis, elas possuem ciclos hormonais normais e são capazes de ovular (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004). A infertilidade é resultado da incapacidade de manter a gestação e a gravidez normal pode ser obtida após tratamento com prolactina, com uma média de 2,6 filhotes vivos por gestação (BARTKE, 1966). Camundongos GHRKO e animais submetidos à RC, no entanto, são capazes de se reproduzir naturalmente, apesar de um número de filhotes reduzido, principalmente devido a uma redução do número de folículos antrais e, conseqüentemente, da taxa de ovulação (LI et al., 2011; MAHRAN et al., 2015).

Slot EI 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 com IGF-I durante 14 dias resultou numa redução significativa do número de folículos primordiais por ovário para níveis semelhantes aos observados em normais, mostrando que o processo de ativação dos folículos primordiais foi acelerado (SLOT et al., 2006). Em estudo realizado por Li et al. (2011), animais submetidos à RC apresentaram 37% mais folículos primordiais que os animais do grupo controle (LI et al., 2011). Xiang et al (2012), também relacionaram os efeitos da RC na preservação ovariana, e observaram que camundongos submetidos à RC apresentaram 47% mais folículos primordiais que camundongos submetidos a uma dieta controle, mostrando que a RC é benéfica para a preservação ovariana (XIANG et al., 2012). Já os animais bGH apresentam puberdade adiantada e vida reprodutiva reduzida (BARTKE et al., 1988).

O Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (FOXO3a) é o fator de transcrição mais importante da via de sinalização do IGF-I e insulina (DONG et al., 2008). A FOXO3a é uma subfamília dos fatores de transcrição FOXO, que tem por característica possuir um domínio específico que se liga ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (GENIN et al., 2014). Em mamíferos, esta subfamília, FOXO3a, está envolvida em uma grande variedade de importantes processos celulares que regulam o a resistência ao estresse oxidativo, o metabolismo, o controle do ciclo celular e apoptose, reparação de DNA, ativando a expressão de genes alvos da FOXO3a. No entanto, seu papel na longevidade ainda permanece incerto (OELLERICH; POTENTE, 2012; WEBB; BRUNET, 2014). Os fatores de crescimento (IGF-I ou insulina) desencadeiam uma via intracelular mediada por *Phosphoinositide 3-Kinase* (Pi3k) e *protein kinase B* (Akt1), permitindo a fosforilação da FOXO3a, em três resíduos conservados, pela AKT. A fosforilação mediada por Akt1 leva a exclusão nuclear da FOXO3a, e por sua vez, a supressão da transcrição de genes dependentes da FOXO (MURPHY et al., 2003). Na ausência de sinalização de fatores de crescimento, a FOXO3a desloca-se para o núcleo e ativa a expressão de genes dependentes (WEBB; BRUNET, 2014), como podemos observar na Figura 2.

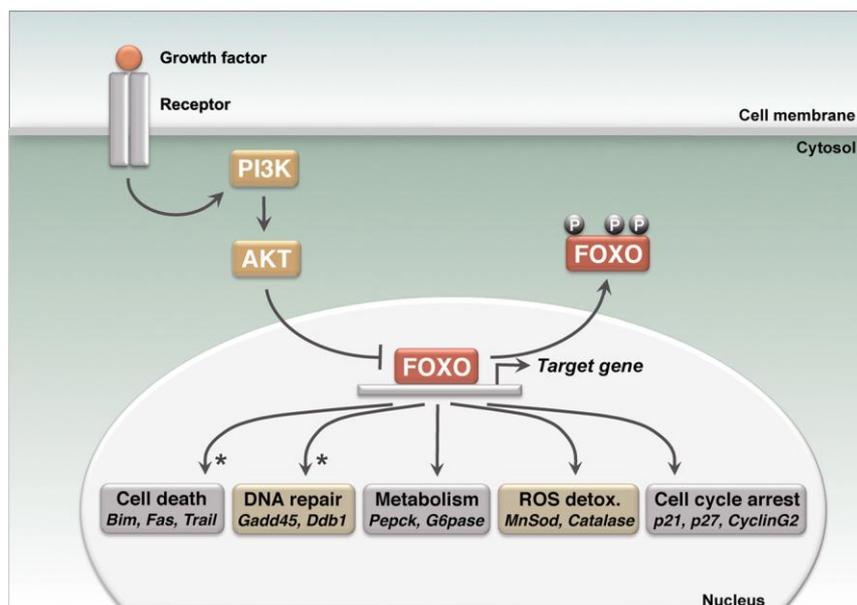


Figura 2. Regulação do fator de transcrição FOXO pela via PI3K-AKT.

Fonte: (OELLERICH; POTENTE, 2012)

Nos folículos ovarianos, quando a FOXO3a é fosforilada, sai do núcleo e vai para o citoplasma do oócito, sendo que a FOXO3a não fosforilada (presente no núcleo) é crucial para a manutenção de folículos primordiais em fase quiescente (CASTRILLON et al., 2003). A hiperativação desta via resulta na hiperfosforilação de FOXO3a, acarretando na múltipla ativação de folículos primordiais, levando ao esgotamento prematuro da reserva ovariana (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). Schneider et al. observaram em estudo com animais *df/df* uma menor expressão de FOXO3a nos ovários de camundongos mais velhos de ambos os genótipos (normal e *df/df*) e isso estava associado a uma atividade ovariana reduzida. Também foi observado que as fêmeas *df/df* têm um nível mais baixo de FOXO3 fosforilada em oócitos de folículos primordiais e primários (SCHNEIDER et al., 2014).

2 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, R. et al., 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 (SORNISON et al., 1996). Os efeitos da ausência de sinalização do GH são dependentes do momento da vida em que isto ocorre. O tratamento transitório com GH exógeno no início da vida pode reduzir a longevidade e diminuir a resistência ao estresse celular em animais df/df (PANICI et al., 2010). 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 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 primordial para o estágio primário em camundongos df/df (SCHNEIDER et al., 2014). Já o tempo de vida reprodutiva de animais bGH é reduzida, indicada pela puberdade adiantada e a taxa de ovulação aumentada (NAAR et al., 1991).

A ativação da via do fator de transcrição ForkheadBox O3a (FOXO3a) é essencial para a iniciação do crescimento da reserva ovariana de folículo primordial. Hiperfosforilação de FOXO3a resulta na sua exportação nuclear, culminando com a ativação global de folículos primordiais e falência ovariana prematura (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). A ativação da via FOXO3a é

promovida por fatores de crescimento (insulina e IGF-I) e a redução da sinalização desta via parece estar envolvido na longevidade prolongada observada camundongos *df/df* (MURPHY et al., 2003) .

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários, bem como o diâmetro de núcleo, oócito e folículo, e os níveis das proteínas FOXO3a e p-FOXO3a 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.

3 Metodologia

Os animais, todos fêmeas, foram divididos em seis grupos, Ames Dwarf sem tratamento de GH (df/df sem GH, n=6), Ames Dwarf com tratamento de GH (df/df com GH, n=6), animais normais sem tratamento de GH (N sem GH, n=6) e normais com tratamento de GH (N com GH, n=6), 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 animais foram anestesiados e eutanasiados após jejum de 12 horas. Os ovários foram coletados e colocados em formol tamponado 10%. Durante o experimento os animais foram mantidos em estantes ventiladas, sob temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (40–60%) controladas. Os ovários foram enviados dos Estados Unidos da América (EUA) em solução formol 10% e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Southern Illinois, IL, EUA.

Os grupos df/df com GH (n=6) e N com GH (n=6) 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 grupos df/df sem GH (n=6) e N sem GH (n=6), tratados com solução salina 2 vezes ao dia, foram usados como controles. Após 6 semanas de tratamento, os animais foram mantidos normalmente até os 18 meses de idade e assim, foram eutanasiados (SADAGURSKI et al., 2015).

Os ovários foram retirados do formol tamponado 10%, desidratados em álcool, clareados em xilol e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Os ovários já incluídos em Paraplast Plus® foram sequencialmente cortados a 5µm no micrótomo automático Leica modelo RM2245 (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK). Foram selecionados 1 a cada 6 cortes e colocados em lâminas histológicas padrão. Cortes intermediários foram separados para posterior análise de imunohistoquímica, usando lâminas silanadas em etanol com organossilano 3% (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). Todo o ovário foi cortado e utilizado. As lâminas, após secagem na estufa a 56°C por 24 horas, foram coradas por hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas e resina sintética

(Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). As imagens dos cortes ovarianos 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. Os folículos quantificados foram aqueles que apresentaram núcleo dos oócitos claramente visível e a quantidade foi multiplicada seis vezes. A quantidade final de folículos foi multiplicada duas vezes, mimetizando a quantidade de folículos dos dois ovários.

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 contém um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cuboide. Um folículo foi determinado como sendo um folículo secundário quando rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa cuboide, 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).

Para as análises de imunohistoquímica, as amostras foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em uma grade de alcoóis. Os anticorpos policlonais primários utilizados foram: anti FOXO3a fosforilada (p-FOXO3a) [p-FKHRL1 anticorpo; Ser 253, sc-101683-rabbit (IgG)] e anti-FOXO3a [FKHRL1 anticorpo; N16, sc-101683-goat (IgG)], ambos diluídos a 1:50. Os anticorpos primários foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) e diluídos em solução BSA 1,5%. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado pela solução Hydrogen Peroxidase Block (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). A recuperação antigênica foi realizada em ambiente úmido após ferver por 3 minutos em solução de citrato pH 6.0. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado utilizando a solução Protein Block (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite numa câmara úmida a 4°C. As lâminas com anticorpo para p-FOXO3a e FOXO3a foram instiladas com anticorpos secundários Kit Reveal Polyvalente HRP® (Primavera Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) e Dako LSAB®2 System-HRP (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA), respectivamente. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente, com 3,3 'diaminobenzidina (DAB-K3468, DAKO

Corporation, Carpinteria, CA, EUA), contrastadas com solução Mayer's hemalum (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). As imagens dos folículos foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 (Motic®, Hong Kong, China) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan), utilizando objetiva de 40X, e os folículos foram classificados em primordiais e primários. Foram utilizados 18 oócitos de folículos primordiais (n=3/grupo) e 18 oócitos de folículos primários (n=3/grupo) em cada grupo analisado.

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) para análise de número de folículos e intensidade imunohistoquímica para FOXO3a e p-FOXO3a. O teste de t foi realizado para estimar a diferença entre os grupos bGH e N para análise de número de folículos e intensidade imunohistoquímica para FOXO3a e p-FOXO3a.

4 Resultados

O número de folículos primordiais, em transição e totais do grupo N sem GH e N com GH foi menor comparado aos grupos df/df sem e com GH ($p < 0,0001$, $p = 0,0002$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Quando analisados separadamente, o grupo N com GH e df/df com GH apresentou uma quantidade de folículos primordiais e totais menores que seus grupos controles ($p = 0,009$ e $p = 0,018$, respectivamente). A quantidade de folículos primários não apresentou diferença entre os grupos de tratamento e entre os genótipos ($p > 0,05$). O número de folículos secundários foi maior no grupo N sem GH comparado ao grupo df/df sem GH ($p = 0,024$), não sendo observada nenhuma outra diferença entre os grupos ($p > 0,05$). O grupo bGH apresentou uma quantidade de folículos primordiais, em transição, primários e totais menores que o grupo N ($p = 0,0001$, $p = 0,0037$, $p = 0,0006$ e $p = 0,0009$, respectivamente). A quantidade de folículos secundários e terciários do grupo bGH foi maior comparada ao grupo N ($p = 0,0017$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (Figuras 3 e 4).

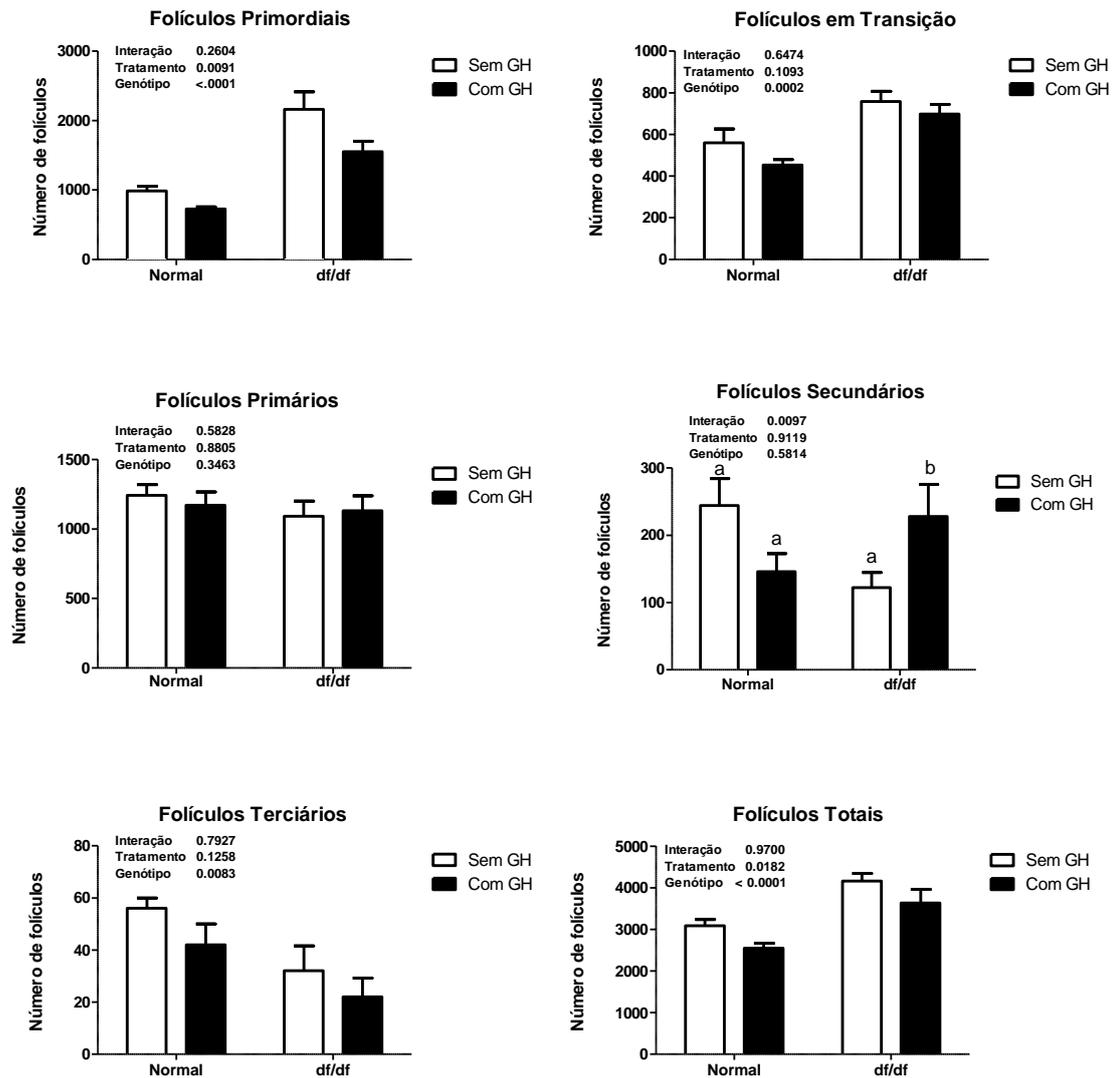


Figura 3. Número de folículos ovarianos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos normais sem e com tratamento de GH e Ames Dwarf (df/df) sem e com tratamento de GH. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

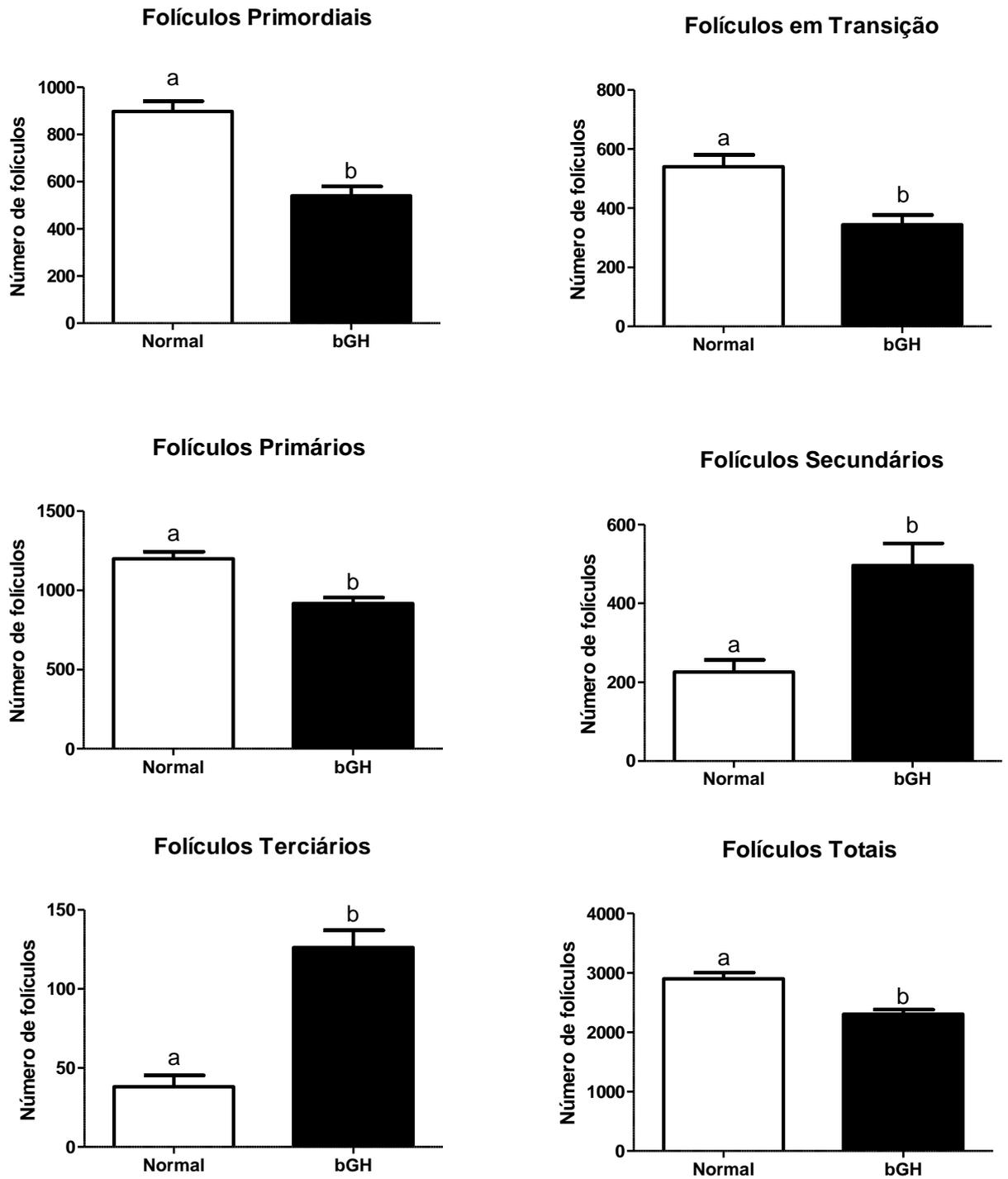


Figura 4. Número de folículos ovarianos primordiais, em transição, primários, secundários, terciários e totais de camundongos normais e transgênicos que superexpressam GH (bGH). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na imunohistoquímica foi observado que em folículos primordiais do grupo N sem GH e N com GH a quantidade de proteínas FOXO3a e p-FOXO3a foi menor comparado aos grupos df/df sem e com GH ($p=0,009$ e $p=0,01$, respectivamente). Quando analisados separadamente, o grupo N com GH e df/df com GH apresentou uma quantidade de proteína FOXO3a menor ($p=0,03$) e p-FOXO3a maior ($p=0,01$), em folículos primordiais, comparado com seus grupos controles. A quantidade de proteína FOXO3a nos folículos primários não apresentou nenhuma diferença entre os grupos, no entanto a proteína p-FOXO3a foi maior em folículos primários do grupo df/df com GH comparado aos grupos N sem e com GH ($p=0,01$ e $p=0,003$, respectivamente). Nos folículos primordiais e primários dos animais bGH não foi observado diferença na quantidade de proteína FOXO3a e também na quantidade de proteína p-FOXO3a em folículos primordiais, comparado a animais do grupo N ($p>0,05$). No entanto, em folículos primários houve uma maior quantidade de p-FOXO3a comparada ao grupo N ($p=0,006$) (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Os dados para diâmetros do núcleo, oócito e folículo estão representado nas Tabelas 1 e 2. Nenhuma diferença foi observada em relação à diâmetros de núcleo, oócito e folículo de folículos em transição e primários quando considerando o tratamento com GH ($p>0,05$). No entanto, os grupos N sem GH e df/df sem GH apresentaram em folículos primordiais diâmetro de oócito e folículo maiores que o grupo N com GH e df/df com GH ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) e em folículos secundários os grupos N sem GH e N com GH apresentou diâmetro de oócitos maiores que os grupos df/df sem e com GH ($p=0,03$), não sendo encontrado diferenças de diâmetro de núcleo e diâmetro folicular para estes folículos ($p>0,05$). Nos folículos terciários o diâmetro de núcleo dos grupos N e df/df com GH foram maiores que nos grupos sem GH ($p=0,0001$). Já o diâmetro folicular dos terciários nos grupos N sem e com GH foram maiores comparado aos grupos df/df sem e com GH ($p=0,001$). No grupo bGH os diâmetros de núcleos dos folículos primordiais, em transição e primários foram maiores que no grupo N ($p=0,03$, $p=0,01$ e $p=0,009$, respectivamente), assim como diâmetro de oócito e folículo em secundários foi maior em bGH que no grupo N ($p=0,007$ e $p=0,03$, respectivamente). Nos folículos secundários apenas houve diferença entre os grupos no diâmetro de oócito, sendo que o tamanho foi

menor em animais bGH ($p=0,01$). Não foi encontrada diferença nos grupos bGH e N nos diâmetros de núcleo, oócito e folículo em terciários ($p>0,05$).

Oócitos de Folículos Primordiais

Oócitos de Folículos Primários

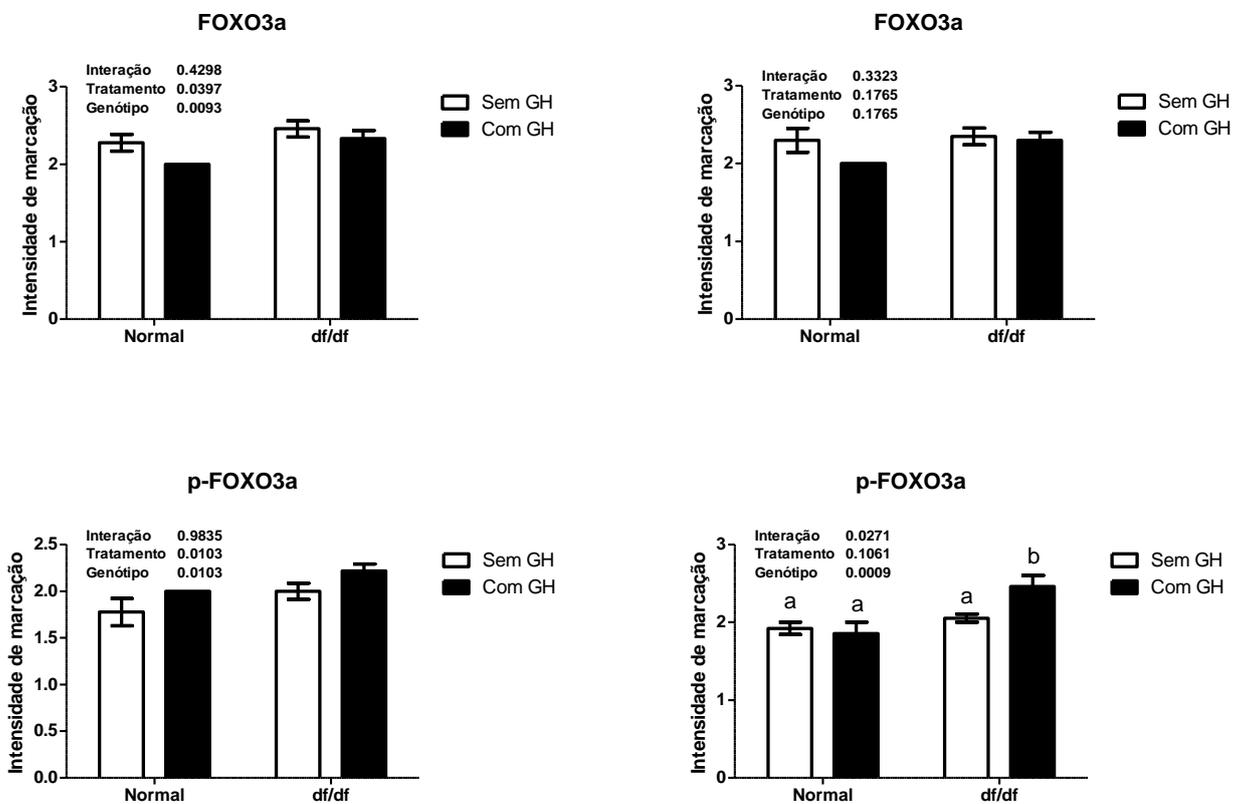


Figura 5. Imunohistoquímica de FOXO3a e p-FOXO3a em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários de camundongos normais sem e com tratamento de GH e Ames Dwarf (df/df) sem e com tratamento de GH. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

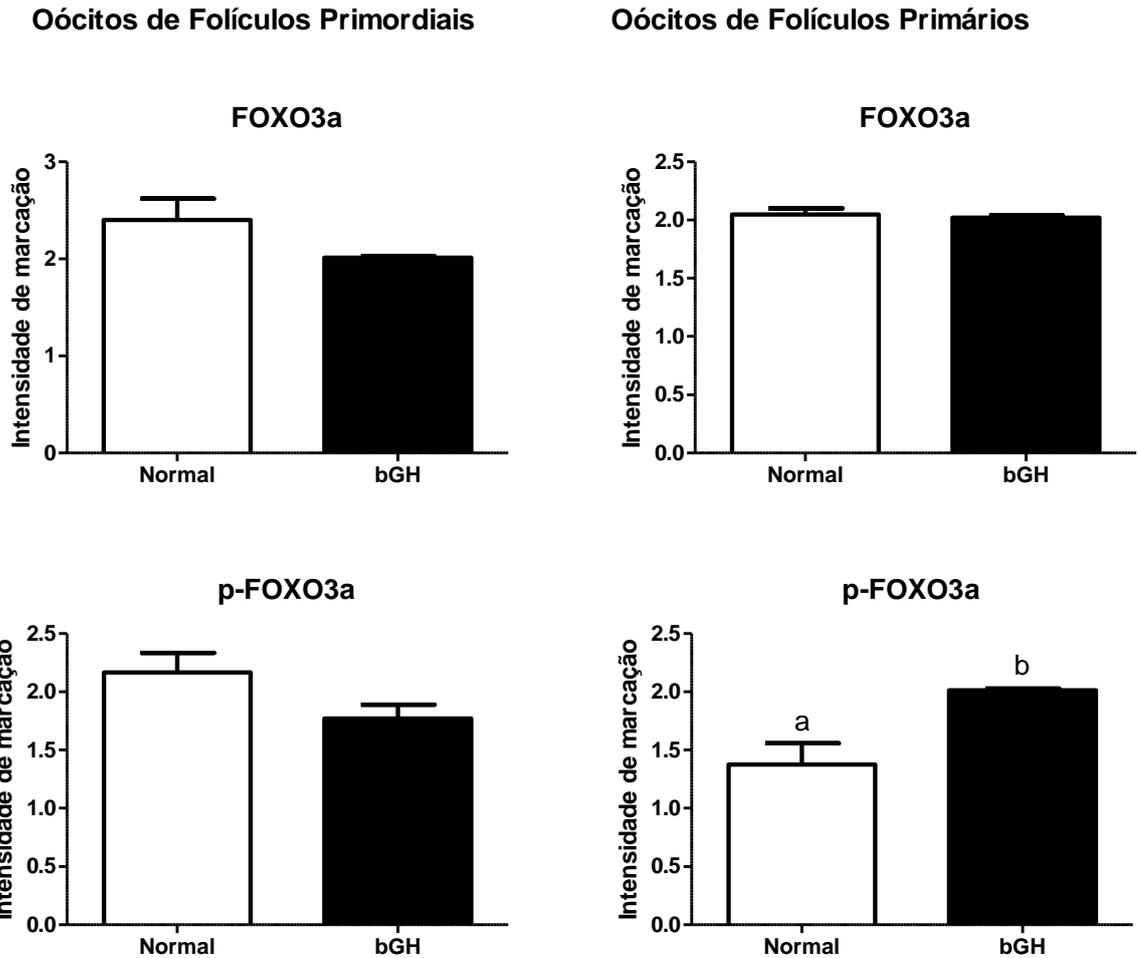


Figura 6. Imunohistoquímica de FOXO3a e p-FOXO3a em oócitos de folículos ovarianos primordiais e primários de camundongos normais e transgênicos que superexpressam GH (bGH). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

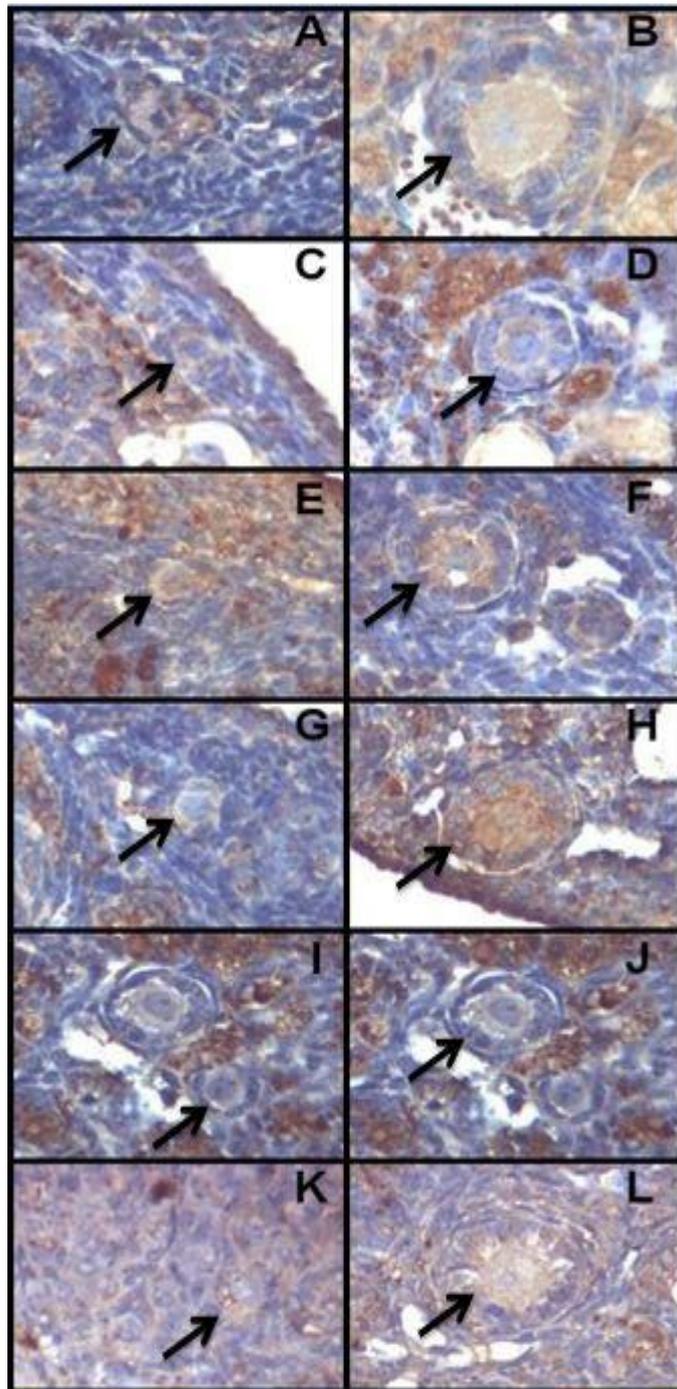


Figura 7. Imunohistoquímica de FOXO3a em oócitos de folículos primordiais e primários dos grupos N sem GH (A e B), N com GH (C e D), df/df sem GH (E e F), df/df com GH (G e H), bGH (I e J) e N (K e L). (A, C, E, G, I, K: folículos primordiais; B,D,F,H,J,L: folículos primários)

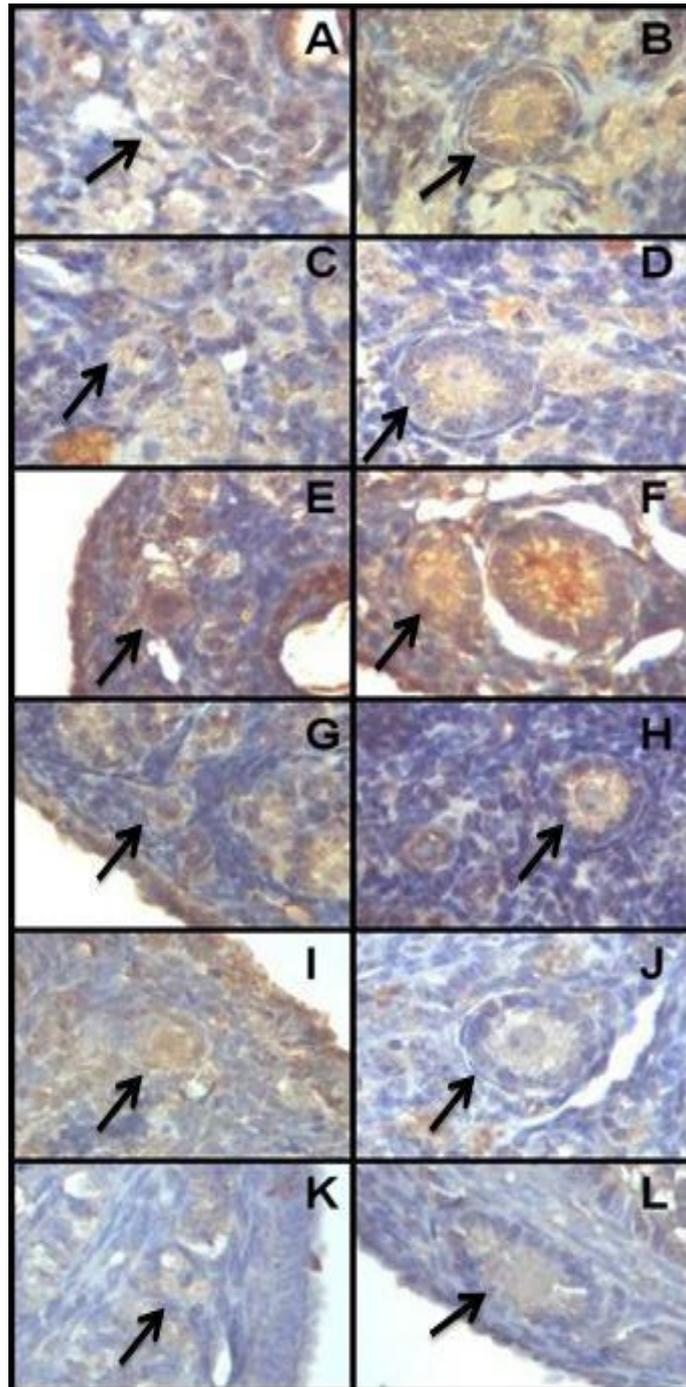


Figura 8. Imunohistoquímica de p-FOXO3a em oócitos de folículos primordiais e primários dos grupos N sem GH (A e B), N com GH (C e D), df/df sem GH (E e F), df/df com GH (G e H), bGH (I e J) e N (K e L). (A, C, E, G, I, K: folículos primordiais; B,D,F,H,J,L: folículos primários)

Tabela 1 – Diâmetros de núcleo, oócito e folículo de folículos primordiais, em transição, primários, secundários e terciários de animais Ames Dwarf e normais com e sem tratamento de GH exógeno.

Folículos	Normal		Ames dwarf		P value		
	Sem GH	Com GH	Sem GH	Com GH	Genótipo	Tratamento	Genot*Trat
Folículo Primordial							
Diâmetro do Núcleo	3,2	2,8	2,9	3,0	0,77	0,44	0,15
Diâmetro do Oócito	6,4	5,2	5,7	5,6	0,54	0,04*	0,07
Diâmetro do folículo	9,6	7,8	8,3	8,0	0,25	0,03*	0,14
Folículo em Transição							
Diâmetro do Núcleo	3,1	3,2	3,1	2,8	0,17	0,29	0,10
Diâmetro do Oócito	6,5	6,3	6,3	6,4	0,71	0,83	0,59
Diâmetro do folículo	10,4	10,0	9,7	9,9	0,29	0,79	0,44
Folículo Primário							
Diâmetro do Núcleo	3,4	3,8	3,2	3,6	0,36	0,08	0,77
Diâmetro do Oócito	10,6	10,8	9,6	10,2	0,34	0,63	0,76
Diâmetro do folículo	17,3	16,3	15,7	15,6	0,32	0,65	0,70
Folículo Secundário							
Diâmetro do Núcleo	6,1	5,9	4,8	6,0	0,12	0,19	0,10
Diâmetro do Oócito	25,7	24,4	23,3	22,9	0,03*	0,33	0,62
Diâmetro do folículo	50,2	52,8	56,8	55,9	0,29	0,88	0,72
Folículo Terciário							
Diâmetro do Núcleo	5,4	6,3	4,1	6,6	0,21	0,0001*	0,21
Diâmetro do Oócito	45,6	30,2	29,8	31,0	0,40	0,42	0,35
Diâmetro do folículo	150,8	170,7	129,1	132,1	0,001*	0,19	0,33

*valor p significativo

Tabela 2 - Diâmetros de núcleo, oócito e folículo de folículos primordiais, em transição, primários, secundários e terciários de animais transgênicos que superexpressam GH (bGH) e normais.

	Normal	bGH	P value
Folículo Primordial			
Diâmetro do Núcleo	2,6	3,1	0,03*
Diâmetro do Oócito	5,7	5,7	0,89
Diâmetro do folículo	8,6	11,4	0,40
Folículo em Transição			
Diâmetro do Núcleo	2,9	3,4	0,01*
Diâmetro do Oócito	6,2	6,3	0,69
Diâmetro do folículo	8,9	9,4	0,21
Folículo Primário			
Diâmetro do Núcleo	3,3	4,1	0,009*
Diâmetro do Oócito	8,5	10,6	0,007*
Diâmetro do folículo	14,6	16,4	0,03*
Folículo Secundário			
Diâmetro do Núcleo	5,8	5,5	0,53
Diâmetro do Oócito	25,2	22,1	0,01*
Diâmetro do folículo	54,8	53,8	0,85
Folículo Terciário			
Diâmetro do Núcleo	6,8	6,2	0,17
Diâmetro do Oócito	31,3	32,6	0,35
Diâmetro do folículo	172,6	164,7	0,28

*valor p significativo

5 Discussão

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.

Nenhum registro de quantificação folicular ovariana de animais *df/df* foi encontrado na literatura, nos mostrando que este dado é inédito. Existem evidências prévias da diminuição da reserva ovariana em animais GHRKO (SLOT et al., 2006), o que é interessante, mas ao mesmo tempo sabemos que receptor para GH possui vários efeitos diretos no ovário e pode ser eventualmente ativado por outros efetores que não apenas o GH, e que animais GHRKO possuem níveis elevados de GH na circulação. O número de folículos primordiais, em transição e totais foi maior em animais *df/df* e os animais tratados com GH apresentaram números de folículos primordiais e totais menores que seus controles. Em contrapartida os animais *bGH* apresentaram uma menor quantidade de folículos primordiais, em transição, primários e totais e maior quantidade de secundários e terciários. Sabe-se que as características fenotípicas de animais *df/df* podem ser revertidas com o tratamento de GH no início da vida, como a longevidade, tamanho corporal e resistência ao estresse oxidativo (PANICI et al., 2010). Podemos observar, que apesar do maior tamanho da reserva de folículos primordiais, este processo pode ser revertido na vida adulta com o tratamento de GH, nos mostrando que os folículos estão sendo menos ativados pela ausência de GH, e que a reposição exógena deste hormônio em um período específico é capaz de normalizar este processo.

Em estudo com animais *Knockout* (nocauteados) 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.

A quantidade de proteína p-FOXO3a nos folículos primordiais foi maior no grupo de animais normais comparado aos animais df/df, assim como a proteína FOXO3a, tendo um aumento considerável no grupo de animais df/df. A presença de FOXO3a na sua forma não fosforilada é crucial para manter os folículos primordiais em estado quiescente (CASTRILLON et al., 2003). Portanto, a alta quantidade de FOXO3a indica que os folículos podem estar retidos no estágio primordial. Essa afirmação é reforçada pelo fato de que o tratamento com GH reduziu a quantidade de FOXO3a em folículos primordiais, ao mesmo tempo que aumentou a quantidade da sua forma fosforilada, mostrando mais uma vez que o tratamento com GH está levando uma maior ativação desses folículos através da ativação da via da FOXO3a. Esse resultado indica que animais df/df apresentaram uma quantidade inicial de FOXO3a muito maior que animais normais, que também resultou em um pequeno aumento da presença de p-FOXO3a. Em um estudo prévio com animais df/df a quantidade de p-FOXO3a em folículo primordiais/primários foi menor em animais df/df (SCHNEIDER et al., 2014). Os animais bGH apresentaram uma quantidade de p-FOXO3a maior que animais normais em folículos primários, mais uma vez mostrando que esses animais estão ativando mais sua reserva ovariana, e que esta é a causa tanto da diminuição, quanto da retenção da reserva nos animais df/df.

Sabemos que o crescimento do oócito está diretamente ligado e coordena o crescimento e ativação do folículo (HYTTEL et al., 1997). Foi observado que

animais bGH apresentaram diâmetro do oócito e núcleo aumentados. Isto pode ser um indicio de maior atividade de transcrição e ativação precoce do crescimento folicular, conforme foi realmente observado nestes animais. É possível que quantidade de FOXO3a também esteja relacionada com o tamanho do oócito e ativação do folículo. Em estudo com animais knockout para FOXO3a, foi observado que oócitos de folículos primordiais eram maiores comparado ao grupo controle (CASTRILLON et al., 2003) e esses animais tiveram uma depleção precoce da reserva ovariana. A mesma relação entre tamanho aumentado do oócito e ativação precoce da reserva ovariana foi observada para animais knockout da Pten (REDDY et al., 2008). Desta maneira, podemos hipotetizar uma relação entre a ausência de GH/IGF-I circulante e a ativação da via da FOXO3a pode levar a um distúrbio no crescimento oocitário e ser um regulador da taxa de ativação da reserva ovariana.

6 Conclusão

Os animais df/df, apresentaram uma reserva ovariana maior que animais normais, e o tratamento com GH na vida adulta foi capaz de ativar a reserva tanto em animais normais quanto df/df. O contrário foi observado em animais bGH, que apresentaram uma reserva ovariana menor que animais normais, mostrando que estes animais estão ativando mais sua reserva. Nosso estudo também indica que esta regulação do tamanho da reserva ovariana pelo GH é diretamente coordenado pela FOXO3a, cuja maior presença na forma não fosforilada foi observada em animais df/df, fazendo que os folículos primordiais permaneçam quiescentes, e maior fosforilação em animais bGH, fazendo com que os folículos primordiais sejam ativados. Mais estudos são necessários para entender a relação do diâmetro oocitário e nuclear com uma maior ativação dos folículos pelo GH/IGF-I.

Referências

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.

ARGENTINO, D. P. et al. Effects of long-term caloric restriction on glucose homeostasis and on the first steps of the insulin signaling system in skeletal muscle of normal and Ames dwarf (Prop1df/Prop1df) mice. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 1-2, p. 27-35, Jan-Feb 2005.

BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 158, p. 417-33, Oct 22 1963.

BARTKE, A. Reproduction of female dwarf mice treated with prolactin. **J Reprod Fertil**, v. 11, n. 2, p. 203-6, Apr 1966.

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.

BONKOWSKI, M. S. et al. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 20, p. 7901-5, May 16 2006.

CASTRILLON, D. H. et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, v. 301, n. 5630, p. 215-8, Jul 11 2003.

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.

DONG, X. C. et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. **Cell Metab**, v. 8, n. 1, p. 65-76, Jul 2008.

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.

GENIN, E. C. et al. Concise review: forkhead pathway in the control of adult neurogenesis. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1398-407, Jun 2014.

GESING, A. et al. Growth hormone abolishes beneficial effects of calorie restriction in long-lived Ames dwarf mice. **Exp Gerontol**, v. 58, p. 219-29, Oct 2014.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

KALICH-PHILOSOPH, L. et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 185, p. 185ra62, May 15 2013.

LI, L. et al. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). **Gen Comp Endocrinol**, v. 174, n. 2, p. 232-7, Nov 1 2011.

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.

MATHEWS, L. S. et al. Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 433-7, Jul 1988.

MCKEE ALDERMAN, J. et al. Calorie restriction and dwarf mice in gerontological research. **Gerontology**, v. 56, n. 4, p. 404-9, 2010.

MURPHY, C. T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-83, Jul 17 2003.

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.

OELLERICH, M. F.; POTENTE, M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. **Circ Res**, v. 110, n. 9, p. 1238-51, Apr 27 2012.

PANICI, J. A. et al. Early life growth hormone treatment shortens longevity and decreases cellular stress resistance in long-lived mutant mice. **FASEB J**, v. 24, n. 12, p. 5073-9, Dec 2010.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-3, Feb 1 2008.

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.

ROCHA, J. S. et al. Effects of mild calorie restriction on reproduction, plasma parameters and hepatic gene expression in mice with altered GH/IGF-I axis. **Mech Ageing Dev**, v. 128, n. 4, p. 317-31, Apr 2007.

SADAGURSKI, M. et al. Growth hormone modulates hypothalamic inflammation in long-lived pituitary dwarf mice. **Aging Cell**, v. 14, n. 6, p. 1045-54, Dec 2015.

SCHAIBLE, R.; GOWEN, J. W. A new dwarf mouse. **Genetics**, v. 46, p. 896, 1961.

SCHNEIDER, A. et al. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **J Ovarian Res**, v. 7, p. 120, 2014.

SELDEN, R. F. et al. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. **Mol Cell Biol**, v. 6, n. 9, p. 3173-9, Sep 1986.

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.

SPEAKMAN, J. R.; MITCHELL, S. E. Caloric restriction. **Mol Aspects Med**, v. 32, n. 3, p. 159-221, Jun 2011.

WEBB, A. E.; BRUNET, A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 4, p. 159-69, Apr 2014.

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.

ZHOU, Y. et al. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13215-20, Nov 25 1997.

ZOU, K. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 631-6, May 2009.