



## PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO CALÓRICA E TRATAMENTO COM 17 $\alpha$ -ESTRADIOL

GIULIA DA CUNHA PEREIRA<sup>1</sup>; JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA<sup>2</sup>; JOÃO A. A. RINCON<sup>3</sup>; ARNALDO VIEIRA DINIZ<sup>4</sup>; MARIA ISABEL SCHIAVON COUSEN<sup>5</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [giuliacpereira@gmail.com](mailto:giuliacpereira@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jvvisola@ufpel.edu.br](mailto:jvvisola@ufpel.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [joaoal13@hotmail.com](mailto:joaoal13@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [arnaldo.vieira@ufpel.edu.br](mailto:arnaldo.vieira@ufpel.edu.br)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [isabelcousen@gmail.com](mailto:isabelcousen@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é caracterizado pelo declínio das atividades fisiológicas de um organismo (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; GENSOU et al., 2019). A taxa de envelhecimento em mamíferos é dependente do sexo e influenciada pela produção de diferentes hormônios gonadais. Algumas intervenções podem retardar o envelhecimento biológico (AUSTAD e FISCHER, 2016; GARRATT et al., 2018). Dentre as intervenções não farmacológicas, a restrição calórica (RC) se destaca. Atuando em diferentes vias metabólicas, incluindo o eixo somatotrófico, a RC pode estender a expectativa de vida em diversas espécies e minimizar problemas relacionados à idade (SELESNIEMI et al., 2008). Além disto, a RC é capaz de aumentar a longevidade reprodutiva de camundongos fêmeas, através da manutenção da reserva ovariana (GARCIA et al., 2019; LI et al., 2015). Outra intervenção que age por vias similares é a suplementação com 17 $\alpha$ -estradiol. O 17 $\alpha$ -estradiol é um enantiômero do 17 $\beta$ -estradiol, que atua por vias anorexígenas, e é capaz de estender a longevidade de camundongos machos, além de causar efeitos que incluem a redução da massa corporal e da adiposidade visceral sem diminuir a massa muscular (GARRATT et al., 2018). Em fêmeas, o 17 $\alpha$ -estradiol apresenta poucos efeitos (HARRISON et al., 2019) e, diferentemente da RC parece não exercer efeitos na reserva ovariana (ISOLA et al., 2019).

Por ter pouca afinidade pelos receptores  $\beta$  de estrogênio, o 17 $\alpha$ -estradiol não possui efeito feminilizante (STOUT et al., 2017; GARRATT et al., 2018), contudo, acredita-se que o 17 $\alpha$ -estradiol atua via receptores  $\alpha$  (MANN et al., 2020). No entanto, não se conhecem os efeitos do 17 $\alpha$ -estradiol na reprodução. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do tratamento com 17 $\alpha$ -estradiol e da restrição calórica na produção de embriões em camundongos fêmeas.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o protocolo N° 28986-2019. Foram utilizados 32 camundongos fêmeas, divididos em 4 grupos: camundongos com dieta regular (grupo controle), com 30% de restrição calórica (RC30), 10% de restrição calórica (RC10) e dieta suplementada com 17 $\alpha$ -estradiol (14 PPM na dieta). Os animais foram tratados por 6 meses, iniciando aos 3 meses de idade.

Para promover a ovulação, foi realizado um protocolo de sincronização da ovulação dos animais. Resumidamente, foi realizada aplicação intraperitoneal de 5 UI de eCG 5 dias prévios à eutanásia e 5 UI de hCG seguido por acasalamento (1 macho para cada duas fêmeas) 3 dias prévios à eutanásia. Ao final do período de 6 meses, todos os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, seguido de anestesia por via inalatória com isoflurano e eutanásia. Após a eutanásia, os animais tiveram os ovidutos removidos e lavados para a coleta, busca e classificação das estruturas embrionárias.

As variáveis avaliadas foram a porcentagem de fêmeas que responderam ao protocolo (essa porcentagem foi avaliada por meio da contagem de oócitos e embriões em microscópio óptico, através do número de fêmeas que apresentou ovulação, todas as fêmeas que possuíam alguma estrutura na análise foram consideradas responsivas), e as porcentagens relacionadas à resposta ao protocolo, sendo elas, a porcentagem do número total de estruturas embrionárias recuperadas e de embriões viáveis.

As análises estatísticas foram realizadas no Graphpad Prism 6. Foi utilizada ANOVA para estruturas totais e qui quadrado para a porcentagem de resposta ao protocolo de indução e porcentagem de embriões viáveis.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Resultados da contagem de oócitos e embriões.

	<b>Controle</b>	<b>17αE2</b>	<b>RC30</b>	<b>RC10</b>	<b>Valor de P</b>
<b>Resposta ao protocolo de sincronização (%)</b>	77,77 <sup>a</sup>	66,66 <sup>a</sup>	33,33 <sup>b</sup>	55,55 <sup>ab</sup>	P < 0,05
<b>Total de estruturas</b>	5,6	5,67	5,33	5	P = 0,985
<b>Embriões viáveis (%)</b>	6,45 <sup>a</sup>	15,00 <sup>ab</sup>	23,81 <sup>bc</sup>	16,66 <sup>abc</sup>	P < 0,05

De acordo com a tabela 1, a porcentagem de fêmeas que possuíam alguma estrutura, e, portanto, responderam ao protocolo de indução da ovulação foi similar entre o grupo controle e o 17α-estradiol. Logo, o tratamento com 17α-estradiol não causou nenhum efeito na porcentagem de fêmeas responsivas ao protocolo de sincronização da ovulação. A RC, por outro lado causou redução na porcentagem de fêmeas responsivas, sendo que no grupo RC30 menos fêmeas responderam e no grupo RC10, uma porcentagem intermediária de fêmeas respondeu. Este resultado já era esperado, uma vez que a RC costuma afetar negativamente a ciclicidade dos camundongos fêmeas, e para que os efeitos benéficos de tal intervenção se manifestem, é necessário um período de não restrição. Este período não foi permitido às presentes fêmeas, que foram mantidas em RC até o dia da eutanásia.

Não foi encontrada diferença no total de estruturas produzidas. Independente do grupo, a quantidade de estruturas embrionárias gerada foi similar. Com relação a porcentagem de embriões viáveis, apesar de uma menor quantidade de fêmeas do grupo RC30 ter respondido ao protocolo, as que responderam, produziram uma porcentagem maior de embriões viáveis, o que corrobora com estudos prévios (GARCIA et al., 2019; LI et al., 2015) que reportam melhorias na



fertilidade de animais submetidos a RC. Já os grupos 17 $\alpha$ -estradiol e o RC10 tiveram uma resposta inferior, e o controle obteve a pior resposta.

#### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com 17 $\alpha$ -estradiol não causou efeitos expressivos na produção de embriões, visto que a resposta à estimulação da ovulação, realizada pelo protocolo de sincronização, foi semelhante ao grupo controle. Isso demonstra que, possivelmente, o 17 $\alpha$ -estradiol não interfere no eixo reprodutivo de camundongos fêmeas. No entanto, a restrição calórica causou uma redução do número de fêmeas responsivas ao protocolo de sincronização e um aumento na porcentagem de embriões viáveis, confirmando uma interferência direta na produção desses embriões.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Stout MB, Steyn FJ, Jurczak MJ, et al. 17 $\alpha$ -Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 2017;72(1):3-15.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. **Cell**, 153(6), 1194–1217.

Garratt M, Lagerborg KA, Tsai YM, Galecki A, Jain M, Miller RA. Male lifespan extension with 17- $\alpha$  estradiol is linked to a sex-specific metabolomic response modulated by gonadal hormones in mice. **Aging Cell**. 2018;17(4):e12786.

Austad, S. N., & Fischer, K. E. (2016). Sex Differences in Lifespan. **Cell metabolism**, 23(6), 1022–1033.

Gensous, N., Franceschi, C., Santoro, A., Milazzo, M., Garagnani, P., & Bacalini, MG (2019). The Impact of Caloric Restriction on the Epigenetic Signatures of Aging. **Jornal internacional de ciências moleculares**, 20 (8), 2022.

Selesniemi, K., Lee, H. J., & Tilly, J. L. (2008). Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. **Aging cell**, 7(5), 622–629.

Garcia DN, Saccon TD, Pradiee J, Rincón JAA, Andrade KRS, Rovani MT, Mondadori RG, Cruz LAX, Barros CC, Masternak MM, Bartke A, Mason JB, Schneider A. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience**. 2019 Aug;41(4):395-408. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31359237; PMCID: PMC6815295.

Li, L., Fu, Y. C., Xu, J. J., Lin, X. H., Chen, X. C., Zhang, X. M., & Luo, L. L. (2015). Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling. **Reproductive sciences** (Thousand Oaks, Calif.), 22(1), 60–67.



Isola JVV, Zanini BM, Sidhom S, Kopchick JJ, Bartke A, Masternak MM, Stout MB, Schneider A. 17 $\alpha$ -Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. **Exp Gerontol**. 2020 Jan;129:110769. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31698046; PMCID: PMC6911620.

Harrison DE, Strong R, Allison DB, Ames BN, Astle CM, Atamna H, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nadon NL, Nelson JF, Pletcher S, Simpkins JW, Smith D, Wilkinson JE, Miller RA. Acarbose, 17- $\alpha$ -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. **Aging Cell**. 2014 Apr;13(2):273-82. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24245565; PMCID: PMC3954939.

Mann, SN, Hadad N, Nelson-Holte M, Rothman AR, Sathiaselalan R, Ali-Mondal S, Agbaga MP, Unnikrishnan A, Subramaniam M, Hawse J, Huffman DM, Freeman WM, Stout MB (2020). Health benefits attributed to 17 $\alpha$ -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor  $\alpha$ . **Cold Spring Harbor Laboratory**, bioRxiv 2020.06.02.130674