

## 17 $\alpha$ ESTRADIOL NÃO AFETA A FERTILIDADE E PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE CAMUNDONGOS MACHOS

JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA<sup>1</sup>; CAMILA RIBEIRO CARVALHO DE BRITO<sup>2</sup>;  
DRIELE NESKE GARCIA<sup>2</sup>, BIANKA MACHADO ZANINI<sup>2</sup>; BERNARDO  
GARZIERA GASPERIN<sup>2</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - [jvvisola@ufpel.edu.br](mailto:jvvisola@ufpel.edu.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [augustoschneider@gmail.com](mailto: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 $\alpha$ Estradiol (17 $\alpha$ E2), um enantiômero natural não feminilizante do 17 $\beta$ Estradiol, pode modular beneficamente os fenótipos relacionados ao envelhecimento (STOUT et al., 2017). Os efeitos anti-envelhecimento do 17 $\alpha$ E2 são bem estabelecidos em machos (HARRISON et al., 2014). Devido à ativação das vias anorexigênicas hipotalâmicas (STEYN et al., 2018), o 17 $\alpha$ 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 disto, o principal efeito do 17 $\alpha$ E2 é estender a expectativa de vida (STOUT et al., 2017). A maioria dos efeitos 17 $\alpha$ 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 $\alpha$ E2 tem baixa afinidade para os receptores de estrogênio  $\beta$ , mas descobertas recentes sugerem que a maioria de suas ações são através dos receptores de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). No entanto, diferentemente de outras intervenções anti-envelhecimento, o 17 $\alpha$ 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 $\alpha$ E2 na reprodução de camundongos foi relatado. Ainda que nenhum efeito feminilizante tenha sido relatado, o 17 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 isofluorano 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, apara remoção da cauda do epidídimo, que foi então colocado em um Eppendorf contendo 300  $\mu$ L 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 hemocitômetro. 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 mantêm 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 $\alpha$ E2.

	Controle	17 $\alpha$ 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 espermática epididimal ( $\times 10^4$ celulas/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 $\alpha$ E2

	Controle	17 $\alpha$ 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 $\alpha$ E2 na fertilidade de camundongos que temos conhecimento. Tais resultados indicam que o 17 $\alpha$ E2 não afeta a fertilidade de camundongos machos e sugere que no futuro esta molécula possa se utilizarizada em humanos, sem apresentar malefícios à reprodução.

#### 4. CONCLUSÕES

Tratamento com 17 $\alpha$ 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 camundogos 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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.