

EFEITO DOS SENOLÍTICOS D+Q NA CONCENTRAÇÃO, MORFOLOGIA ESPERMÁTICA E NÍVEIS DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS

DRIELE NESKE GARCIA¹; JÉSSICA DAMÉ HENSE²; BIANKA MACHADO ZANINI³; JULIANE BRISTOT PROSCZEK⁴; BIANCA MACHADO ÁVILA⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – julianeproszczek@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bianca_avila@ymail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augusto.schneider@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A senescência celular é um mecanismo de defesa para interromper a proliferação de células danificadas (CALCINOTTO et al. 2019). As células senescentes podem evitar a apoptose e possuem um fenótipo secretor associado à senescência (SASP), atraindo macrófagos para sua depuração (TCHKONIA et al. 2013). O número de células senescentes aumenta com a idade em diferentes tecidos (LOPEZ-OTIN et al. 2013) e está associado ao aumento da inflamação e disfunção tecidual, levando ao aumento da incidência de várias doenças relacionadas ao envelhecimento (LOPEZ-OTIN et al. 2013). Recentemente, foi demonstrado que o tratamento de camundongos velhos com drogas senolíticas, dasatinibe e quercetina (D+Q), reduz seletivamente o número de células senescentes. Como resultado, a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento é reduzida e os camundongos têm uma vida útil mais longa (XU et al. 2018). O tratamento a longo prazo com D+Q foi descrito como seguro e eficiente em baixas doses tanto *in vitro* quanto *in vivo* (XU et al. 2018). A combinação de D+Q também tem efeitos senolíticos em humanos (JUSTICE et al. 2019). No entanto, estudos de longo prazo para entender os efeitos do D+Q na fertilidade são escassos.

O envelhecimento diminui a função reprodutiva em homens e mulheres por mecanismos que ainda não estão claros. Embora seja conhecido o aumento da carga de células senescentes com o envelhecimento em vários tecidos (HOHN et al. 2017), não há dados sobre isso nos órgãos reprodutores masculinos. A fertilidade nos machos não parece sofrer um declínio acentuado com a idade como observado nas fêmeas, no entanto há um declínio progressivo nos níveis de testosterona (HARRIS et al. 2011), na motilidade, concentração e qualidade espermática com a idade (OLIVEIRA et al. 2014). Além disso, uma diminuição nos níveis de testosterona está associada à produção deficiente de espermatozóides (SMITH; WALKER, 2014). Como a senescência celular é um fenômeno de ocorrência natural em diversos tecidos, sua ocorrência no testículo precisa ser caracterizada, bem como seu efeito sobre parâmetros espermáticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de drogas senolíticas D+Q na concentração, morfologia espermática e níveis de testosterona em camundongos machos.

2. METODOLOGIA

Para este estudo, camundongos C57BL/6 machos de 3 meses de idade (n=18) foram usados em condições controladas de temperatura, luz e umidade (22 ± 2°C, 12 horas claro/12 horas ciclos escuros e 40-60%). Os camundongos

foram divididos em grupo tratamento (n=9), que recebeu dasatinibe (5 mg/kg) e quercetina (50 mg/kg) por gavagem e grupo controle (n=9), que recebeu placebo, ambos em três dias consecutivos uma vez por mês. Todos os camundongos receberam água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o experimento. O tratamento foi iniciado aos 3 meses de idade e após seis meses de tratamento os camundongos foram anestesiados, eutanasiados, dissecados e os testículos, epidídimo, sêmen e sangue foram coletados para posterior análise. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

A coleta do sêmen do epidídimo foi colocada em um microtubo contendo 300 µL de solução Salina tamponada com fosfato (PBS 1x), pré-aquecida a 36,5° C. Os epidídimos foram suavemente fracionados com tesoura e agitados por 3 minutos para liberação dos espermatozoides. Para a análise da concentração espermática, 25 µL da solução de sêmen foram coletados e diluídos em 25 µL de solução salina-formaldeído. A concentração foi avaliada por contagem de espermatozoides em uma câmara de contagem de hemocitômetro (KHAKI et al. 2010). Os níveis de testosterona foram medidos por eletroquimioluminescência através das amostras de sangue que foram coletadas e centrifugadas a 2000 x g por 10 min para separar o soro.

Por fim, as células foram avaliadas quanto a defeitos morfológicos espermáticos. Para isso, uma gota de cada amostra de sêmen foi espalhada em uma lâmina de vidro e seca. As amostras foram então coradas com o método panóptico rápido. Cem células foram observadas em um microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 100X e contadas diferencialmente de acordo com defeitos na cauda, cabeça e peça intermediária ou, na ausência de defeitos, consideradas normais (BRUNER-TRAN et al. 2014). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 usando o teste T para comparação entre os grupos. Os valores foram apresentados como Média ± SEM e valores de P menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática está representada na Figura 1A. O grupo tratado com D+Q obteve maior concentração de espermatozoides em relação ao grupo controle (P=0,01). Os níveis de testosterona do soro estão representados na figura 1B. O nível de testosterona do grupo tratado com D+Q foi maior em relação ao controle que recebeu placebo (P=0,04).

Sabemos que há um declínio progressivo nos níveis de testosterona (HARRIS et al. 2011), na motilidade, concentração e qualidade espermática com o avançar da idade (OLIVEIRA et al. 2014) e que uma diminuição nos níveis de testosterona está associada à produção deficiente de espermatozoides (SMITH; WALKER, 2014), alterando assim a concentração espermática. Além disso, uma deficiência nesses parâmetros pode prejudicar a função do esperma e assim afetar a infertilidade masculina (WHO 2010). No presente estudo os senolíticos D+Q demonstraram um papel benéfico e protetor sobre a diminuição dos níveis de testosterona e concentração espermática. Esse efeito dos senolíticos é possível que ocorra, em parte, por conta do efeito antioxidante da quercetina (DAVID et al. 2016) sobre o estresse oxidativo nos testículos. A quercetina por possuir potencial antioxidante pode ter influenciado positivamente no grupo tratado. Vale salientar que os efeitos descritos da quercetina na qualidade do esperma dependem da dose e da duração do tratamento (TAEPONGSORAT et al. 2008).

As análises da morfologia do sêmen estão representadas na Figura 2. A porcentagem de espermatozoides normais foi 8% maior no grupo tratado com D+Q em relação ao grupo controle ($P=0,01$). Como mencionado anteriormente, a morfologia normal dos espermatozoides diminui com o avanço da idade e a morfologia anormal do esperma (teratospermia) está relacionada a mudança na qualidade do mesmo (HARRIS et al. 2011). O processo de espermatogênese depende da produção de testosterona, sem esse hormônio uma das consequências é o bloqueio na conversão de espermatídies redondas em espermatídies alongadas devido a um defeito na adesão celular (HOLDCRAFT et al. 2004). Assim a testosterona está envolvida na espermiogênese e consequentemente influencia na morfologia espermática. Os níveis aumentados de testosterona do grupo tratado com D+Q podem ter influenciado na maior porcentagem de espermatozoides com morfologia normal, portanto.

Existe uma escassez de estudos avaliando os efeitos do D+Q sobre os parâmetros espermáticos, portanto faz-se necessário mais estudos que avaliem os efeitos dos senolíticos sobre a função testicular, parâmetros espermáticos e também sobre a fertilidade masculina.

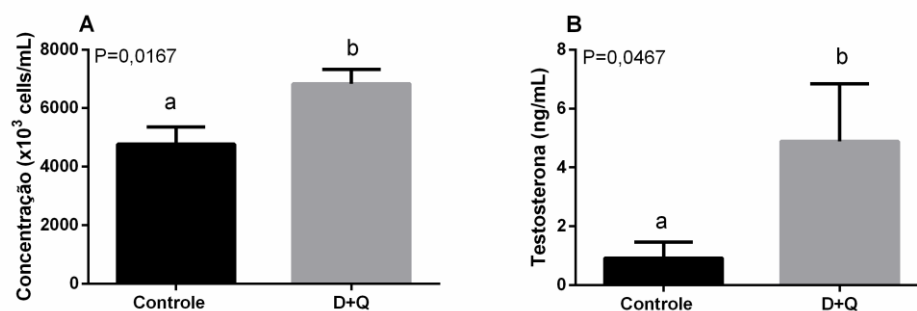


Figura 1. Análise da concentração espermática (A) e níveis de testosterona (B) de camundongos machos tratados com dasatinibe e quercetina (D+Q) ou placebo (grupo controle) após um período de 6 meses. Letras diferentes representa $P \leq 0,05$.

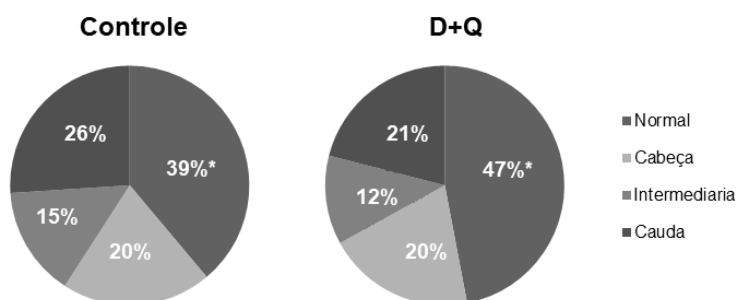


Figura 2. Análise morfológica dos espermatozoides. Porcentagem de espermatozoides normais, com defeitos de cabeça, intermediários ou de cauda de camundongos machos tratados com dasatinibe e quercetina (D+Q) ou placebo (grupo controle) após um período de 6 meses. *representa $P \leq 0,05$.

4. CONCLUSÕES

O tratamento com D+Q durante 6 meses em camundongos machos com início aos 3 meses de idade melhorou a concentração e a morfologia espermática

bem como aumentou os níveis de testosterona no soro desses animais, melhorando assim a morfologia espermática normal. Portanto, é importante que mais estudos sejam realizados para entender melhor os efeitos dos senolíticos sobre a função testicular e capacidade reprodutiva de machos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNER-TRAN KL, DING T, YEOMAN KB, ARCHIBONG A, AROSH JA e OS-TEEN KG. Developmental exposure of mice to dioxin promotes transgenerational testicular inflammation and an increased risk of preterm birth in unexposed mating partners. **PLoS One**, v.9, n.8, p. e105084, 2014.

CALCINOTO A, KOHLI J, ZAGATO E, PELLEGRINI L, DEMARIA M e ALIMONTI A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*, v.99, n.2, p.1047–1078, 2019.

DAVID AVA, ARULMOLI R e PARASURAMAN S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev.*, v.10, n.20, p.84–89, 2016.

HARRIS ID, FRONCZAK C, ROTH L e MEACHAM RB. Fertility and the Aging Male. *Rev Urol*, v.13, n.4, p.e184–e190, 2011.

HÖHN A, WEBER D, JUNG T, OTT C, HUGO M, KOCHLIK B, KEHM R, KÖNIG J, GRUNE T e CASTRO JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, v.11, p.482-501, 2017.

HOLDCRAFT RW e BRAUN RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, v.131, n.2, p.459-467, 2004.

JUSTICE JN, NAMBIAR AM, TCHKONIA T et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, v.40, p.554-563, 2019.

KHAKI A, FATHIAZAD F, NOURI M, et al. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytother Res*, v.24, n.9, p.1285-1291, 2010.

LOPEZ-OTIN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, SERRANO M, KROEMER G. The hallmarks of aging. *Cell*, v.153, n.6, p.1194-1217, 2013.

OLIVEIRA JBA, PETERSEN CG, MAURI AL, VAGNINI LD, BARUFFI RLR, FRANCO Jr. JG. The effects of age on sperm quality: an evaluation of 1,500 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction*, v.18, n.2, p.34-41, 2014.

SMITH LB e WALKER WH. The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Semin Cell Dev Biol*, v.30, p.2-13, 2014.

TAEPONGSORAT L, TANGPRAPRUTGUL P, KITANA N e MALAIVIJITNOND S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. *Asian J Androl*, v.10, n.2, p.249–258, 2008.

TCHKONIA T, ZHU Y, VAN DEURSEN J, CAMPISI J, KIRKLAND JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The J Clin Invest*, v.123, n.3, p.966-972, 2013.

XU M, PIRTSKHALAVA T, FARR JN et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, v.24, n.8, p.1246-1256, 2018.

WHO laboratory. Manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization Publications, v.5th ed., 2010.