

17 α ESTRADIOL NÃO AFETA A FERTILIDADE E PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE CAMUNDONGOS MACHOS

JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA¹; CAMILA RIBEIRO CARVALHO DE BRITO²;
DRIELE NESKE GARCIA²; BIANKA MACHADO ZANINI²; BERNARDO
GARZIERA GASPERIN²; AUGUSTO SCHNEIDER³

¹Universidade Federal de Pelotas - jvvisola@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas - augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida tem aumentado na população humana nas últimas décadas (CHRISTENSEN et al., 2009). No entanto, com o passar da idade ocorre o declínio das funções metabólicas (LOPEZ-OTIN et al., 2013). Intervenções capazes de modular as vias de detecção de nutrientes podem retardar o envelhecimento fisiológico. 17 α Estradiol (17 α E2), um enantiômero natural não feminilizante do 17 β Estradiol, pode modular benéficamente os fenótipos relacionados ao envelhecimento (STOUT et al., 2017). Os efeitos anti-envelhecimento do 17 α E2 são bem estabelecidos em machos (HARRISON et al., 2014). Devido à ativação das vias anorexigênicas hipotalâmicas (STEYN et al., 2018), o 17 α E2 causa redução no consumo, sem afetar o gasto energético, resultando em redução da massa corporal, adiposidade visceral e deposição ectópica de lipídios, sem diminuição da massa magra (STOUT et al., 2017). Modulação na tolerância à glicose, sinalização de mTORC2 e composição de aminoácidos hepáticos e marcadores de ciclagem de ureia também foram relatados (GARRATT et al., 2017; GARRATT et al., 2018). Além disso, o principal efeito do 17 α E2 é estender a expectativa de vida (STOUT et al., 2017). A maioria dos efeitos 17 α E2, no entanto, são relacionados ao sexo e são mais fortes em machos intactos, enquanto em fêmeas e machos castrados, os efeitos são irrelevantes (STOUT et al., 2017; GARRATT et al., 2018). 17 α E2 tem baixa afinidade para os receptores de estrogênio β , mas descobertas recentes sugerem que a maioria de suas ações são através dos receptores de estrogênio α (ER α). No entanto, diferentemente de outras intervenções anti-envelhecimento, o 17 α E2 parece não ter efeito sobre a expectativa de vida reprodutiva de camundongos fêmeas do tipo selvagem (ISOLA, et al., 2020). Além desta avaliação do envelhecimento ovariano, nenhum estudo abordando os possíveis efeitos do 17 α E2 na reprodução de camundongos foi relatado. Ainda que nenhum efeito feminilizante tenha sido relatado, o 17 α E2 tem afinidade com receptores de estrogênio e existe a possibilidade de proporcionar efeitos ainda não demonstrados na reprodução. Uma vez que efeitos mais fortes são encontrados em machos, e uma relação com 17 α E2 e andrógenos parece existir, estudos que abordando seus possíveis efeitos na reprodução e fertilidade de machos são importantes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do 17 α E2 na fertilidade de camundongos machos.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (50105/2019-86). Camundongos machos C57BL/6 (n=18) foram mantidos a 24 \pm 2 °C com acesso ad libitum a comida e

água e divididos em dois grupos. Um grupo (controle; $n=8$) recebeu dieta regular (LabDiet® 58YP, 66,4% de carboidratos, 20,5% de proteína, 13,1% de gordura, TestDiet; Richmond, IN, EUA), enquanto o outro grupo ($17\alpha E2$; $n=9$) recebeu a mesma dieta suplementada com $17\alpha E2$ (14,4 ppm; Esteraloides, Newport, RI). O tratamento começou aos três meses de idade e foi fornecido por cinco meses. Na última semana de tratamento, os camundongos foram acasalados com fêmeas previamente sincronizadas (5UI de eCG dois dias previos ao acasalamento e 5UI de hCG no dia do acasalamento), na proporção de duas fêmeas por macho, para produção de embriões. Três dias após o acasalamento, as fêmeas foram anestesiadas com isoflurano e eutanasiadas e seus ovidutos foram removidos e lavados para coleta de embriões. Uma semana após o acasalamento, os machos foram sacrificados para coleta de sêmen. O peso corporal e testicular foi mensurado no momento da eutanásia.

Para a coleta de sêmen epididimal, foi realizada uma incisão no escroto, para remoção da cauda do epidídimo, que foi então colocado em um Eppendorf contendo 300 μL tampão TRIS com albumina, pré-aquecido a 36,5 °C e fracionado suavemente com tesoura para liberação do esperma. A concentração espermática foi avaliada pela contagem de células em uma câmara de contagem de hemocítmetro. A análise da motilidade espermática foi realizada através do sistema de análise de sêmen assistido por computador (CASA, SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha). As variáveis avaliadas pelo sistema foram: velocidade média do caminho (VAP), velocidade da linha curva (VCL), velocidade reta (VSL), frequência de batimento cruzado (BCF), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), motilidade total (TMO) e motilidade progressiva (PMO).

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6. As variáveis foram comparadas pelo teste t, ou, quando porcentagens, pelo teste Qui quadrado. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso testicular foi maior nos camundongos $17\alpha E2$ ($p=0,036$), ainda que a diferença real tenha sido de apenas 0,009g, e efeitos diferenças no peso gonadal não haverem sido relatadas previamente (STOUT et al., 2017). Já o peso corporal foi menor nos camundongos tratados, como esperado (STOUT et al., 2017). Com o peso corporal menor e o peso testicular levemente maior, o peso testicular relativo ao corporal dos camundongos tratados foi expressivamente maior, o que reforça que ainda que $17\alpha E2$ cause perda de massa corporal, os testículos mantem sua massa (Tabela 1).

Com relação aos parâmetros espermáticos, não foram encontradas diferenças entre os animais que receberam $17\alpha E2$ e os controles. O que demonstra que o $17\alpha E2$ não afeta a qualidade espermática (Tabela 1).

No teste de produção de embriões, que pode ser considerado um bom indicador de fertilidade, observou-se que não houve diferença ($p=0,11$) na porcentagem de fêmeas que apresentaram ao menos um embrião, e, portanto, foram fecundadas pelos machos. Os números totais de estruturas embrionárias coletadas ($p=0,39$) e embriões viáveis ($p=0,49$) por fêmea que respondeu ao protocolo de sincronização também não foram diferentes entre os grupos, bem como a porcentagem total de embriões viáveis dentre o total de estruturas coletadas nos dois grupos ($p=1,00$) (Tabela 2).

Tabela 1 – Peso corporal e gonadal e parâmetros espermáticos de camundongos machos tratados com 17 α E2.

| | Controle | 17 α E2 | Valor de P |
|-------------------------------------------------------------------|----------|----------------|------------|
| Peso testicular (g) | 0,207 | 0,216 | 0,036 |
| Peso corporal (g) | 29,06 | 24,93 | 0,006 |
| Peso testicular relativo ao peso corporal (g) | 0,715 | 0,870 | <0,0001 |
| Concentração espermátoca epididimal (X10 ⁴ células/uL) | 2,53 | 1,84 | 0,138 |
| Motilidade (%) | 65,60 | 62,71 | 0,655 |
| Motilidade Progressiva (%) | 52,42 | 49,99 | 0,642 |
| Velocidade média do trajeto (VAP) | 120,35 | 127,58 | 0,669 |
| Velocidade curvilinear (VCL) | 229,31 | 233,94 | 0,764 |
| Velocidade progressiva (VSL) | 83,67 | 85,89 | 0,671 |
| Deslocamento lateral da cabeça (ALH) | 9,81 | 10,11 | 0,613 |
| Frequência de batimentos flagelares | 17,93 | 17,62 | 0,198 |

Tabela 2 – Produção de embriões utilizando machos tratados com 17 α E2

| | Controle | 17 α E2 | Valor de P |
|--------------------------------------------|----------------|-----------------|------------|
| Fêmeas que produziram algum embrião (%) | 75,00 (12/16) | 90,00 (17/18) | 0,110 |
| Total de estruturas embrionárias por fêmea | 6,42 \pm 1,7 | 8,11 \pm 1,2 | 0,399 |
| Total de embriões viáveis por fêmea | 4,50 \pm 1,2 | 3,31 \pm 1,23 | 0,492 |
| Embriões viáveis (%) | 64,17 (77/120) | 64,31 (146/227) | 1,000 |

Estes são os dados da primeira avaliação dos efeitos do tratamento com 17 α E2 na fertilidade de camundongos que temos conhecimento. Tais resultados indicam que o 17 α E2 não afeta a fertilidade de camundongos machos e sugere que no futuro esta molécula possa se utilizada em humanos, sem apresentar malefícios à reprodução.

4. CONCLUSÕES

Tratamento com 17 α E2 não afeta parâmetros espermáticos e a produção de embriões a partir de machos tratados. Sugerindo que o fármaco não afeta negativamente a fertilidade de camundongos machos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRISTENSEN, K.; DOBLHAMMER, G.; RAU, R.; VAUPEL J.W.; Ageing populations: the challenges ahead. **Lancet.**, v.374, p.1196–1208, 2009.

GARRATT, M.; BOWER, B.; GARCIA, G.G.; MILLER, R.A. Sex differences in lifespan extension with acarbose and 17-alpha estradiol: gonadal hormones underlie male-specific improvements in glucose tolerance and mTORC2 signaling. **Aging Cell**, v.16, n.6, p.1256-1266, 2017.

GARRATT, M.; LAGERBORG, K.A.; TSAI, Y-M.; GALECKI, A.; JAIN, M.; MILLER, R.A. Male lifespan extension with 17-a estradiol is linked to a sex-specific metabolomic response modulated by gonadal hormones in mice. **Aging Cell**, v.17, e.12786, 2018.



HARRISON, D.E.; STRONG, R.; ALLISON, D.B.; et al. Acarbose, 17-alphaestradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. **Aging Cell**, v.13, p.273–282, 2014.

ISOLA, J.V.V.; ZANINI, B.M.; SIDHOM, S.; KOPCHICK, J.J.; BARTKE, A.; MASTERNAK, M.M.; STOUT, M.B.; SCHNEIDER, A. 17 α -Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. **Experimental Gerontology**. v.129, e.110769, 2020.

LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M.A.; PATRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v.153, n.6, p.1194-217, 2013.

STEYN, F.J.; NGO, S.T.; CHEN, V.P.; et al. 17 α -estradiol acts through hypothalamic pro-opiomelanocortin expressing neurons to reduce feeding behavior. **Aging Cell**, v.17, e.12703, 2018.

STOUT, M.B., STEYN, F.J., JURCZAK, M.J., CAMPOREZ, J.P.G., ZHU, Y., HAWSE, J.R., JURK, D., PALMER, A.K., XU, M., PIRTSKHALAVA, T. AND EVANS, G.L. 17 α -Estradiol alleviates age-related metabolic and inflammatory dysfunction in male mice without inducing feminization. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v.72, n.1, p.3-15, 2017.