

EFEITO DO 17 α -ESTRADIOL E 17 β -ESTRADIOL NA RESERVA OVARIANA *IN VITRO*

JULIANE B. PROSCZEK¹; JOSÉ V. V. ISOLA²; JOAO A. ALVARADO-RINCÓN²;
GIULIA C. PEREIRA²; BIANKA M. ZANINI²; AUGUSTO SCHNEIDER³

¹Universidade Federal de Pelotas – julianeprosczek@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jvvisola@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas - joaoal13@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – giuliacpereira@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A mulher tem sua reserva ovariana limitada, a qual é estabelecida no início da vida (SONIGO, 2018). Uma vez que os folículos primordiais são ativados, irão se desenvolver até a ovulação ou sofrerão atresia (BROEKMAN, 2009). Com o envelhecimento, há diminuição da reserva ovariana, que está associada diretamente com a diminuição da fertilidade e com o começo da menopausa (RICHARDSON, 2014). Contudo, intervenções anti-envelhecimento buscam diminuir os impactos que o envelhecimento acarreta à reserva ovariana, podendo-se citar a restrição calórica (RC) e a utilização de substâncias como a rapamicina e o resveratrol, que apresentam efeitos positivos na diminuição da taxa de ativação de folículos primordiais e na manutenção da reserva ovariana (GARCIA, 2019; PISKOVATSKA, 2019).

O 17 α -estradiol (17 α -E2) é um enantiômero do 17 β -estradiol (17 β -E2) que está presente naturalmente em mamíferos de ambos os sexos (MANN, 2020). Estudos mostram que em camundongos machos, o tratamento com 17 α -E2 aumenta a longevidade (STOUT, 2017), a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina e diminuição do ganho de peso (GARRAT, 2017; GARRATT, 2018). Já em camundongos fêmeas inteiras, o tratamento com 17 α -E2 parece não ter efeitos (MANN, 2020). Entretanto, o tratamento com 17 α -E2 em camundongos fêmeas ovariectomizadas evita as alterações na adiposidade e morfologia uterina, sugerindo que o 17 α -E2 exógeno tem efeitos semelhantes aos estrógenos endógenos (MANN, 2020).

Além do mais, ovários de camundongos cultivados *in vitro* com estradiol ou progesterona tiverão redução da ativação de folículos primordiais, elicitando os efeitos promissores do 17 α -E2 (PHILLIP, 2003). Isto provavelmente, porque quando os níveis de esteróides em camundongos caem drasticamente e os folículos primordiais ficam livres para o desenvolvimento (PHILLIP, 2003). Diante do exposto anteriormente, objetivou-se avaliar o efeito do 17 β -E2 e 17 α -E2 no desenvolvimento folicular de ovários de camundongos fêmeas cultivados *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Camundongos C57BL/6 fêmeas ($n = 10$) com 30 dias de idade foram eutanasiados conforme descrito por (GARCIA, 2019). Após a eutanásia, foi realizada a coleta do par de ovários de cada animal. Os ovários foram alocados em 4 grupos ($n = 5$ ovários/grupo): controle não cultivado (fixados diretamente após a coleta; CTL), controle cultivado (cultivado *in vitro* sem suplementação hormonal;



CTL IV), cultivado com suplementação de 17a-E2 e cultivado com suplementação de 17b-E2. Cada ovário foi cultivado em 700 µL meio MEMα (ThermoFisher) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de insulina, transferrina e selênio (ITS) e antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), por sete dias com 5% de CO₂ à 37 °C. Cada 48 h foi realizada substituição de 50% do meio de cultivo (ABID, 2015). A suplementação de 17a-E2 foi realizada a fim de assemelhar-se as concentrações séricas de 17a-E2 quando suplementado por via oral *in vivo* (STOUT, 2017), 10 ng/mL e o 17a-E2 foi suplementado em uma concentração previamente relatada (30 pg/mL) (WISE, 2001).

Ao sétimo dia de cultivo, os ovários foram desidratados em álcool e xileno e incluídos em paraplast. Os blocos de paraplast foram então cortados em série com um micrótomo. Um a cada seis cortes foi colocado em lâminas histológicas. As lâminas, após secagem em estufa à 56 °C por 24 h, foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas e resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA). Os folículos foram classificados como primordiais quando rodeados por uma única camada de células planas da granulosa, como primários quando rodeados por uma única camada de células cubóides da granulosa, como folículo de transição quando rodeados por células achatadas e cuboidais, como secundários quando rodeados por mais de uma camada de células cubóides da granulosa sem antro visível (MYERS et al., 2004) e contados usando as objetivas de 40x de um microscópio acoplado a uma câmera e o software TC Capture (Tucson Photomics Co.). O número de folículos contados foi então multiplicado por 6 para contabilizar as seções não analisadas (ISOLA, 2020). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA no software GraphPad Prism 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folículos decresceu durante o cultivo *in vitro* (Figura 1), comparado aos ovários não cultivados, o que já era esperado, pois estudos indicaram que o desenvolvimento e a sobrevivência dos folículos no tecido ovariano *in vitro* são menores (KAWAMURA, 2019). Isso ocorre porque, a retirada dos ovários do organismo ativa o desenvolvimento dos folículos primordiais (ABDI, 2015). A suplementação com 17a-E2, 17b-E2 ao cultivo *in vitro* afetou a quantidade de folículos, menos os primários, e a % de folículos primordiais.

Ou seja, quando 17a-E2 é administrado em camundongos machos pode aumentar a expectativa média de vida destes, contudo podendo variar o efeito dependendo a dose utilizada do 17a-E2. No entanto, o tratamento em fêmeas não aumentou a longevidade (STRONG, 2016). Isto demonstra a não efetividade em fêmeas, contudo, quando as fêmeas são ovariectomizadas, efeitos anti-envelhecimento puderam ser evidenciados (MANN, 2020). Além do mais, podemos observar neste estudo um efeito direto de 17a-E2 e 17b-E2 nos ovários quando separados dos efeitos no organismo inteiro. Podendo sugerir que a presença dos ovários de alguma forma afeta o efeito do 17a-E2. Eventualmente, por os mecanismos pelos quais o 17a-E2 atua não serem completamente elucidados.

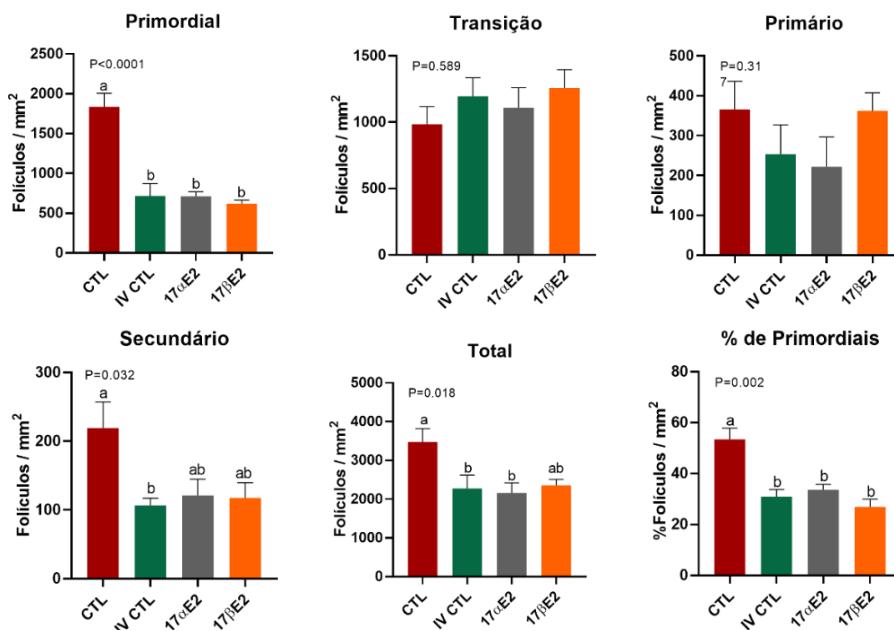


Figura 1 - Quantificação das estruturas foliculares conforme o estágio de desenvolvimento de ovários de camundongos fêmeas cultivados *in vitro* durante 7 dias, suplementados com 17 α -E2, 17 β -E2 ou sem suplementação (IV CTL). CTL: Controle, ovários não cultivados *in vitro*.

4. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, a suplementação *in vitro* com 17 β -E2 ou 17 α -E2 não afetaram reserva ovariana, visto que, a ativação de folículos primordiais *in vitro* foi semelhante entre os grupos tratados e o grupo controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SONIGO C, BEAU I, GRYNBERG M, BINART N. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. FASEB J. 2019
- BROEKMAN, F. J.; SOULES, M. R.; FAUSER, B. C. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews*, v. 30, n. 5, p. 465-493, 2009.
- RICHARDSON MC, GUO M, FAUSER BC, Macklon NS. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update*. 2014
- 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.
- PISKOVATSKA V, STRILBYTSKA O, KOLIADA A, VAISERMAN A, LUSHCHAK O. Health Benefits of Anti-aging Drugs. *Subcell Biochem*. 2019
- STOUT MB, STEYN FJ, JURCZAK MJ, CAMPOREZ JG, ZHU Y, HAWSE JR, JURK D, PALMER AK, XU M, PIRTSKHALAVA T, EVANS GL, DE SOUZA SANTOS R, FRANK AP, WHITE TA, MONROE DG, SINGH RJ, CASACLANG-VERZOSA G, MILLER JD, CLEGG DJ, LEBRASSEUR NK, VON ZGLINICKI T, SHULMAN GI, TCHKONIA T, KIRKLAND JL. 17 α -Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017



- 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-alpha estradiol is linked to a sex-specific metabolomic response modulated by gonadal hormones in mice. *Aging Cell*, v.17, n.4, p.e12786, 2018.
- PHILLIP KEZELE, MICHAEL K. SKINNER, Regulamento da montagem e desenvolvimento do folículo primordial ovariano por estrogênio e progesterona: modelo endócrino da montagem do folículo, **endocrinologia**, Volume 144, Edição 8, 1 de agosto de 2003, Páginas 3329-3337.
- MANN SN, PITEL KS, NELSON-HOLTE MH, IWANIEC UT, TURNER RT, SATHIASEELAN R, KIRKLAND JL, SCHNEIDER A, MORRIS KT, MALAYANNAN S, HAWSE JR, STOUT MB. 17 α -Estradiol prevents ovariectomy-mediated obesity and bone loss. *Exp Gerontol*. 2020.
- CHOI J, LEE JY, LEE E, YOON BK, BAE D, CHOI D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology*. 2007
- KAWAMURA K, Ishizuka B, Hsueh AJW. Drug-free in-vitro activation of follicles for infertility treatment in poor ovarian response patients with decreased ovarian reserve. **Reprod Biomed Online**. 2020
- STRONG R, MILLER RA, ANTEBI A, ASTLE CM, BOGUE M, DENZEL MS, FERNANDEZ E, FLURKEY K, HAMILTON KL, LAMMING DW, JAVORS MA, DE MAGALHÃES JP, MARTINEZ PA, MCCORD JM, MILLER BF, MÜLLER M, NELSON JF, NDUKUM J, RAINGER GE, RICHARDSON A, SABATINI DM, SALMON AB, SIMPKINS JW, STEEGENGA WT, NADON NL, HARRISON DE. Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an α -glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer. *Aging Cell*. 2016
- WISE, P. M., DUBAL, D. B., WILSON, M. E., RAU, S. W., BÖTTNER, M., & ROSEWELL, K. L. (2001). Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Research Reviews**, 37(1-3), 313-319.
- MANN, SHIVANI N ET AL. "Health benefits attributed to 17 α -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor α ." *E Life* vol. 9 e59616. 8 Dec. 2020,
- MYERS, M., BRITT, K. L., WREFORD, N. G. M., EBLING, F. J., AND KERR, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*