

EFEITO DO 17 β E 17 α ESTRADIOL NA RESERVA OVARIANA DE CAMUNDONGOS

JULIANE BRISTOT PROSCZEK¹; GIULIA DA CUNHA PEREIRA²; CÉSAR AUGUSTO PINZÓN OSÓRIO²; SHARA SODRÉ²; GABRIELA ALTMAYER BLANCO²; AUGUSTO SCHNEIDER³

¹Universidade Federal de Pelotas – julianeprosczek@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – giuliacpereira@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – capinzono@unal.edu.co

² Universidade Federal de Pelotas – sharasodre@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – Gabriela.altmayer.blanco15@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – augusto.schneider@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A reserva ovariana é composta por folículos primordiais, que se apresentam em estado quiescente, ou seja, inativos. Este são continuamente recrutados, podendo sofrer ovulação ou entrar em atresia em alguma etapa do desenvolvimento (BROEKMAN, 2009). Consequentemente com o envelhecimento há diminuição da reserva ovariana e da fertilidade. Quando a reserva ovariana se esgota, as mulheres entram na menopausa, o que aumenta a probabilidade de desenvolver doenças crônicas como, diabetes, doenças cardiovasculares e osteoporose (WELLONS, 2012).

O 17 β -E2 é a principal forma de estradiol produzida pelas fêmeas, conhecido como o hormônio sexual feminino e responsável pelo desenvolvimento sexual, ciclo menstrual, saúde óssea, cardiovascular e função cerebral (GARRET, 2017; GARRET 2019). No entanto, o 17 α -E2 é um diastereoisômero natural do 17 β -E2, predominantemente estudado como um hormônio neuro-protetor em modelos de isquemia, doença de Alzheimer e Parkinson (PEREZ, 2005). O 17 α -E2 é encontrado em quantidades mínimas em machos e fêmeas naturalmente. No entanto, sua suplementação exógena tem mostrando capacidade anorexígena no hipotálamo, prevenindo o aumento de peso e adiposidade em machos (GARRET, 2017) e fêmeas ovariectomizadas (MANN, 2020).

É sabido que folículos primordiais não possuem receptores de estradiol, sendo principalmente ativados por fatores de crescimento (SCHOMBERG, 1999). Ou seja, sua ativação independe dos hormônios do ciclo estral, diferente dos folículos antrais (COUSE, 1999). No entanto, como os estrógenos podem afetar crescimento corporal e adiposidade, nosso objetivo foi analisar se o 17 α -E2 e o 17 β -E2 podem afetar a reserva ovariana de fêmeas.

2. METODOLOGIA

Animais: Camundongos fêmeas C57BL/6J de 30 semanas de idade foram adquiridos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Todos os procedimentos com animais foram revisados e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais no Sistema de Saúde VA de Oklahoma City. Os animais foram mantidos em $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Todos os camundongos tiveram acesso ad libitum a comida e água durante todo o período experimental. Os animais foram divididos em 4 grupos: CTL (alimentados com dieta controle), 17 α -E2 (alimentados com dieta suplementada com 14,4 ppm de 17 α -E2), alto 17 β -E2 (alimentados com dieta suplementada com 4,4 ppm de 17 β -E2) e baixo 17 β -E2 (alimentados com dieta suplementada com 2,2 ppm de 17 β -E2). O tratamento foi conduzido por 16 semanas.

Amostras e processamento: Ao final do tratamento, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados. Após os ovários foram coletados e um dos ovários foi incluído em parafina. Após os mesmos foram sequencialmente cortados em uma espessura de 5 µm, uma seção a cada seis cortes foi colocada em lâminas histológicas padrão e corados com eosina e hematoxilina. Com a finalidade de avaliar a reserva ovariana foram realizadas imagens de seções ovarianas capturadas por câmera digital (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) acoplada em microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), utilizando objetivas de 10 e 40X. A classificação dos folículos ovarianos foi com base em referencias previas (MYERS, 2004). Ainda por fim, a quantidade total de folículos encontrada foi multiplicada por seis e posteriormente novamente multiplicada por dois, a fim de mimetizar a quantidade de folículos dos dois ovários (ISOLA, 2020; SCHNEIDER, 2021).

Análise de dados: Foi realizada a análise de variância de uma via no software GraphPad Prism 8. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com 17 α -E2 e com 17 β -E2 em diferentes doses não afetou a reserva ovariana. O número de folículos primordiais (Figura 1A, $P > 0,90$), primários (Figura 1B, $P > 0,60$), secundários (Figura 1C, $P > 0,30$), terciários (Figura 1D, $P > 0,70$) e totais (Figura E, $P > 0,70$) foi semelhante entre os grupos.

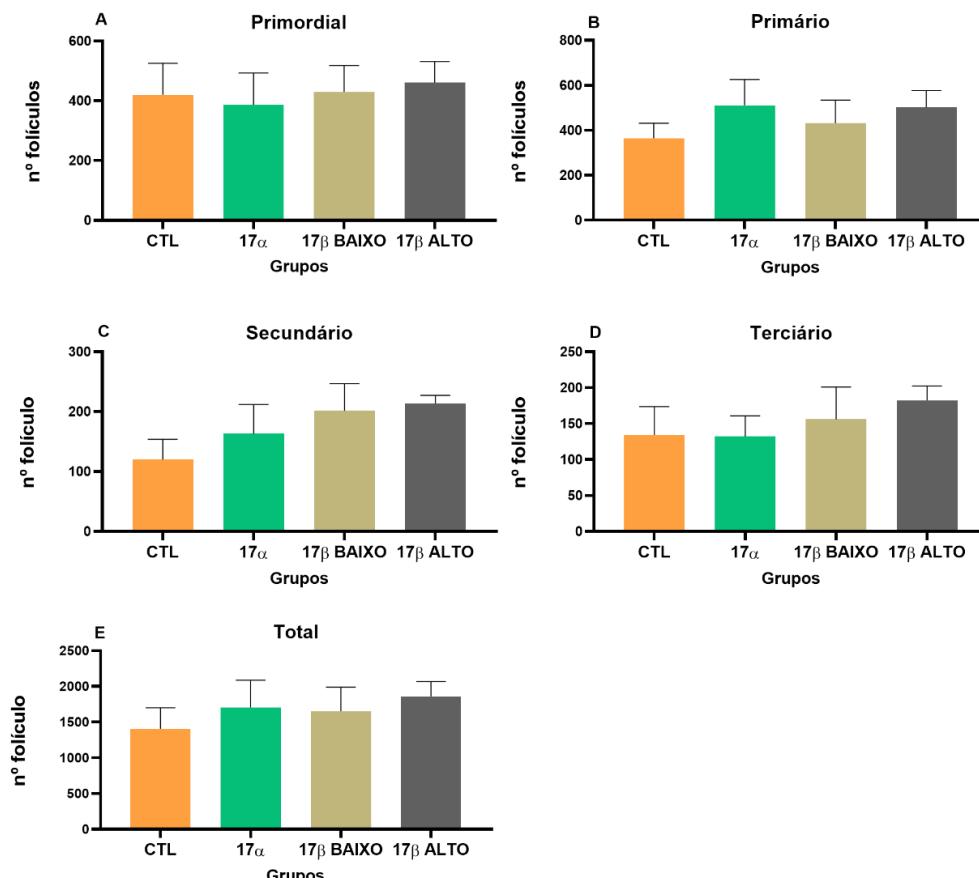


Figura 1 – Quantificação dos folículos primordiais (A), primários (B), secundários (C), terciários (D) e total (E) analisados nos ovários dos animais

controle (CTL), tratados com 17 α -estradiol (17 α), alto 17 β -estradiol (17 β ALTO) e baixo 17 β -estradiol (17 β BAIXO).

Nós observamos que o tratamento com 17 α -E2 não teve nenhum efeito na preservação da reserva ovariana de camundongos, o que é similar ao encontrado em estudos anteriores (ISOLA, 2022; ISOLA 2020). Apesar de machos e fêmeas ovariectomizadas tratados com 17 α E2 apresentarem perda de peso e de tecido adiposo, fêmeas intactas não obtiveram o mesmo benefício do tratamento com 17 α E2, o que reforça ainda mais que o tratamento é coadjuvante em aspectos relacionados a menopausa (GARRET, 2017; ISOLA, 2020; MANN, 2020). Desta maneira, parece que os tecidos reprodutivos têm uma influência direta sobre os efeitos benéficos do 17 α -E2. Uma das hipóteses é de que existe uma competição entre 17 α -E2 e 17 β -E2 por receptores estrogênicos. Neste caso a produção endógena de altos níveis de 17 β -E2 nas fêmeas poderia ser capaz de suprimir a ligação do 17 α -E2 ao ER α , uma vez que o 17 β -E2 possui afinidade maior com ambos os receptores (ER α e ER β) (ANSTEAD, 1997), explicando a baixa responsividade das fêmeas intactas.

O 17 α -E2 atua principalmente através do ER α , que possui impacto na reprodução feminina. Camundongos fêmeas com knockout do ER α KO são inférteis (LUBAHN, 1993), e embora apresentem progressão normal pelos estágios de folículo primordial, primário e antrais, a maturação dos folículos pré-ovulatórios é comprometida (SCHOMBERG, 1999). Em zebrafish, no entanto, o knockout do ER α resulta na hiperativação dos folículos primordiais (CHEN, 2018). Da mesma forma, em humanos, defeitos no gene que codifica ER α , resultam em depleção prematura de folículos ovarianos ou foliculogênese interrompida (GOSWAMI, 2005). Apesar disso em nosso estudo o tratamento de femeas intactas com 17 α -E2 não afetou a reserva ovariana.

Contudo o tratamento com baixas e altas doses de 17 β -E2 também não impactou a reserva ovariana. O ER β é expresso exclusivamente nos núcleos das células da granulosa dos folículos primários, secundários e maduros (SAR, 1999). Portanto, o 17 β -E2 não possui um efeito direto nos folículos primordiais. No entanto, estudos anteriores sugerem que fitoestrogenos, compostos derivados de plantas com atividade estrogênica, podem reduzir o número de folículos primordiais em animais sexualmente imaturos (MEDIGOVIC, 2012). Nossos resultados sugerem que animais sexualmente maduros tais efeitos não são observados.

4. CONCLUSÕES

Tanto o tratamento com 17 α -E2, como 17 β -E2, não afetaram o número de folículos na reserva ovariana. Isto nos indica que os folículos primordiais não apresentam sensibilidade aos hormônios estrógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 62, n. 3, p. 268-303, Mar 1997.
- BROEKMAN, F. J.; SOULES, M. R.; FAUSER, B. C. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*, 30, n. 5, p. 465-493, Aug 2009.
- CHEN, Y.; TANG, H.; WANG, L.; HE, J. et al. Fertility Enhancement but Premature Ovarian Failure in esr1-Deficient Female Zebrafish. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, p. 567, 2018.

- COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocr Rev**, 20, n. 3, p. 358-417, Jun 1999.
- 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**, 16, n. 6, p. 1256-1266, Dec 2017.
- GARRATT, M.; LEANDER, D.; PIFER, K.; BOWER, B. et al. 17-alpha estradiol ameliorates age-associated sarcopenia and improves late-life physical function in male mice but not in females or castrated males. **Aging Cell**, 18, n. 2, p. e12920, Apr 2019.
- GOSWAMI, D.; CONWAY, G. S. Premature ovarian failure. **Hum Reprod Update**, 11, n. 4, p. 391-410, Jul-Aug 2005.
- ISOLA, J. V. V.; ZANINI, B. M.; HENSE, J. D.; ALVARADO-RINCON, J. A. et al. Mild calorie restriction, but not 17alpha-estradiol, extends ovarian reserve and fertility in female mice. **Exp Gerontol**, 159, p. 111669, Mar 2022.
- ISOLA, J. V. V.; ZANINI, B. M.; SIDHOM, S.; KOPCHICK, J. J. et al. 17alpha-Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. **Exp Gerontol**, 129, p. 110769, Jan 2020.
- LUBAHN, D. B.; MOYER, J. S.; GOLDING, T. S.; COUSE, J. F. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, n. 23, p. 11162-11166, Dec 1 1993.
- MANN, S. N.; PITEL, K. S.; NELSON-HOLTE, M. H.; IWANIEC, U. T. et al. 17alpha-Estradiol prevents ovariectomy-mediated obesity and bone loss. **Exp Gerontol**, 142, p. 111113, Dec 2020.
- MEDIGOVIC, I.; RISTIC, N.; TRIFUNOVIC, S.; MANOJLOVIC-STOJANOSKI, M. et al. Genistein affects ovarian folliculogenesis: a stereological study. **Microsc Res Tech**, 75, n. 12, p. 1691-1699, Dec 2012.
- MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G. M.; EBLING, F. J. P. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, 127, n. 5, p. 569-580, 2004-05-01 2004.
- PEREZ, E.; LIU, R.; YANG, S. H.; CAI, Z. Y. et al. Neuroprotective effects of an estratriene analog are estrogen receptor independent in vitro and in vivo. **Brain Res**, 1038, n. 2, p. 216-222, Mar 21 2005.
- SAR, M.; WELSCH, F. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. **Endocrinology**, 140, n. 2, p. 963-971, Feb 1999.
- SCHNEIDER, A.; SACCON, T. D.; GARCIA, D. N.; ZANINI, B. M. et al. The Interconnections Between Somatic and Ovarian Aging in Murine Models. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 76, n. 9, p. 1579-1586, Aug 13 2021.
- SCHOMBERG, D. W.; COUSE, J. F.; MUKHERJEE, A.; LUBAHN, D. B. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. **Endocrinology**, 140, n. 6, p. 2733-2744, Jun 1999.
- WELLONS, M.; OUYANG, P.; SCHREINER, P. J.; HERRINGTON, D. M. et al. Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Menopause**, 19, n. 10, p. 1081-1087, Oct 2012.