

EFEITO DO 17 α E 17 β ESTRADIOL NA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DE CAMUNDONGOS

GIULIA DA CUNHA PEREIRA¹; JULIANE BRISTOT PROSCZK²; CÉSAR AUGUSTO OSÓRIO³; CAMILA LAPISCHIES MOREIRA⁴; AUGUSTO SCHNEIDER⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – giuliacpereira@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – julianeprosczk@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – camila.lapischies@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – Augusto.schneider@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida na população humana nas últimas décadas tem sido acompanhado por um declínio nas funções metabólicas à medida que a idade avança (CHRISTENSEN et al., 2009; LOPEZ-OTIN et al., 2013). Embora seja amplamente reconhecido que intervenções dietéticas, como a restrição calórica, têm o potencial de retardar ou reverter mecanismos fundamentais do envelhecimento, muitas dessas estratégias são de difícil implementação (LEE et al., 2021). Isto enfatiza a necessidade de considerar abordagens farmacológicas com o objetivo de conter processo de envelhecimento.

O 17 α -estradiol (17 α -E2), um composto diastereoisômero do 17 β -estradiol (17 β -E2), foi recentemente estudado por aumentar da expectativa de vida média em camundongos machos (STRONG et al., 2016; HARRISON et al., 2014). Adicionalmente, o 17 α -E2 reduziu a ingestão calórica e a adiposidade, ao mesmo tempo em que melhora diversos marcadores de homeostase metabólica, incluindo a tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e deposição de gordura subcutânea em camundongos machos (MANN et al., 2020). O estudo de ISOLA et al., 2022 também fornece evidências que o tratamento com 17 α -E2 em camundongos machos não afeta os parâmetros relacionados à fertilidade e aos hormônios masculinos circulantes.

Enquanto o papel do 17 β -E2 na fertilidade feminina é bem estabelecido, seu impacto na fertilidade masculina é pouco compreendido. O 17 β -E2 é produzido em pequenas quantidades nos testículos masculinos e é essencial para a espermatogênese e a manutenção da função testicular (SCHULSTER et al., 2016). Entretanto, níveis elevados desses hormônios foram associados à diminuição dos parâmetros espermáticos, resultando em redução da concentração, motilidade e morfologia espermática (SCHULSTER et al., 2016). Apesar da ampla evidência que sustenta os benefícios do 17 α -E2 em vários parâmetros metabólicos e de envelhecimento em machos, a pesquisa sobre o impacto potencial do 17 α -E2 sobre a fertilidade masculina, permanece limitada. Assim nosso objetivo foi comparar o efeito do 17 α e 17 β -E2 na dieta sobre parâmetros espermáticos de camundongos machos.

2. METODOLOGIA

Dieta controle e experimental: Todas as dietas foram preparadas pela TestDiet. Para evitar qualquer efeito de fitoestrógenos, não foram usadas dietas à

base de soja. A dieta padrão (66,4% de carboidratos, 20,5% de proteínas, 13,1% de gordura) foi utilizada como controle (CTL), e a mesma dieta foi suplementada com 17α -E2 (14,4 ppm, Steraloids, Newport, RI) ou 17β -E2 em duas diferentes doses (4,4 ppm e 2,2 ppm, Steraloids, Newport, RI) para os tratamentos.

Animais: Todos os procedimentos com animais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Instituição no Sistema de Saúde VA de Oklahoma City. Cinquenta e um ($n=51$) camundongos C57BL/6J machos com 30 semanas de idade foram adquiridos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Os camundongos foram randomizados por massa corporal em um dos 4 grupos: Controle ($n=13$; alimentados com dieta controle), 17α ($n=13$; alimentados com dieta suplementada com 17α -estradiol), 17β ALTO ($n=12$; alimentados com dieta suplementada com 4,4 ppm de 17β -estradiol) e 17β BAIXO ($n=13$; alimentados com dieta suplementada com 2,2 ppm de 17β -estradiol). Os animais foram alojados individualmente a $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em um ciclo de claro-escuro de 12 horas e possuíam acesso *ad libitum* a comida e água ao longo do período experimental. O tratamento foi realizado por 16 semanas. Ao final do período de tratamento, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por exsanguinação com punção cardíaca. Um dos epidídimos foi retirado e utilizado para coleta de esperma.

Coleta e análise de sêmen: Após a eutanásia dos machos, a cauda do epidídimo foi removida e colocada em um microtubo contendo 300 μL de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) pré-aquecido a 37°C (Cat #D6429, Sigma). O epidídimo foi fracionado com tesouras e repousou por 5 minutos para permitir a liberação dos espermatozoides (ISOLA et al 2022). Para análises de concentração espermática, 50 μL da solução de sêmen foram aliquotados e diluídos com 50 μL de solução salina-formaldeído (8,5g de NaCl, 100ml de formaldeído a 40%, 900ml de H_2O). Em seguida, 10 μL de cada amostra foram usados para a contagem de células de esperma utilizando um Contador Automatizado de Células Countess (Thermo Fisher Scientific).

Análise estatística: Realizada por meio do software Graph-Pad Prism 8. Os dados de concentração espermática foram comparados pelo teste one-way ANOVA, para comparar os resultados foi utilizado o PostHoc teste t. Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM e foram considerados significativos valores de P menores ou iguais a 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos recebendo suplementação com 17β -E2 apresentaram médias de concentração espermática mais baixas do que o grupo controle, porém semelhantes ao grupo 17α -E2 (Figura 1).

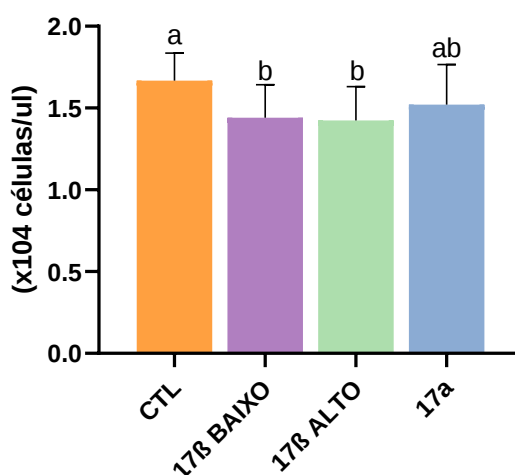


Figura 1. Quantificação da concentração espermiática representada por $n \times 10^4$ células por uL, analisados na solução seminífera no grupo controle (CTL), 17β-estradiol em baixa concentração (17β BAIXO), 17β-estradiol em alta concentração (17β ALTO) e 17α-estradiol (17α).

A análise espermiática indica que a suplementação com 17α-E2 não afetou a concentração espermiática. Esses resultados corroboram com estudos do nosso grupo, que conclui que o 17α-E2 não altera os parâmetros espermiáticos (ISOLA et al., 2022), diferentemente do 17β-E2 que, independentemente da concentração administrada, suprimiu a concentração espermiática. Portanto, a suplementação com 17α-E2 se mostra segura em não causar efeitos feminilizantes, reforçando o estudo de STOUT et al., 2017. As evidências indicam que o estradiol junto à testosterona inibe a espermatogênese (EWING et al., 1977). Possivelmente devido a um mecanismo de feedback negativo do hormônio luteinizante (LH) no homem, diminuindo tanto a frequência quanto a amplitude do pulso de LH (Hayes et al., 2000). Isso leva à redução da produção de testosterona e consequentemente comprometimento da fertilidade (Hayes et al., 2000). Estudos apontam que a conformação alfa do estradiol não afeta os níveis de testosterona circulante de camundongos e, da mesma forma, não afetou a concentração espermiática (STOUT et al., 2017 e ISOLA et al., 2022).

Importante ressaltar que a concentração espermiática é um importante preditor da fertilidade. Em geral, uma concentração espermiática mais alta pode ser associada a uma melhor capacidade reprodutiva, enquanto uma concentração mais baixa pode indicar um potencial comprometimento da fertilidade.

4. CONCLUSÕES

Dessa forma, tanto o tratamento com 17β-E2 em alta ou baixa concentração, reduziu as concentrações espermiáticas, diferentemente do 17α-E2 que não apresentou diferenças em relação a nenhum dos grupos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeoya-Osiguwa, S. A., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S. R., & Fraser, L. R. (2003). 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect

mammalian sperm function. **Human reproduction** (Oxford, England), 18(1), 100–107.

Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. **Lancet**. 2009 Oct 3;374(9696):1196-208. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61460-4. PMID: 19801098; PMCID: PMC2810516.

EWING, L., DESJARDINS, C., IRBY, D. *et al.* Synergistic interaction of testosterone and oestradiol inhibits spermatogenesis in rats. **Nature** 269, 409–411 (1977).

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- α -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. **Aging Cell**. 2014;13:273–282. doi: 10.1111/ace.12170.

Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF Jr. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. **J Clin Endocrinol Metab**. 2000 Sep;85(9):3027-35. PMID: 10999781.

Isola JVV, Veiga GB, de Brito CRC, Alvarado-Rincón JA, Garcia DN, Zanini BM, Hense JD, Vieira AD, Garratt M, Gasperin BG, Schneider A, Stout MB. 17 α -estradiol does not adversely affect sperm parameters or fertility in male mice: implications for reproduction-longevity trade-offs. **Geroscience**. 2022 Jun 11. Epub ahead of print. PMID: 35689785.

Lee MB, Hill CM, Bitto A, Kaeberlein M. Antiaging diets: separating fact from fiction. **Science**. 2021;374:eabe7365.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of **aging**. **Cell**. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.

Mann SN, Hadad N, Nelson Holte M, Rothman AR, Sathiaselvan R, Ali Mondal S, Agbaga MP, Unnikrishnan A, Subramaniam M, Hawse J, Huffman DM, Freeman WM, Stout MB. Health benefits attributed to 17 α -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor α . **Elife**. 2020 Dec 8;9:e59616.. PMID: 33289482; PMCID: PMC7744101.

Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. **Asian J Androl**. 2016 May-Jun;18(3):435-40. PMID: 26908066; PMCID: PMC4854098.

Stout MB, Steyn FJ, Jurczak MJ, Camporez JG, Zhu Y, Hawse JR, Jurk D, Palmer AK, Xu M, Pirtskhalava T, Et al., 17 α -Estradiol Alleviates Age-related Metabolic and Inflammatory Dysfunction in Male Mice Without Inducing Feminization. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 2017 Jan;72(1):3-15 Epub 2016 Jan 24. PMID: 26809497; PMCID: PMC5155656.

Strong R, Miller RA, Antebi A, Astle CM, Bogue M, Et al., Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an α -glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer. **Aging Cell**. 2016;15:872–884.