

## EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO 17 $\alpha$ -ESTRADIOL NA REPRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

MARIA ISABEL SCHIAVON COUSEN 1; JOSÉ VITOR ISOLA2; GABRIEL VEIGA3; DRIELE NESKE 4, JÉSSICA HENSE 5, AUGUSTO SCHNEIDER 6

1 Universidade Federal de Pelotas-UFPEL – [isabelcousen@gmail.com](mailto:isabelcousen@gmail.com) 1

2 Universidade Federal de Pelotas-UFPEL – [jvvisola@gmail.com](mailto:jvvisola@gmail.com) 2

3 Universidade Federal de Pelotas-UFPEL – [gabrielbveiga@icloud.com](mailto:gabrielbveiga@icloud.com) 3

4 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – [drika\\_neske@yahoo.com.br](mailto:drika_neske@yahoo.com.br) 4

5 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – [jeeh.hense@hotmail.com](mailto:jeeh.hense@hotmail.com) 5

6 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com) 6

### 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da vida reprodutiva os folículos ovarianos ficam expostos a injúrias impostas ao organismo que favorecem o envelhecimento ovariano e redução da fertilidade (LOPEZ et al., 2004; ADRIENS et al., 2009). Estratégias alimentares e farmacológicas que favoreçam o atraso da menopausa, assim como, preservem adequada função ovariana, de modo seguro, são necessárias, visto que atualmente mulheres postergam a idade gestacional.

A restrição calórica (RC) sem desnutrição tem sido amplamente associada, em diversas espécies, a um aumento da expectativa de vida, atraso de comorbidades comuns do envelhecimento e maior preservação da função reprodutiva feminina (COLMAN et al., 2011; SELESNIEMI et al., 2008). Semelhantemente, uma dieta enriquecida com 17 $\alpha$ -estradiol (17 $\alpha$ -E2) vêm demonstrando efeitos no aumento da extensão de vida de camundongos machos (HARRISON et al., 2014). O 17 $\alpha$ -E2 é enantiomero natural de 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E2) que parece não apresentar efeitos feminilizantes, devido a baixa afinidade com receptores de estrogênio do tipo  $\beta$  (ANSTEAD et al., 1997).

A nível cerebral 17 $\alpha$ -E2 interage com hormônios anorexígenos o que conduz a uma redução do consumo alimentar, assim como de massa gorda, não afetando a quantidade de massa magra em camundongos machos (STOUT et al., 2017). É reportado inclusive, a capacidade dessa substância em melhorar a sensibilidade a glicose e a insulina (STOUT et al., 2017) similar a RC (GRESL et al., 2001). Em fêmeas os benefícios são mais brandos ou inexistentes (SIDHOM et al., 2020; STOUT et al., 2017). Ainda são pouco elucidados os efeitos da administração de 17 $\alpha$ -E2 na preservação da fertilidade e reprodução de camundongos fêmeas (ISOLA et al., 2020). Não obstante, ainda há uma preocupação em relação a administração 17 $\alpha$ -E2 em fêmeas, por ser um enantiomero da versão 17 $\beta$ -E2, mesmo que o 17 $\alpha$ -E2 tenha maior afinidade com receptor do tipo  $\alpha$ . Portanto, estudos são necessários para melhor elucidação da interação do 17 $\alpha$ -E2 na reprodução e fertilidade de fêmeas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o consumo de uma dieta restritiva em calorias ou suplementada com 17 $\alpha$ -E2 afetaria a taxa de prenhez, o quantitativo de filhotes por ninhada, assim como analisar alterações no peso da prole.

### 2. METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) numero 28986-2019. Os animais

foram fornecidos pelo Biotério UFPel e mantidos no Laboratório Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel. Foram utilizadas 36 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade de 3 meses, mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade ( $22 \pm 2$  °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60%) respectivamente. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle que recebiam dieta ad libitum, grupos submetidos à restrição calórica de 30% e de 10% e os que recebiam dieta livre com 17 $\alpha$ E2. O grupo controle recebeu dieta regular (LabDiet® 58YP, 66,4% de carboidratos, 20,5% de proteína, 13,1% de gordura, TestDiet; Richmond, IN, EUA), enquanto grupo estradiol (17 $\alpha$ E2; n=9) recebeu a mesma dieta suplementada com 17 $\alpha$ -E2 (14,4 ppm; Esteraloides, Newport, RI).

O tratamento durou 6 meses. Dez dias antes do acasalamento os animais RC receberam dieta livre para reverter o anestro e a alimentação livre manteve-se por mais 14 dias, período do acasalamento. Para cada 1 macho haviam 3 fêmeas. As fêmeas que apresentaram ganho de peso e desenvolvimento abdominal foram consideradas gestantes e utilizadas para o cálculo de prenhez. Ao final de 21 dias de gestação os filhotes foram contabilizados e pesados, calculou-se o peso médio da ninhada.

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com 17 $\alpha$ E2 não influenciou no número de filhotes/fêmea (Fig.1). Assim como, não favoreceu a fecundidade como fora observado no grupo RC 30% (Tab.1, P<0,05). O peso dos filhotes foi reduzido no grupo 17 $\alpha$ E2 (Fig.1), possivelmente dado o efeito anorexígeno percebido em machos por STOUT et al. (2017). A RC se demonstrou benéfica em ambos os grupos avaliados, sendo mais eficaz no grupo RC 30%. Nossos dados demonstram que houve nesse grupo maior taxa de prenhez e menor de mortes na ninhada. Achados semelhantes foram descritos por SELESNIEMI et al. (2008) em camundongos fêmeas submetidos a RC.

Tabela 1. Avaliação da fecundidade:

	Controle	17 $\alpha$ E2	RC30	RC10	Valor de P
<b>Taxa de prenhez (%)</b>	44.44 <sup>a</sup> (n= 4/9)	44.44 <sup>a</sup> (n=4/9)	100.00 <sup>b</sup> (n=6/6)	77.77 <sup>ab</sup> (n=7/9)	P < 0.05
<b>Perdas gestacionais (%)</b>	75.00 <sup>a</sup> (n=3/4)	25.00 <sup>a</sup> (n=1/4)	0.00 <sup>b</sup> (n=0/6)	14.28 <sup>ab</sup> (n=1/7)	P < 0.05
<b>Filhotes nascidos mortos (%)</b>	100.00 <sup>a</sup> (n=19/19)	93.33 <sup>a</sup> (n=15/16)	2.38 <sup>b</sup> (n=1/42)	32.14 <sup>c</sup> (n=19/28)	P < 0.05

Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05)

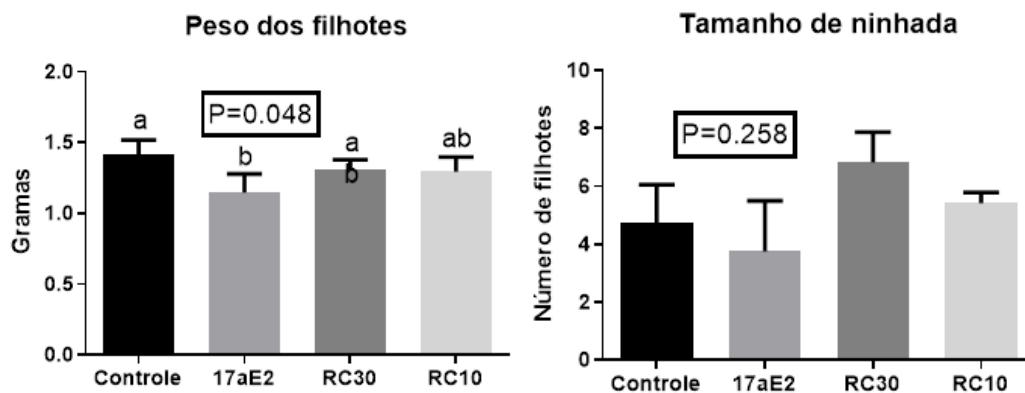


Figura 1. Peso dos filhos e tamanho da ninhada. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P<0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Tratamento com 17 $\alpha$ E2 não influenciou negativamente os parâmetros avaliados. Sugerindo que o fármaco não afeta negativamente a fertilidade de camundongos fêmeas. A restrição calórica foi favorável na redução de mortes de filhotes e no aumento da taxa de prenhez.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LOPEZ, S. G.; LUERER, U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, v. 36, n. 11, p. 1366-77, Jun 1 2004.
2. ADRIAENS, I., J. Smitz, and P. Jacquet, The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. *Hum Reprod Update*, 2009. 15(3): p. 359-77.
3. COLMAN, R. J.; ANDERSON, R. M. Nonhuman primate calorie restriction. *Antioxid Redox Signal*, v.14,n.2, p.229-39, Jan 15 2011.
4. SELESNIEMI, K.; LEE, H. J.; TILLY, J. L. Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell*,v.7, n.5, p.622-9,Oct 2008.
5. HARRISON DE, Strong R, et al. Acarbose, 17-alpha-estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. *Aging Cell*. 2014;13:273–282.
6. ANSTEAD GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*. 1997;62:268–303.
7. STOUT MICHAEL B., Frederik J. Steyn,et al.17 $\alpha$ -Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization, *The Journals of Gerontology: Series A*, Volume 72, Issue1, 1 Jan.2017, Pages 3–15.
8. GRESL, T. A. et al. Dietary restriction and glucose regulation in aging rhesus monkeys: a follow-up report at 8.5 yr. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 281, n. 4, p. E757-65, Oct 2001
9. SIDHOM, S., Schneider, A., Stout, M.B. et al. (2020). 17 $\alpha$ -estradiol modulates IGF1 and hepatic gene expression in a sex-specific manner. *The Journals of Gerontology: Series A*.



10. ISOLA JVV, Zanini BM, Sidhom S, et al. 17 $\alpha$ -Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. *Exp Gerontol*. 2020 Jan;129:110769.