

PATRICK VIANNA GARCIA

**“ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS, ESTEREOLÓGICAS E
FUNCIONAIS NO EPIDÍDIMO E PARÂMETROS DE
FERTILIDADE EM RATOS TRATADOS COM
FINASTERIDA”.**

CAMPINAS, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRICK VIANNA GARCIA

**“ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS, ESTEREOLÓGICAS E
FUNCIONAIS NO EPIDÍDIMO E PARÂMETROS DE
FERTILIDADE EM RATOS TRATADOS COM FINASTERIDA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Patrick Vianna Garcia
Luís Violin
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Suzana de Fátima Paccola Mesquita

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G165a Garcia, Patrick Vianna, 1978-
Alterações morfométricas, estereológicas e
funcionais no epidídimo e parâmetros de fertilidade em
ratos tratados com finasterida / Patrick Vianna Garcia. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Luis Antonio Violin Dias Pereira.
Coorientador: Suzana de Fatima Paccola Mesquita.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epidídimo. 2. Finasterida. 3. Espermatozoides.
4. Fertilidade. I. Pereira, Luis Antonio Violin Dias,
1968-. II. Mesquita, Suzana de Fatima Paccola. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and fertility parameters in rats treated with finasteride

Palavras-chave em Inglês:

Epididymis

Finasteride

Sperm

Fertility

Área de concentração: Histologia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Luis Antonio Violin Dias Pereira

Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Odair Aguiar Junior

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Wellerson Rodrigo Scarano

Data da defesa: 10-05-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 10 de Maio de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior



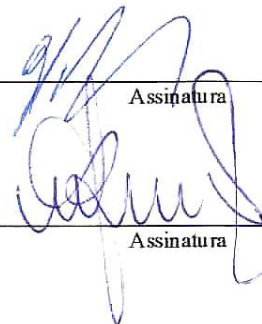
Assinatura

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes



Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



Assinatura

Prof. Dr. Edson Borges Júnior

Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Assinatura

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Assinatura

Dedico este trabalho

À minha mãe, **Carmen**,
pela fé, pelo amor e carinho,
pelo amparo em um simples olhar
e por mostrar que nem sempre quem espéra alcança
mas quem luta....
conquista.....

Ào meu pai, **Antonio**,
pela presença, pelo amor e amparo,
pelo sacrifício e abdição,
pela ternura e por ser mais que um pai.....
por ser meu amigo...

Ào meu irmão, **Erick**,
pela alegria, paciência e boa vontade,
pelo incentivo e companheirismo
e por ser um menino homem,
meigo em suas ações e,
visionário em seus sonhos.....

Ào meu irmão, **Yuri**,
pela compaixão e envolvimento,
pela lealdade e respeito e
por ser ele por si só.....
especial.....
(apesar de merecer puxões de orelha)...

À família **Biazin**,
pelo amor e carinho e
por terem me adotado como parte
da família.....

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.
(Albert Einstein)

Agradeço a Deus,
por ter me conduzido a todos os caminhos de minha vida
e por ter me ajudado a me encontrar
nos momentos menos afortunados.

Tenho tanto sentimento
Que é freqüente persuadir-me
De que sou sentimental,
Mas reconheço, ao medir-me,
Que tudo isso é pensamento,
Que não senti afinal.

Temos, todos que vivemos,
Uma vida que é vivida
E outra vida que é pensada,
E a única vida que temos
É essa que é dividida
Entre a verdadeira e a errada.

Qual porém é a verdadeira
E qual errada, ninguém
Nos saberá explicar;
E vivemos de manzira
Que a vida que a gente tem
É a que tem que pensar.

(Fernando Pessoa)

Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar
necessário.

Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue
nelas.

Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se prece!
Se o achar, segure-o!

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Antonio Violin Dias Pereira, pela credibilidade, seriedade, profissionalismo e orientação nos momentos difíceis, pela paciência nos momentos críticos acadêmicos e pessoais e pela inestimável convivência. Muito Obrigado,

A minha co-orientadora Profa. Dra. Suzana de Fátima Paccola Mesquita, pelo carinho, amparo, profissionalismo que demonstrou em minha vida acadêmica, mestrado e agora no doutorado, muito obrigado pelo ombro amigo,

A Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas pelo auxílio, inestimável contribuição científica para a execução desse trabalho e pelos conselhos,

Ao Prof. Paulo Juazeiro, pela inestimável convivência e por toda contribuição para a conclusão deste trabalho,

Aos demais professores do Departamento de Histologia e Embriologia – Instituto de Biologia/Unicamp, pela prontidão com que me atenderam em todas as minhas dificuldades,

A Profa. Dra. Maria Júlia Marques pelo apoio e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia/Unicamp por permitir acesso ao conhecimento.

Ao Programa de Aperfeiçoamento Científico (Cnpq) e a Capes pelo suporte financeiro,

A Merek Sharp & Dohme Corp. pela doação de finasterida para a realização das dosagens séricas hormonais e análise morfo métrica-esterrológica deste trabalho,

As amigas Mainara e Marília, pelo apoio, conselhos e amizade nesta caminhada e neste trabalho,

A amiga Petra, pela bondade, pelo respeito e carinho que existe em seu coração que ampara a todos em todos os momentos,

Ao amigo Sílvio pelo respeito, amizade, convivência e sabedoria nos momentos difíceis do trabalho e da vida,

A amiga Renata, pelos conselhos, sinceridade e carinho que me foram oferecidos em momentos difíceis e de alegria,

Ao amigo Juarez, pela ajuda, solidariedade e amizade que me acompanharam desde a graduação até este momento,

Aos amigos de Departamento de Histologia e Embriologia – Instituto de Biologia/Unicamp pelos momentos agradáveis em que passamos juntos em nossos trabalhos.

Aos amigos do Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências/Unesp- Botucatu por terem colaborado com a realização desse trabalho.

A amiga e secretária Lílian, pelo carinho nos momentos difíceis e por toda sua compreensão, pela prontidão e amparo nos momentos acadêmicos e pessoais.

Aos amigos e funcionários Natália, Stephanie, Baltazar, Raquel e Neusa pelo apoio e pelos momentos de descontração,

Ao Departamento de Histologia e Embriologia – Instituto de Biologia/Unicamp pelo acesso e disponibilização de equipamentos para a execução desse trabalho.

Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.
(Confúcio)

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract	11
1- Introdução	12
1.1- Fecundação: Características Gerais	12
1.2- Epidídimo: Características Anatômicas, Histológicas e Secreção Proteica para maturação do Espermatozoide	13
1.3- Andrógenos: Testosterona e Dihidrotestosterona (DHT)	15
1.4- Distúrbios Associados a Elevados Níveis de DHT: Alopecia Androgênica	16
1.5- Finasterida no Controle dos Níveis Elevados de DHT.	18
1.6- Finasterida e Reações Adversas.	19
1.7- Alopecia Androgênica e Fertilidade	20
2- Objetivos	21
2.1- Objetivos específicos	21
3- Materiais e Métodos	23
3.1- Animais.	23
3.2- Finasterida.	24
3.3- Tratamento.	25
3.4- Dosagem Sérica Hormonal.	25
3.5- Processamento para Análise Morfométrica-estereológica e Análise ultraestrutural.	26
3.6- Análises Morfométricas-estereológicas	27
3.7- Produção Diária de Espermatozoides no Testículo, Tempo de Trânsito de Espermatozoides no Epidídimo, Motilidade Espermática e Necropsia Espermática.	30
3.8- Acasalamento Natural	32
3.9- Inseminação Artificial Intra Útero	33
3.10- Parâmetros de Fertilidade	34
3.11- Forma de Análise dos Resultados	35
4- Resultados	36
4.1- Peso Corpóreo dos Animais.	36
4.2- Dosagem Sérica de Testosterona (T) e Dihidrotestosterona (DHT)	36
4.3- Razão do Peso dos Órgãos pelo Peso Corpóreo	38
4.4- Análise Histológica.	43
4.5- Análise Ultraestrutural.	44
4.6- Análise Morfométrica	45
4.7- Análise Estereológica	46
4.8- Produção Diária de Espermatozoides no Testículo e Trânsito Diário de Espermatozoides no Epidídimo	48
4.9- Motilidade Espermática	49
4.10- Testes de Necropsia	49
4.11- Parâmetros de Fertilidade	50
5- Discussão	52
6- Tabelas e Figuras	60
7- Capítulo I – Manuscrito	90
8- Conclusões Finais	116
9- Referências Bibliográficas da Introdução e Discussão	117
10- Anexos	133

RESUMO

Durante o processo de maturação epididimária, proteínas secretadas pelo epidídimo interagem com os espermatozoides modificando-os funcionalmente. Cerca de 75% das proteínas que participam da maturação epididimária são secretadas pelas células epiteliais do segmento inicial e cabeça do epidídimo e 48% destas proteínas tem a síntese dependente de dihidrotestosterona (DHT), a qual é sintetizada a partir da testosterona pela ação da enzima 5 α redutase. A DHT é de extrema importância para a fisiologia do sistema reprodutor masculino. Níveis elevados de DHT na vida adulta podem predispor a vários distúrbios, tais como a alopecia androgênica. Com o intuito de se minimizar os efeitos da DHT, a finasterida foi o primeiro inibidor da 5 α redutase que recebeu aprovação clínica para o tratamento desses distúrbios. Um público cada vez mais jovem utiliza a finasterida como um método preventivo e paliativo contra a alopecia androgênica, com isso, estudos dos efeitos da finasterida no sistema reprodutor masculino são de grande interesse clínico. O objetivo desse estudo foi avaliar as possíveis alterações no segmento da cabeça do epidídimo e na qualidade espermática em animais submetidos ao tratamento agudo (15 dias), crônico (56 dias) e animais que tiveram o tratamento (agudo e crônico) interrompido por um período de 30 dias. Na administração aguda (15 dias) de finasterida em ratos observou-se algumas alterações na integridade da membrana plasmática do espermatozoide. A administração crônica (56 dias) de finasterida em ratos leva a alterações no epidídimo, tais como: redução do peso, alterações morfométricas-estereológicas, diminuição do tempo de trânsito do espermatozoide, redução da motilidade, alterações na integridade da membrana do espermatozóide e redução nos parâmetros de fertilidade desses animais. Mesmo com a interrupção do tratamento com finasterida (por 30 dias) a qualidade do espermatozóide continua comprometida. Dessa forma, estudos adicionais devem ser realizados para complementar o conhecimento existente sobre a fisiologia do epidídimo após a depleção DHT, sobre o tempo que necessário para a recuperação dos parâmetros de fertilidade após a interrupção do tratamento com finasterida, e se estes parâmetros podem ser totalmente recuperados.

ABSTRACT

During epididymal maturation, proteins secreted by epididymis functionally interact with the spermatozoa modifying it. About 75% of the proteins that participate in the epididymal maturation are secreted by the epithelial cells of the initial segment and caput of the epididymis and 48% of the synthesis is dependent on dihydrotestosterone (DHT), which is synthesized from testosterone by the action of the enzyme 5 α reductase. The DHT is extremely important for the physiology of the male reproductive system. High levels of DHT in adulthood may predispose to various disorders such as androgenic alopecia. In order to minimize the effects of DHT, medications were produced with the purpose of inhibit the action of 5 α -reductase and among those medications the finasteride was the first 5 α reductase inhibitor that received clinical approval for the treatment of these disorders. A public increasingly young uses finasteride as a preventive and palliative method and against androgenic alopecia, in this way; studies of the effects of finasteride in the male reproductive system are of clinical and commercial interest. The aim of this study was to evaluate the possible alterations in the caput epididymis and sperm quality in animals submitted to acute (15 days) and chronic (56 days) treatment and animals with 30 days post- treatment. Acute administration of finasteride in rats (15 days) was observed reduction in sperm membrane integrity. Chronic administration of finasteride in rats (56 days), leads to changes in the epididymis, such as weight reduction, morphometric-stereological changes, decreased transit time of sperm, motility of the sperm membrane integrity and consequently in fertility parameters of these animals. Even with the interruption of treatment with finasteride (30 days) sperm quality remains committed. Thus, further studies should be performed to complement the existing knowledge on the physiology of the epididymis after DHT depletion, on the time that is needed for the recovery of fertility parameters after interruption of finasteride treatment, and if it these parameters can be fully recovered.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Fecundação: Características Gerais.

O processo de fecundação nos mamíferos é o resultado de uma sequência altamente programada de eventos moleculares que culmina com a união de duas células haplóides distintos, o espermatozoide e o ovócito II, para formar um zigoto diplóide (Tulsiani e Abou-Haila 2011). Para uma efetiva fecundação, as células germinativas masculinas passam pela maturação no epidídimo e, posteriormente, pela capacitação no trato reprodutor feminino (Nishimune e Okabe, 1993; Robaire, 2000).

Dentre os ductos pelos quais os espermatozoides passam até atingir o gameta feminino, o epidídimo é o responsável por propiciar um microambiente especializado no qual os espermatozoides desenvolvem elevado grau de diferenciação fenotípica e funcional (Blanchard e Robaire, 1997).

No processo de fecundação e maturação, uma variedade de andrógenos e glicoproteínas são essenciais para o funcionamento normal das células testiculares, epididimárias e do trato reprodutor feminino. (Mclachlan et al., 2002, Holdcraft e Braun, 2004).

As células testiculares são alvo de um ou mais andrógenos, cuja ação é essencial para a fertilidade masculina (Holdcraft e Braun, 2004), dentre essas células, destaca-se, as células intersticiais ou células de Leydig, que primariamente possuem a função de produção de testosterona (Mendis-Handagama, 1997), as células mióides que circundam o túbulo seminífero proporcionando suporte biomecânico e contratilidade (Maekawa et al., 1996) e as células de Sertoli que estão diretamente relacionadas com a proliferação e

diferenciação das células germinativas testiculares (Blanchard e Robaire, 1997; Griswold, 1998).

1.2- Epidídimo: Características Anatômicas, Histológicas e Secreção Proteica para Maturação do Espermatozoide.

O epidídimo é um órgão altamente compartimentado em sua morfologia e função e a compartimentação dos diferentes segmentos do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) indica que o epitélio ao longo do ducto possui diferentes funções e/ou estão sob o controle de diferentes fatores regulatórios. Segundo Blanchard e Robaire (1997), dentre esses fatores destaca-se os andrógenos como a testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) que atuam em diferentes segmentos, unidades funcionais e em diferentes tipos de células epiteliais do ducto epididimário.

Atualmente, muitos estudos investigam a expressão gênica regional do epidídimo para determinar as características e a especificidade da secreção epididimária (Jervis e Robaire, 2001; Jonhston et al., 2005; Jonhston et al., 2007; Dubé et al., 2008; Kolasa et al., 2008). No epidídimo de rato foram identificadas, por microdissecção, 19 regiões morfológicamente distintas (Jelinsky et al., 2007) e 11 regiões distintas em camundongos (Jonhstson et al., 2005) que possuem especificidade quanto aos fatores regulatórios e secreção protéica. Concomitantemente, um estudo comparativo da expressão gênica do epidídimo em ambas as espécies, por *microarray*, identificou que 492 genes, relacionados à secreção, são compartilhados entre ratos e camundongos em segmento semelhantes (Jelinsky et al., 2007; Turner et al., 2007).

Histologicamente em ratos, sabe-se que a diferenciação do epitélio pseudo-estratificado do epidídimo inicia-se durante a segunda semana de desenvolvimento pós-

natal, sendo em número de cinco os tipos celulares distintos que compõem este epitélio: células principais, basais, apicais, claras e, por fim, células halo (Robaire et al., 2000).

Resumidamente, as células principais são as mais abundantes ao longo de todo o ducto epididimário e apresentam longos estereocílios relacionados com a secreção e absorção de proteínas (Cummins et al., 1986; Fouhecourt et al., 2003, Cornwall et al., 2009). As pequenas células basais, mais numerosas no segmento inicial e no corpo, parecem atuar como possíveis precursoras das demais células epiteliais, bem como na produção de antioxidantes (Calvo et al., 1997; Robaire et al., 2006).

As células apicais são homólogas às principais e parecem estar envolvidas no transporte e digestão de proteínas e carboidratos do lúmen (Syntin et al., 1999; Hermo et al., 2005). As células halo correspondem a linfócitos intra-epiteliais e as células claras, igualmente distribuídas ao longo de todo o epitélio epididimário, apresentam funções ainda controversas, envolvendo o processo de endocitose ou a acidificação do fluido epididimário (Yeung et al., 1994; Flesch e Gadella, 2000; França et al., 2005; Robaire et al., 2006).

A variedade celular desse epitélio pseudo-estratificado contribui para que durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo, a composição proteica de sua membrana plasmática seja alterada ou extraída (Flesch e Gadella, 2000; Arrotéia et al., 2004; Dacheux et al., 2005). Estas alterações bioquímicas, conjuntamente identificadas como maturação epididimária, permite ao gameta potencializar sua motilidade, estabilizar a cromatina e adquirir sítios para reconhecimento e ligação de moléculas da zona pelúcida, bem como para a fusão com a membrana plasmática do ovócito II (Flesch e Gadella, 2000; Dacheux, 2002, Robaire et al., 2006, Coernwall et al., 2009).

A atividade secretora de natureza proteica no epidídimo decresce ao longo do ducto, de modo que pouquíssimas proteínas (cerca de 1% do total de proteínas) são

secretadas especificamente na região da cauda (Dacheux et al., 2005). Segundo Robaire et al., 2006, este fenômeno se deve ao fato de que as proteínas secretadas nos segmentos mais proximais do epidídimo são acumuladas no fluido luminal ao longo da extensão do ducto, promovendo a maturação gradativa dos espermatozoides; desta maneira, a cauda do epidídimo apresenta como função principal a estocagem e proteção dos espermatozoides (Gatti et al., 2004).

Desta forma, cerca de 75% das proteínas identificadas e que participam da maturação epididimária são secretadas nas regiões iniciais deste ducto (segmento inicial e cabeça do epidídimo), sendo que 48% dessas proteínas são dependentes de andrógenos (Syntin et al., 1999, Robaire et al., 2000; Toshimori, 2003; Dacheux et al., 2005). Muitas destas correspondem às enzimas capazes de alterar glicoproteínas de superfície do espermatozoide e, após liberadas na luz do epidídimo, parecem ligar-se à superfície do espermatozoide ou mesmo no interior da vesícula acrossômica (Cornwall et al 2009; Cohen et al., 2011).

1.3- Andrógenos: Testosterona e Dihidrotestosterona (DHT).

Os andrógenos são hormônios esteroides envolvidos principalmente no desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogênese, no estabelecimento da maturação sexual na puberdade, e na manutenção da função reprodutiva masculina principalmente com relação à espermatogênese e ao comportamento sexual durante a vida adulta (Hamil et. al., 2000, Bilinska et al., 2007).

A testosterona produzida pelas células de Leydig no testículo, e seus metabólitos, como a DHT e o estradiol, são exemplos de hormônios esteroides sexuais que participam

ativamente nos processos relacionados ao desenvolvimento das células germinativas masculinas (Mclachlan et al., 2002; Holdcraft e Braun, 2004; Tribek et al., 2005).

A DHT é o produto da ação enzimática da 5 α redutase sobre a testosterona, sendo um importante andrógeno participante no desenvolvimento da diferenciação da genitália externa masculina, entre outras funções (Imperato-Mcginley et al., 1974, Amory et al., 2007; Hsieh et al., 2011). No entanto, níveis elevados de DHT na vida adulta podem predispor a vários distúrbios, tais como: a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata, acne e a alopecia androgênica (Geller et al., 1976; Liu et al., 2008, Chiba et al., 2011).

1.4- Distúrbios Associados a Elevados Níveis de DHT: Alopecia Androgênica.

A alopecia androgênica é o mais frequente tipo de perda e diminuição da quantidade de folículos pilosos na região da cabeça e, por isso é uma das condições dermatológicas mais comuns que afeta ambos os gêneros (Finn et al., 2006; Camacho et al., 2008; Schweiger et al., 2010). Nos homens, atinge cerca de 30% da população acima dos 30 anos e cerca de 50% acima dos 50 anos de idade (Bienová et al., 2005; Tosti e Duque-Estrada, 2009; Mella et al., 2010). Em mulheres, a alopecia androgênica é mais suave e diagnosticada como uma consequência da mudança hormonal decorrente a progressão da idade (Bienová et al., 2005; Camacho, 2009).

Nas células do folículo piloso, assim como nos demais órgãos dependentes da DHT (Steers, 2001; Robaire e Henderson, 2005; Bilinska et al., 2007; Camacho, 2009; Schweiger et al., 2010), a testosterona é convertida, através da ação da enzima 5 α redutase, em um metabólito mais potente, a DHT (Finn et al., 2006; Chiba et al., 2011). A DHT liga-se a seus receptores androgênicos presentes nas células do folículo piloso e

esta união desencadeia um processo de sinalização celular que acelera a morte celular do folículo (Bienová et al., 2005; Yoo et al., 2006). Gradualmente, as repetições dos ciclos em sua fase terminal tornam os fios do cabelo mais escassos e curtos e a quantidade de folículos pilosos diminui acentuadamente (Bienová et al., 2005).

No processo de conversão da testosterona em DHT, há duas isoformas da enzima 5 α redutase; a do tipo I e a do tipo II (Sterrs, 2001). O sequenciamento gênico das isoformas mostrou uma similaridade de 47% entre elas dentro de uma mesma espécie e, em espécies distintas, a 5 α redutase do tipo I mostra similaridade de 60% e 77% a 5 α redutase do tipo II (Jin e Penning, 2001; Thomas et al., 2005).

Em humanos, a 5 α redutase tipo I é encontrada primariamente na maioria das glândulas sebáceas da pele, incluindo o escalpo, no fígado, nos músculos e no cérebro (Ellis et al., 2005), níveis menores são encontrados nas células epiteliais do epidídimo e na próstata (Steers, 2001; Titus et al., 2005; Jemal et al., 2005; Jemal et al., 2010). A 5 α redutase tipo I é responsável por aproximadamente um terço da produção da DHT sérica circulante (Gisleskog et al., 1998; Schweiger et al., 2010). A 5 α redutase tipo II, em humanos, é encontrada na próstata, na vesícula seminal, nas células do estroma do epidídimo (Steers, 2001), no folículo piloso do cabelo, assim como, no fígado (Ellis et al., 2005) e é responsável pela produção dos dois terços remanescentes de DHT sérica (Gisleskog et al., 1998).

Em ratos e camundongos, análises por imunolocalização estabeleceram a presença marcante do receptor de 5 α redutase Tipo II na superfície das células epiteliais principais da região da cabeça do epidídimo (Yamashita, 2004; Seenundun e Robaire, 2005; Tribek et al., 2005).

1.5- Finasterida no Controle dos Níveis Elevados de DHT.

Uma droga experimental chamada MK906, também denominada como finasterida (Proscar) foi desenvolvida em 1992, para bloquear a ação da enzima 5 α redutase. Esta droga foi administrada a pacientes portadores de distúrbios associados ao excessivo nível sérico de DHT, como um tratamento alternativo à remoção dos testículos (Stinson, 1992). Assim, a finasterida foi o primeiro e o principal inibidor de 5 α redutase que recebeu aprovação clínica para o tratamento de hiperplasia benigna da próstata, alopecia androgênica e outros distúrbios associados a elevação dos níveis de DHT (Bilinska et al., 2007; Ferlay et al., 2010).

Esta aplicação clínica baseia-se no fato da finasterida inibir a enzima 5 α redutase em suas duas isoformas; no entanto, com uma maior especificidade para a 5 α redutase do Tipo II (Robaire e Henderson, 2005; Thomas et al., 2008). Em humanos, em doses terapêuticas para o tratamento da hiperplasia benigna da próstata, a finasterida reduz os níveis séricos de DHT em 70 – 90% resultando em um decréscimo no tamanho do órgão (Greenlee et al., 2001; Lebdaï et al., 2009; Crawford et al., 2009; Madersbacher et al., 2010), enquanto isso, os níveis de testosterona permanecem constantes ou sofrem um pequeno acréscimo (Gormley, 1995; Rosen et al., 2008; Corradi et al., 2009).

Para o tratamento da alopecia androgênica, os níveis de DHT séricos devem sofrer uma redução de 60% -70% (Camacho et al., 2008; Camacho, 2009; Chiba et al., 2011). Em ratos e camundongos, a administração de finasterida em doses 5mg/kg/dia durante 56 dias provoca uma diminuição de 60 - 70% dos níveis séricos de DHT e os níveis de testosterona acompanham a variação observada em humanos (Romieu et al., 2003; Cayette et al., 2006; George, 2007; Tindall e Rittmaster, 2008). Em homens e macacos há uma maior afinidade da finasterida pela isoforma do tipo II da 5 α redutase, porém,

quando administrada em ratos, camundongos e cães a atividade biológica da finasterida compete à inibição de ambas as isoformas (Sterrs, 2001).

Contudo, a finasterida não tem nenhuma afinidade pelos receptores dos andrógenos e não desempenha nenhuma atividade androgênica, anti-androgênica, esterogênica, anti-esterogênica ou atividade semelhante à progesterona (Sudduth e Koronkwski, 1993). Por causa deste perfil de expressão específica da enzima 5 α redutase nos tecidos e a especificidade de inibição da finasterida, poucas reações adversas são descritas em outros órgãos (Cayette et al., 2006; Tindall et l., 2008; Corradi et al., 2009).

1.6- Finasterida e Reações Adversas.

Sabe-se que a supressão de andrógenos (testosterona ou DHT) em cultura de células epiteliais do epidídimo em ratos provoca um fenótipo de superfície celular lisa desprovida de estereocílios e protusão granular (decorrentes da despolimerização dos microtúbulos e alteração do citoesqueleto). Além disso, nas células de Leydig há uma desorganização dos microfilamentos culminando em um aumento acentuado e desregulação na secreção de testosterona (Bilinska, 1992; Mendis-Handagama, 1997). Sugere-se que esta similaridade entre as células epiteliais do epidídimo e das células de Leydig, ocorra pelo aumento na liberação de estradiol, em consequência de uma desintegração de microtúbulos (Marchlewicz et al., 2004; O' Hara et al., 2011).

Dentre as reações adversas da finasterida, a redução da função erétil em homens é a mais discutida. Estima-se que o bloqueio mais específico da 5 α redutase tipo II pela finasterida acarreta a redução da capacidade erétil em cerca de 5% a 20% dos homens tratados com esta droga (Steers, 2001; Smith e Carson, 2009). Há relatos de casos de

infertilidade masculina decorrente de danos na integridade do DNA de espermatozoides de homens submetidos ao tratamento com finasterida em pequenas doses (Tu e Zini, 2011), adicionalmente, em outros estudos reportaram que a interrupção do tratamento da finasterida promove a recuperação imediata do volume do semen, mas a concentração de espermatozoides não se recupera totalmente dentro de um período de 4 meses (Chiba et al., 2011). Uma melhora semelhante foi observada em dois outros casos de azoospermia e oligospermia grave em um período de 6 meses após a interrupção do tratamento com finasterida (Liu et al., 2008).

1.7- Alopecia Androgênica e Fertilidade.

Atualmente estima-se, dentro da população adulta, a existência de 4-17% de casais inférteis e que dentro desta porcentagem uma parcela significativa (20%) seja referente unicamente a fatores masculinos (Bhasin, 2007) e as alterações epididimárias podem estar presentes como etiologia de infertilidade masculina (Boué e Sullivan, 1996; Bilinska et al., 2006; Hann et al., 2011).

A utilização de medicamentos que tentam prevenir a queda do folículo piloso torna-se cada vez mais crescente, conseqüentemente, um público cada vez mais jovem utiliza essas drogas como um método preventivo e paliativo contra a alopecia androgênica e doenças associadas aos altos níveis de andrógenos. Sendo assim, o estudo dos efeitos de medicamentos inibidores de andrógenos, como por exemplo, a finasterida, nos diferentes sistemas, principalmente no sistema reprodutor masculino é de grande interesse clínico (Bienová et al., 2005; Rosen et al., 2008; Corradi et al., 2009, Chiba et al., 2011, Tu e Zini, 2011).

2- OBJETIVO GERAL

Frente à realidade de que *in vivo* em ratos, a administração de finasterida reduz significativamente o peso do epidídimo (Shao et al., 1993; Cayette et al., 2006; Bilinska et al., 2007; Tindall e Rittmaster, 2008), *in vitro* provoca alterações fenotípicas significativas (Bilinska, 1992; Mendis-Handagama, 1997); que o papel secretor do epidídimo é altamente dependente de andrógeno (DHT); e o uso crescente da finasterida por adultos jovens no tratamento da alopecia (Camacho et al., 2008; Smith e Carson, 2009); o objetivo geral deste estudo foi verificar, em ratos *Sprague Dawley*, as possíveis alterações provocadas pela finasterida no segmento da cabeça do epidídimo, na qualidade do espermatozoide e nos parâmetros de fertilidade utilizando-se uma dose que proporcione reduções de DHT comparáveis as observadas no tratamento de alopecia androgênica em homens e a possível reversibilidade destas alterações pela suspensão deste tratamento.

2.1- Objetivos específicos

- Determinar e as concentrações séricas de testosterona e de DHT nos animais submetidos ao tratamento com finasterida e a possível reversibilidade destas alterações pela interrupção do tratamento.
- Descrever as possíveis alterações histológicas (análise qualitativa) e ultraestruturais no segmento da cabeça do epidídimo e avaliar por métodos morfométricos e estereológicos (análise quantitativa) essas alterações causadas pelo tratamento com finasterida e a possível reversibilidade destas alterações pela interrupção do tratamento.

- Determinar as possíveis alterações no tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo e parâmetros de fertilidade causados pelo tratamento com finasterida e a possível reversibilidade destas alterações pela interrupção do tratamento.
- Descrever as possíveis alterações nos testes de necropsia, morfologia e motilidade do espermatozoide causados pelo tratamento com finasterida e a possível reversibilidade destas alterações pela interrupção do tratamento.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Ratos adultos *Sprague-Dawley* (300-350 g) com 60 dias pós-parto foram alocados á $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclos de luz/escuridão de 12 h e livre acesso a ração e água. Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos

- *Grupo Controle Agudo (C15)*: Ratos controles com 60 dias pós-parto tratados, por gavage, com a solução diluente da finasterida (0,5% de solução aquosa de metil-celulose) por 15 dias (n=25). Esses animais foram sacrificados com 75 dias pós-parto (60 dias pós-parto + 15 dias de tratamento com solução diluente= 75 dpp).

- *Grupo Controle Crônico (C56)*: Ratos controles com 60 dias pós-parto tratados, por gavage, com a solução diluente da finasterida (0,5% de solução aquosa de metil-celulose) por 56 dias (n=25). Esses animais foram sacrificados com 116 dias pós-parto (60 dias pós-parto + 56 dias de tratamento com solução diluente = 116 dpp).

- *Grupo Tratamento Agudo (F15)*: Ratos com 60 dias pós-parto tratados com finasterida, por gavage, durante 15 dias consecutivos (n=20). Esses animais foram sacrificados com 75 dias pós-parto (60 dias pós-parto + 15 dias de tratamento com finasterida = 75 dpp).

- *Grupo Tratamento Crônico (F56)*: Ratos com 60 dias pós-parto tratados com finasterida, por gavage, durante 56 dias consecutivos (n=20). Esses animais foram sacrificados com 116 dias pós-parto (60 dias pós-parto + 56 dias de tratamento com finasterida = 116 dpp).

- *Grupo Suspensão do Tratamento Agudo por 30 dias (F15 + 30I)*: Ratos com 60 dias pós-parto tratados com finasterida, por gavage, durante 15 dias consecutivos e em seguida, o tratamento foi suspenso por 30 dias (n=20). Esses animais foram sacrificados com 105

dias pós-parto (60 dias pós-parto + 15 dias de tratamento com finasterida + 30 dias de suspensão do tratamento = 105 dpp).

- *Grupo Suspensão do Tratamento Crônico por 30 dias (F56 + 30I)*: Ratos com 60 dias pós-parto tratados com finasterida, por gavagem, durante 56 dias consecutivos e em seguida, o tratamento foi suspenso por 30 dias (n=25). Esses animais foram sacrificados com 146 dias pós-parto (60 dias pós-parto + 56 dias de tratamento com finasterida + 30 dias de suspensão do tratamento = 146 dpp).

Ratas adultas *Sprague - Dawley* com 60 dias pós-parto foram alocados á $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclos de luz/escuridão de 12 h e livre acesso a ração e água. Essas fêmeas foram aleatoriamente escolhidas e distribuídas nos diferentes grupos para o acasalamento natural e inseminação artificial intra útero.

Este protocolo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – UNICAMP), protocolo 1622-1 (em anexo). Foram seguidas as normas do NIH (National Institutes of Health) para o cuidado e o uso de animais de laboratório.

3.2- *Finasterida.*

A finasterida foi fornecida em sua forma pura pela empresa Merck Sharp Dohme USA para os experimentos de dosagem hormonal e análise morfométrica-estereológica. Para as demais metodologias utilizou-se finasterida comercial pronta para manipulação. A dose utilizada foi de 5mg/kg/dia (Shao et al., 1993) e a escolha da dose do medicamento em ratos baseia-se na redução do nível sérico de DHT (cerca de 60%) compatível com o observado em humanos para o tratamento de alopecia androgênica.

3.3- Tratamento.

Para os animais dos grupos controle foi administrada a solução aquosa de 0,5% de metil-celulose (solução diluente) durante 15 dias (C15) e 56 dias (C56). Para os animais submetidos ao tratamento com finasterida durante 15 (F15) e 56 dias (F56) a finasterida foi diluída em solução aquosa de 0,5% de metil-celulose. Foi administrado 5 mg de finasterida por kg de peso corpóreo uma vez por dia, sendo que a avaliação semanal do peso foi realizada para o ajuste do volume da dose (3ml/kg) e a via de administração foi por gavagem. Transcorrido o período de tratamento, amostras de sangue foram coletadas para a dosagem sérica de hormônios (testosterona e DHT) e os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos a serem avaliados.

Após o tratamento com a solução diluente ou finasterida, houve grupos que o tratamento foi interrompido por 30 dias (F15 +30I e F56 +30I) e, posteriormente, os animais foram sacrificados para coleta de amostras de sangue para a dosagem sérica de hormônios e retirada dos órgãos (testosterona e DHT).

3.4- Dosagem Sérica Hormonal.

Cinco animais de cada grupo foram anestesiados com solução aquosa de ketamina (80 mg/kg, intraperitoneal) e xylazina (10 mg/kg, intraperitoneal) e, posteriormente foi realizada punção cardíaca pelo ventrículo esquerdo para coleta das amostras de sangue.

Para a punção cardíaca foi utilizado seringas de 1ml contendo heparina sódica para evitar a coagulação sanguínea. O sangue coletado foi centrifugado (1600g) por 20

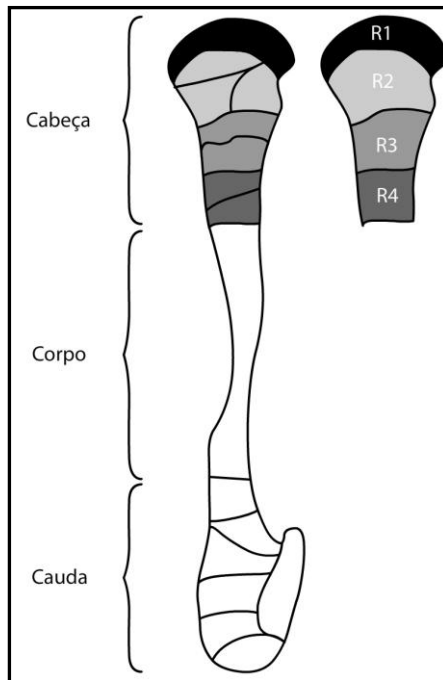
min a 4 °C e o plasma obtido novamente centrifugado em micro centrifuga (3000g) em temperatura ambiente e armazenado a -80°C.

Para a testosterona foi utilizado o kit DSL ACTIVE *testosterone* e para a DHT utilizadou-se o kit RIA ACTIVE DHT (Sem extração) S/E DSL 96100. Todas as análises foram analisadas em duplicata pelo método de radioimunoensaio (Genese Produto Diagnóstico, Brasil) e o coeficiente de variação intra-ensaio foi $\leq 8.5\%$ para a testosterona e ≤ 4.3 para DHT. O coeficiente inter-ensaio foi $\leq 8.7\%$ para a testosterona e $\leq 6.4\%$ para DHT.

3.5- Processamento para Análise Morfométrica-estereológica e Análise Ultraestrutural.

Cinco animais de cada grupo foram anestesiados com solução aquosa de ketamina (80 mg/kg, intraperitoneal) e xylazina (10 mg/kg, intraperitoneal) e em seguida perfundidos, via ventrículo esquerdo, com solução fixadora contendo 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em 0,2 M de tampão fosfato (PBS), pH 7.4. Os epidídimos, testículos, próstata e vesícula seminal foram imediatamente removidos e pesados.

O segmento da cabeça do epidídimo foi dissecado com auxílio de um estereomicroscópio (Leica Microsystems CMS GmbH, Germany), pesado e imerso na solução fixadora por um período de 24 horas. Após esse período de pós-fixação este segmento foi subdividido em 4 regiões (R1: segmento inicial; R2: cabeça proximal; R3: cabeça medial e R4: cabeça distal) baseado em descrições anatômicas e histológicas, (Turner et al., 2004) conforme esquema abaixo.



As amostras foram desidratadas em banhos crescentes de álcool e incluídas em historesina (Historesin Embedding Kit, Leica, Germany) e, em seguida, seccionadas a 2 μm espessura. Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina-fluoxina para análise em microscopia de luz.

Para análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e imersas em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato 0,1M pH 7,4 durante 1 hora a 4^o C. Após esse período as amostras foram processadas seguindo os protocolos para inclusão em Epon e ultra microtomia para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão (Moraes et al., 2004).

3.6- Análises Morfométricas-estereológicas.

Foram realizadas as seguintes análises:

3.6.1- Determinação dos pesos corpóreos, testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal (em gramas) com o auxílio de uma balança analítica (SA 210 com precisão de 0.1

mg). O peso do testículo, próstata e vesícula seminal foi utilizado como um indicativo da ação da finasterida, uma vez que os efeitos da finasterida nestes órgãos são previamente reportados.

3.6.1.1- Cálculo da razão do peso do testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal pelo peso corpóreo do animal (em gramas).

3.6.2- Determinação dos pesos do segmento da cabeça, corpo e cauda do epidídimo (em gramas) com o auxílio de uma balança analítica (SA 210 com precisão de 0.1 mg).

3.6.2.1- Cálculo da razão do peso do segmento da cabeça, corpo e cauda do epidídimo pelo peso corpóreo do animal (em gramas).

As análises a seguir foram realizadas no material incluído em historesina (Historesin Embedding Kit, Leica, Germany) e através da captura de imagem utilizando o microscópio Nikon eclipse E800 acoplado a câmera Cool SNAP-Pro-color - Média Cybernetics. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus versão 4.1.0.0 para Windows 95/NT/98 - Média Cybernetics.

3.6.3- Determinação da altura do epitélio epididimário do segmento da cabeça em $\log \mu\text{m}$, através da medida de 30 secções transversais, escolhidas aleatoriamente em objetiva de 10x em cada uma das regiões R1, R2, R3 e R4.

3.6.4- Determinação da área do ducto epididimário e da área luminal do segmento da cabeça em $\log \mu\text{m}^2$, através da medida de 30 secções tubulares transversais escolhidas aleatoriamente na objetiva de 10x em cada uma das regiões R1, R2, R3 e R4.

3.6.5- Cálculo da área epitelial do ducto epididimário em $\log \mu\text{m}^2$, através da diferença entre a área do ducto epididimário e luminal do túbulo epididimário (ducto epididimário – lúmen = área de epitelial do ducto epididimário) das 30 secções anteriormente determinadas em objetiva de 10x em cada uma das regiões R1, R2, R3 e R4.

3.6.6- Determinação do volume testicular e do segmento da cabeça do epidídimo a fresco - $V = P/G (\mu\text{m}^3)$, sendo P o peso do órgão e G a gravidade (Howard e Reed. 1998), Lembrando que $1 \text{ g} = 10^3 \text{ mm}^3$.

3.6.7- Cálculo do volume relativo (%) dos tecidos componentes do segmento da cabeça do epidídimo: utilizando o método de Cavalieri (Rámirez et al., 1999) em cada uma das regiões R1, R2, R3 e R4, no qual os volumes são determinados pela relação: $V = E_p \times A_t \times \sum p$, sendo E_p a espessura do corte ($2\mu\text{m}$, corte em historesina); A_t a área do sistema teste e $\sum p$ a somatória dos pontos que caem nos tecidos componentes do epidídimo. Sendo que, a área do sistema teste (A_t) é calculada pela distância entre dois pontos qualquer elevado ao quadrado e multiplicado pelo número total de pontos do sistema.

O sistema de pontos foi gerado pelo software Image-Pro Plus versão 4.1.0.0 para Windows 95/NT/98 - Média Cybernetics, desta forma, cria-se um retículo contendo 100 pontos em cima da imagem e verifica-se a incidência destes pontos em tecidos diferentes do órgão.

3.7- Produção Diária de Espermatozoides no Testículo, Tempo de Trânsito de Espermatozoides no Epidídimo, Motilidade Espermática e Necropsia Espermática.

Cinco animais de cada grupo foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg, intraperitonal) e xylazina (10 mg/kg, intraperitonal) para remoção e pesagem do testículo direito e ambos os epidídimos e ductos deferentes para a realização das metodologias descritas abaixo.

3.7.1- Produção Diária de Espermatozoides no Testículo e Tempo de Trânsito de Espermatozoides no Epidídimo.

Tanto testículo (a túnica albugínea testicular foi removida) quanto o epidídimo direito (cabeça-corpo e cauda, separadamente) foram homogenados e sonicados individualmente em tubos contendo solução de STM (0,9% de NaCl; 0,05% de Triton X100, 0,01% Thimerosal) em um volume de 1 ml para cada 200 mg de tecido.

O material homogenado foi transferido para câmara de Neubauer para contagem (4 campos por animal) de espermátides no estágio 19 da espermiogênese e espermatozoides da cabeça-corpo e cauda do epidídimo (Roob et al., 1978).

Para estimar a produção diária de espermatozóide (PDE) no testículo, o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6.1 (período que corresponde ao número de dias em que as espermátides estão presentes no epitélio seminífero).

O tempo de trânsito dos espermatozoides na cabeça-corpo e cauda do epidídimo em dias foi estimado dividindo a média do número total de espermatozoides homogeneizados resistentes, dentro de cada uma dessas regiões, dividido pelo PDE (Fernandez et al., 2008).

3.7.2- Motilidade Espermática.

Para a motilidade espermática, uma alíquota de 50 µl de esperma foi obtida do ducto deferente esquerdo e diluída em PBS na proporção de 1:20 à 34 °C e transferida para uma câmara de motilidade (Câmara de Mackler).

A amostragem foi analisada em microscópio de luz convencional (Nikon eclipse E800 acoplado a câmera Cool SNAP-Pro-color - Média Cybernetics) em objetiva de 20x. Um campo aleatório foi escolhido, e os espermatozoides foram classificados em móveis e não móveis. A motilidade espermática foi expressa como a porcentagem de espermatozoides móveis por campo, ou seja, definido como o número médio de espermatozoides móveis x 100 / número total de espermatozoides (Kempinas et al., 2006; Mirkhani et al., 2007).

3.7.3- Necropsia Espermática.

Para a avaliação da integridade da membrana do espermatozoide foram realizados os seguintes testes de necropsia:

3.7.3.1- Coloração Eosina-Y

Na coloração eosina-Y (0,5% pt/vol; Merk, Chemical Co., Alemanha) foi utilizado uma alíquota de 10 µL de esperma diluído 1:20 em PBS 0,1 M; pH 7,2 obtido do ducto deferente e foi realizado um esfreguão em lâmina histológica. A seguir foi adicionado 10 µL do corante eosina Y e a amostragem foi analisada em microscópio de luz convencional (Nikon eclipse E800 acoplado a câmera Cool SNAP-Pro-color - Média Cybernetics) em

objetiva de 40x. Um total de 200 espermatozoides foi contado para avaliação da vitalidade dos espermatozoides (Talebi et al, 2007; Kermani-Alghoraishi et al., 2010).

3.7.3.2- Teste de Hipoosmolaridade (HOS)

Para o teste HOS foi utilizado uma alíquota de 10 µL de esperma diluído 1:20 em PBS 0,1 M; pH 7,2 obtido do ducto deferente e aplicada em lâmina histológica. Em seguida foi adicionado 100 µl de solução hiposmolar quente (7.35 g de citrato de sódio hidratado e 1.351g frutose em 100 ml de água destilada). A amostragem foi incubada 37 °C durante 45 minutos e analisada em microscópio de luz convencional (Nikon eclipse E800 acoplado a câmera Cool SNAP-Pro-color - Média Cybernetics) em objetiva de 40x. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado com base na semi-permeabilidade da membrana plasmática, sendo calculada a porcentagem de espermatozoides vivos (Talebi et al., 2007; Kermani-Alghoraishi et al., 2010).

3.8 – Acasalamento Natural

Cinco animais de cada grupo foram utilizados para o acasalamento natural. Duas fêmeas, separadamente, foram acasaladas com cada um dos machos, totalizando 10 fêmeas por grupo.

O período fértil das fêmeas foi determinado através de esfregaço vaginal e avaliação e caracterização de cada fase do ciclo estral foi baseada na proporção entre os três tipos de células observadas no esfregaço vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos em microscopia de luz convencional (Plapinger, 1982).

A confirmação da gestação foi realizada pela identificação do tampão vaginal, sendo este dia considerado o 1º dia de gestação. No 20º dia de gestação, as fêmeas foram anestesiadas com solução aquosa de ketamina (80 mg/kg, i.p.), e xylazina (10 mg/kg, i.p.) e o útero e ovários foram expostos através de uma laparotomia. O número de implantações, os locais de reabsorção, o número de fetos vivos e corpos lúteos foram contados para avaliação dos parâmetros de fertilidade (Motrich et al., 2007).

3.9- Inseminação Artificial Intra Útero.

A inseminação artificial intra útero foi realizada somente nos grupos submetidos ao tratamento crônico.

Fêmeas Sprague Dawley em estro induzido foram acondicionadas, durante 1 hora, com machos previamente vasectomizados e aquelas que apresentaram receptivas ao acasalamento (exibição de lordose) foram selecionadas para inseminação artificial intra útero.

Foram utilizados 5 machos de cada grupo e os espermatozoides para esta técnica foram obtidos por dispersão da porção caudal do epidídimo em 2 mL de meio de cultura HTF (Fluído tubário humano, Irvine Scientific, USA) como previamente descrito (Scarano et al., 2006). Após 5 minutos de dispersão, uma alíquota desse meio de cultura rico em espermatozoide foi diluída em 1;10 de solução fixadora (10% de formalina em PBS 0,1 M; pH 7,2) para contagem em câmara de Neubauer para estimar o volume contendo 5×10^6 espermatozoides a serem injetados em cada corno uterino.

Um total de 33 fêmeas foram inseminadas, correspondendo a 11 fêmeas para cada grupo. Todas as fêmeas no momento da inseminação foram anestesiadas com

solução aquosa de ketamina (80 mg/kg, i.p.), e xylazina (10 mg/kg, i.p.) e a bifurcação dos córnos uterinos foi exposta por uma incisão médio ventral.

Pequenos fórceps foram utilizados para elevar os cornos uterinos enquanto o volume de ejaculado (volume contendo 5×10^6 espermatozoides) foi injetado pela parede do corno uterino na luz uterina através de um cateter e uma seringa de 1.0 mL.

Cada ponto de inseminação foi imediatamente cauterizado e quando o procedimento foi finalizado a parede muscular da cavidade abdominal foi suturada. As fêmeas foram sacrificadas 20 dias após o procedimento para coleta do útero e ovários e avaliação dos parâmetros de fertilidade.

3.10- Parâmetros de Fertilidade

O número de corpos lúteos foi determinado por visualização direta com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus – SZX-ILL B2-100, Germany), sendo esperada a sua correspondência ao número de fetos e o número de implantações, os locais de reabsorção, o número de fetos vivos foram observados.

Foram determinados os seguintes parâmetros de fertilidade: Taxa gestacional: número de fêmeas prenhes/número de fêmeas expostas aos ratos x 100; Fecundidade: número de ratos que produziram pelo menos um feto vivo/número de ratos expostos ao acasamento x 100; Índice de fertilidade: número de sítios de implantação/número de corpos lúteos x 100; Perdas pré-implantacionais: número de corpos lúteos - número de implantações/número de corpos lúteos x 100; Perdas pós-implantacionais: número de implantações – número de fetos vivos/número de implantações x 100 (Piffer e Pereira, 2004; Kempinas et al., 2007; Motrich et al., 2007)

Para a inseminação artificial intra-útero foram avaliados os seguintes parâmetros de fertilidade: Taxa gestacional: número de fêmeas prenhes/número de fêmeas inseminadas x 100; potencial de fertilidade (eficiência de implantação): número de implantações/número de corpos lúteos x 100 (Fernades et al., 2007; Fernandez et al., 2008).

3.11- Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos em Média \pm SD. A distribuição normal dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. One-way ANOVA seguido de Tukey ou de Bonferroni post-hoc foi utilizado para os dados paramétricos, Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn post-hoc foi utilizado para dados não paramétricos e o teste do qui-quadrado foi utilizado para variáveis categóricas dependentes. O nível de significância foi de 5% ($p < 0.05$). Todas as análises de dados foram realizadas utilizando GraphPad Prism software v.5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

4- RESULTADOS

Para algumas análises, o Grupo C56 (116 dias pós-parto) foi utilizado como um controle adicional para o Grupo F15 + 30I, devido a semelhança de idade no dia do sacrifício. .

4.1- Peso Corpóreo dos Animais

4.1.1- Tratamento Agudo

O Grupo F15 (tratados com finasterida durante 15 dias) não apresentou diferença significativa no peso corpóreo em comparação ao C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente). Houve um aumento significativo no peso corpóreo do Grupo F15 + 30I (tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação aos grupos C15 e F15. Contudo, não houve diferença significativa no peso corpóreo entre os Grupos F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 1 A. Dessa forma, houve um ganho progressivo de peso desses animais no decorrer dos tratamentos e com o avanço da idade.

4.1.2- Tratamento Crônico

Não houve diferença significativa no peso corpóreo dos animais submetidos ao tratamento crônico, Figura 1B. Dessa forma, houve um ganho progressivo de peso desses animais no decorrer dos tratamentos e com o avanço da idade.

4.2- Dosagem Sérica de Testosterona (T) e Dihidrotestosterona (DHT)

4.2.1- Tratamento Agudo

O nível sérico de T de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) apresentou uma redução significativa (redução de 66%) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com a solução diluente). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o C15 e F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) e não houve diferença significativa entre F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 2 A.

Os níveis séricos de DHT de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) e F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) foram significativamente reduzidos (redução de 80%) em comparação ao C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre os F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 2 B.

4.2.2- Tratamento Crônico

O nível sérico de T de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) apresentou significativo aumento em comparação ao C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre os F56 e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) e não houve diferença significativa entre os C56 e F56 + 30I, Figura 2C.

O nível sérico de DHT de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) foi significativamente reduzido em comparação C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Houve uma redução de cerca de 60% dos níveis séricos de DHT

em F56 em comparação a C56, além disso, não houve diferença significativa entre C56 e F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Figura 2 D.

4.3- Razão do Peso dos Órgãos pelo Peso Corpóreo

4.3.1- Testículo

4.3.1.1- Tratamento Agudo

Não houve diferença significativa na razão do peso do testículo pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente) e F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Não houve diferença significativa entre o F15 +30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 3 A.

4.3.1.2- Tratamento Crônico

Não houve diferença significativa na razão do peso do testículo pelo peso corpóreo de F56 (tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente) e F56 + 30I (tratados finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Não houve diferença significativa entre F56 + 30I e C56, Figura 3 B.

4.3.2- Próstata

4.3.2.1- Tratamento Agudo

Houve significativa redução da razão do peso da próstata pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente), houve uma redução de 49%, Figura 3 C.

Houve um significativo aumento da razão do peso da próstata pelo peso corpóreo de F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C15 e F15, contudo, não houve diferença significativa entre F15 + 30 I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 3 C.

4.3.2.2- Tratamento Crônico

Houve significativa redução da razão do peso da próstata pelo peso corpóreo de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação ao C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), houve uma redução de 59%, Figura 3 D. Não houve diferença significativa entre os C56 e F56 + 30I (tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Figura 3 D.

4.3.3- Vesícula Seminal

4.3.3.1- Tratamento Agudo.

Houve significativa redução da razão do peso da vesícula seminal pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente), houve uma redução de 56%, Figura 3 E. Houve um significativo aumento na razão do peso da vesícula seminal pelo peso corpóreo do F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C15 e F15, contudo, não houve diferença significativa entre F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 3 E.

4.3.3.2- Tratamento Crônico.

Houve uma significativa redução da razão do peso da vesícula seminal pelo peso corpóreo de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), houve uma redução de 60%, Figura 3 F. Não houve diferença significativa entre C56 e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Figura 3 F.

4.3.4- Epidídimo e Regiões (Segmento Inicial + Cabeça, Corpo e Cauda).

4.3.4.1- Tratamento Agudo – Epidídimo

Não houve diferença significativa da razão do peso do epidídimo pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação ao C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente) e F15 + 30I (animais

tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Não houve diferença significativa do peso do epidídimo entre F15 +30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução), Figura 4 A.

4.3.4.2- Tratamento Agudo - Segmento Inicial + Cabeça do Epidídimo.

Não houve diferença significativa da razão do peso do segmento inicial + cabeça do epidídimo pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente). Houve um significativo aumento na razão do peso do segmento inicial +cabeça do epidídimo pelo peso corpóreo do F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C15 e F15. Contudo, não houve diferença significativa entre F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 4 B.

4.3.4.3- Tratamento Agudo - Segmento do Corpo do Epidídimo.

Não houve diferença significativa na razão do peso do corpo do epidídimo pelo peso corpóreo nos grupos analisados, Figura 4 C.

4.3.4.4- Tratamento Agudo - Segmento da Cauda do Epidídimo.

Não houve diferença significativa da razão do peso da cauda do epidídimo pelo peso corpóreo de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente). Houve um significativo

aumento na razão do peso do segmento inicial +cabeça do epidídimo pelo peso corpóreo do F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C15 e F15. Contudo, não houve diferença significativa entre F15 + 30I e C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), Figura 4 D.

4.3.4.5- Tratamento Crônico – Epidídimo

Houve significativa redução da razão do peso do epidídimo pelo peso corpóreo de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), houve uma redução de 12%, Figura 5 A.

4.3.4.6- Tratamento Crônico - Segmento Inicial + Cabeça do Epidídimo.

Não houve diferença significativa na razão do peso do segmento inicial + cabeça do epidídimo pelo peso corpóreo nos grupos analisados, Figura 5 B.

4.3.4.7- Tratamento Crônico - Segmento do Corpo do Epidídimo.

Não houve diferença significativa na razão do peso do corpo do epidídimo pelo peso corpóreo nos grupos analisados, Figura 5 C.

4.3.4.8- Tratamento Crônico - Segmento da Cauda do Epidídimo.

Não houve diferença significativa na razão do peso do corpo do epidídimo pelo peso corpóreo nos grupos analisados, Figura 5 D.

4.4- Análise Histológica

4.4.1- Segmento Inicial do Epidídimo (R1) - Essa região é caracterizada por um epitélio celular alto e pseudoestratificado com pouca diferença morfológica entre as células que compõem o epitélio (células principais, apicais, basais). O diâmetro do lúmen é pequeno e apresenta uma pequena quantidade de espermatozoides. Não foram observadas alterações histológicas em nenhum grupo analisado, Figura 6 A-C; Figura 7 A-C.

4.4.2- Região Proximal da Cabeça do Epidídimo (R2)- Essa região é caracterizada por um epitélio colunar pseudoestratificado com diferenciação celular evidente (células principais, basais e apicais). O lúmen apresenta quantidade de espermatozoides superior ao segmento inicial. Os grupos submetidos ao tratamento agudo e crônico com finasterida apresentaram as mesmas características histológicas dos grupos controles e interrupção do tratamento. Contudo, houve redução na altura do epitélio secretor do grupo tratado cronicamente com finasterida em comparação ao grupo controle e interrupção do tratamento, Figura 6 D-F; Figura 7 D-F.

4.4.3- Região Medial da Cabeça do Epidídimo (R3) – Essa região é caracterizada por um epitélio secretor baixo, em relação a R1 e R2, mantendo a característica de epitélio colunar pseudoestratificado. O lúmen é maior com uma concentração maior de

espermatozoides. Não houve nenhuma diferença visível nesta região em decorrência ao tratamento com finasterida e interrupção do tratamento, Figura 6 G-I; Figura 7 G-I.

4.4.4- Região distal da cabeça do epidídimo (R4) – Essa região caracteriza-se por redução da altura do epitélio colunar pseudoestratificado, em relação a R1, R2, R3 e, amplo lúmen contendo alta concentração de espermatozoides. Não foi observada nenhuma alteração histológica nos grupos submetidos ao tratamento agudo e crônico, Figura 6 J-L; Figura 7 J-L.

O tecido intersticial (TI) não apresentou nenhuma alteração histológica visível em nenhuma região dos grupos analisados.

4.5- Análise Ultraestrutural

4.5.1- Tratamento Agudo

Não foram observadas alterações ultraestruturais nos animais submetidos ao tratamento agudo, Figura 8 A-L. As eletromicrografias mostraram núcleos distribuídos em diferentes níveis ao longo do epitélio secretor da região da cabeça do epidídimo, caracterizando as células principais (p) e basais (b), Figura 8 A-C. As organelas estão dispostas de maneira supranuclear com retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido, Complexo de Golgi (CG) evidente com desprendimento de grânulos de secreção (GS) e muitas mitocôndrias (M), Figura 8 D-F. Foi observado em F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) e F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) estruturas eletrodensas

denominadas fagossomos (F), esses fagossomos são mais visíveis em F15, Figura 8 E e I. As junções celulares (JC) apresentam-se íntegras em todos os grupos, desta forma, a manutenção da barreira lúmen-estroma é mantida, Figura 8 G-I. Os estereocílios (ES) e as estruturas do axonema do flagelo dos espermatozoides (A) não sofreram nenhuma alteração ultraestrutural em nenhum dos grupos analisados, Figura 8 J-L.

4.5.2- Tratamento Crônico

Foi observada a presença de células principais (p) e basais (b) no epitélio secretor do segmento da cabeça do epidídimo, além disso, foi observada uma evidente diminuição na altura desse epitélio no F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Figura 9 A-C.

As organelas estão dispostas de maneira supranuclear com retículo endoplasmático rugoso (RER) e Complexo de Golgi (CG) bem desenvolvido, Figura 9 D-F. Adicionalmente foi observado a presença de muitas mitocôndrias (M), fagossomos (F) e grânulos de secreção (GS), principalmente em F56, Figura 9 E-F. Não houve alteração nas junções celulares (JC), desta forma, mantevesse a barreira lúmen-estroma íntegra, Figura 9 G-I e nos estereocílios (ES) e no axonema (A) dos flagelos dos espermatozoides em nenhum dos grupos analisados, Figura 9 J-L.

4.6- Análise Morfométrica

4.6.1- Tratamento Agudo

O tratamento agudo não provocou alteração morfométrica em nenhuma região do segmento da cabeça do epidídimo, Tabela 1.

4.6.2- Tratamento Crônico - Região do Proximal da Cabeça (R2).

As análises morfométricas realizadas neste estudo mostram que apenas a região proximal da cabeça do epidídimo (R2), no tratamento crônico, mostrou alterações morfométricas.

Houve uma significativa redução da altura, área total e área epitelial do ducto epididimário de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Observou-se uma recuperação destes parâmetros no F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) não havendo diferença significativa entre os C56 e F56 +30I, Figura 6 A-C.

Houve um significativo aumento da área luminal do ducto epididimário em F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do por 30 dias) em comparação ao C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre F56 e F56 +30I, Tabela 2.

4.7- Análise Estereológica

4.7.1- Tratamento agudo

O tratamento agudo não provocou alteração estereológica em nenhuma região do segmento da cabeça do epidídimo, Tabela 3.

4.7.2- Tratamento Crônico – Região do Proximal da Cabeça (R2).

As análises estereológicas realizadas neste estudo mostram que apenas a região proximal da cabeça do epidídimo (R2), no tratamento crônico, mostrou alterações estereológicas.

Houve uma significativa redução do volume do epidídimo e volume do segmento da cabeça do epidídimo de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente) e F56 + 30i (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), não houve diferença significativa entre C56 e F56, Tabela 4.

Não houve diferença significativa no volume do ducto epididimário em nenhum dos grupos analisados, Tabela 4.

Houve uma significativa redução do volume epitelial do ducto epididimário de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre os C56 e F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Tabela 4.

Houve um significativo aumento do volume do lúmen do ducto epididimário de F56 (tratados com finasterida durante 56 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre C56 e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Tabela 4.

4.8- Produção Diária de Espermatozóides no Testículo e Trânsito Diário de Espermatozoides no Epidídimo.

4.8.1-Tratamento Agudo.

O tratamento agudo não provocou alteração na produção diária de espermatozoides, Tabela 5.

Não houve alteração no tempo de transito dos espermatozoides nos segmentos cabeça-corpo e cauda do epidídimo nos grupos, Tabela 5.

4.8.2 - Tratamento Crônico.

O tratamento crônico não provocou alteração na produção diária de espermatozoides Tabela 6.

Houve significativa redução no tempo do trânsito diário dos espermatozoides nos segmentos da cabeça-corpo e cauda de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente), indicando um aumento da velocidade de passagem do espermatozoide nestes segmentos, Tabela 6.

Houve significativa diferença no tempo de trânsito diário dos espermatozoides nos segmentos da cabeça-corpo entre F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), contudo não houve diferença significativa no tempo de trânsito diário dos espermatozoides no segmento cauda, Tabela 6.

4.9- Motilidade Espermática

4.9.1-Tratamento Agudo

Não houve diferença estatística na motilidade dos espermatozoides no testículo nos grupos analisados, Tabela 5.

4.9.2-Tratamento Crônico

Houve significativa redução na motilidade dos espermatozoides de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

4.10- Testes de Necropsia

4.10.1-Tratamento Agudo

Houve significativa redução na integridade da membrana dos espermatozoides pela coloração Eosina Y de F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação C15 (animais tratados durante 15 dias com a solução diluente) e F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias). Houve diferença estatística entre F15 e F15 + 30I, Tabela 5.

Houve significativa redução na integridade da membrana dos espermatozoides pelo teste de Hiposmolaridade de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) e F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação C15 (animais tratados durante 15 dias com a solução diluente). Não houve diferença significativa entre F15 e F15 + 30I, Tabela 5.

4.10.2- Tratamento Crônico

Houve significativa redução na integridade da membrana dos espermatozoides na coloração Eosina Y de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

Houve significativa redução na integridade da membrana dos espermatozoides pelo teste de Hiposmolaridade de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

4.11- Parâmetros de Fertilidade

4.11.1- Tratamento Agudo – Acasalamento Natural

Não houve diferença estatística na taxa gestacional, no índice de fecundidade e no potencial de fertilidade nos grupos analisados, Tabela 5.

Não houve diferença significativa nas perdas pré e pós-implantacionais de F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias) e F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias interrupção do tratamento por 30 dias) em comparação a C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente), Tabela 5.

4.11.2- Tratamento Crônico – Acasalamento Natural e Inseminação Artificial Intra Útero.

No acasalamento natural, não houve diferença estatística na taxa gestacional e no índice de fecundidade dos grupos analisados, Tabela 6.

Houve redução significativa do potencial de fertilidade de F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias) comparado a C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Não houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias), Tabela 6.

Não houve diferença significativa nas perdas pré-implantacionais entre os grupos analisados embora haja um evidente aumento na taxa de perdas pré-implantacionais em F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

Houve um significativo aumento nas perdas pós-implantacionais de F56 e F56 + 30I em comparação a C56. Não houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

Na inseminação artificial intra útero, não houve diferença significativa na taxa gestacional dos grupos analisados, contudo, houve uma evidente redução na taxa gestacional em F56 e F56 + 30I. Houve uma significativa redução no Potencial de Fertilidade de F56 e F56 + 30I em comparação a C56. Não houve diferença significativa entre F56 e F56 + 30I, Tabela 6.

5- DISCUSSÃO

A finasterida é um medicamento amplamente utilizado no controle de distúrbios associados aos elevados níveis de DHT, como hiperplasia benigna e cancer de próstata, acne e alopecia androgênica (Bilinska et al., 2007; Camacho 2009; Chiba et al., 2011). Sabe-se que a finasterida não tem nenhuma afinidade pelos receptores dos andrógenos e não desempenha nenhuma atividade androgênica, anti-androgênica, esterogênica, anti-esterogênica ou atividade semelhante à progesterona (Sudduth e Koronkwski, 1993), bem como não há relatos experimentais e clínicos que associam a utilização de finasterida e alterações na metabolização de lipídeos e carboidratos (Robaire e Henderson, 2005; Bilinska et al., 2007; Rosen et al., 2008). Dessa forma, o progressivo ganho de peso dos animais utilizados neste estudo está de acordo com o esperado.

A variabilidade dos níveis séricos de T e DHT observada nos animais controles devem-se a faixa etária correspondente a cada um desses grupos em associação ao período de tratamento, ou seja, 75 dias pós parto e 116 dias pós parto (60 dias pós parto + 15 ou 56 dias de tratamento). Assim, foi observado no tratamento agudo, valores hormonais séricos de animais púberes (75 dias pós-parto) e no tratamento crônico, valores séricos hormonais de animais adultos (116 dias pós-parto). Essa variabilidade dos níveis séricos dos andrógenos em associação ao envelhecimento tem sido relatada como uma condição natural ao amadurecimento sexual sendo bem retratado em roedores (Robaire e Henderson, 2006) e em humanos (Araujo e Wittert, 2011). Este fato decorre de diferentes estágios de maturidade sexual desses animais, como relatado em outros trabalhos que também reportaram o uso de finasterida (Cukieski et al., 1991, Ma et al., 2004; Sun et al., 2008; Cayette et al., 2006).

Os níveis séricos de DHT, nos animais submetidos ao tratamento com finasterida, confirmam a atividade inibitória desse medicamento na conversão da T em DHT. Assim, há uma redução significativa dos níveis séricos de DHT como esperado e reportado previamente (Steers et al., 2001; Robaire e Henderson, 2005; Rosen et al., 2008; Corradi et al., 2009). Além disso, o percentual de redução de DHT sérica no grupo tratado cronicamente é comparável ao percentual de redução de DHT observada em homens submetidos ao tratamento de alopecia androgênica com finasterida onde os níveis de DHT são reduzidos entre 60-70% dos valores controles (Camacho et al., 2008, Camacho, 2009). Este fato permitiu identificar os efeitos que a baixa concentração sérica de DHT desencadeia no epidídimo e sugere que alterações similares possam ocorrer em humanos; uma vez que neste estudo e no uso clínico da finasterida para o tratamento da alopecia androgênica, ambas as condições estão sob a mesma porcentagem de redução de DHT (Steers, 2001; Bilinska et al, 2007; Chiba et al., 2011).

Com relação a razão do peso dos órgãos pelo peso corpóreo, a não variabilidade da razão do peso dos testículos frente à variação dos níveis séricos de T e DHT, em decorrência ao tratamento com finasterida, foi previamente reportada em ratos do gênero *Wistar* tratados com 2 mg/kg/dia de finasterida durante 10 meses (Rhoden et al., 2002), ratos da espécie Sprague Dawley tratados durante 28 dias com diferentes doses de finasterida (Cayette et al., 2006) e ratos do gênero *Wistar* tratados com 5 mg/kg/dia durante 56 dias (Kolasa et al., 2008). Pelas descrições apresentadas acima, os resultados do peso testicular são condizentes com a literatura pertinente.

A razão do peso do epidídimo pelo peso corpóreo e de seus segmentos nos grupos experimentais (agudo e crônico) indica que, frente à depleção parcial de DHT, o epidídimo apresenta uma menor sensibilidade às variações séricas de andrógenos em comparação a atrofia observada na próstata e vesícula seminal. A redução da razão dos

pesos do epidídimo, próstata e vesícula seminal observado nesse estudo assemelha-se a resultados previamente reportados sobre o peso desses órgãos em razão do tratamento dos animais com finasterida (Cayette et al., 2006; Kolasa et al., 2008). Segundo Sterrs et al., 2001 e Delella et al., 2009, a maior redução no peso da próstata e vesícula seminal, em comparação ao testículo e epidídimo, deve-se particularmente a maior dependência daqueles por DHT em seu crescimento, manutenção e homeostasia.

O epidídimo é dividido em 3 segmentos anatômicos: cabeça (com segmento inicial), corpo e cauda, contudo, recentes relatos em roedores retratam que cada uma dessas regiões é composta por segmentos inter-regionais ou lóbulos que são separados por septos de tecido conjuntivo (Reid e Cleland, 1957; Abu-Haila e Fain-Maurel, 1984). As técnicas de microdissecção em epidídimos de camundongos (Turner et al., 2004; Johnston et al., 2005) e ratos (Jelinsky et al., 2007) demonstraram que os septos de tecido conjuntivo estabelecem limites únicos e específicos no que diz respeito a expressão gênica, produção e secreção de proteínas e fatores parácrinos de ação epitelial (Turner et al., 2004; Johnston et al., 2005; Jelinsky et al., 2007).

Dentre os segmentos do epidídimo, o segmento inicial e a cabeça apresentam uma maior dependência de DHT e uma maior sensibilidade à variação sérica desse andrógeno em relação aos demais segmentos. Além disso, histologicamente houve uma visível redução na altura do epitélio secretor da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) nos animais tratados cronicamente, alteração que se comprovou com a análise ultraestrutural e as análises morfométricas e estereológicas da referida região.

O fato da redução da altura do epitélio epididimário, devido ao tratamento com finasterida, estar localizado em uma região tão bem delimitada (R2) no segmento da cabeça do epidídimo pode ser correlacionado a estudos que demonstram que a finasterida reduz o tamanho da próstata, por reduzir os níveis intra-prostáticos de DHT

consequentemente reduzindo o efeito estimulante do andrógeno na reposição celular do epitélio secretor e diminuindo o efeito protetor dessas células contra a apoptose. Estes fenômenos em conjunto resultam na diminuição progressiva da funcionalidade das células epiteliais e aumenta a taxa de morte celular (Tindall et al., 2008; Corradi et al., 2009).

Sendo assim sugere-se que esta região R2 no segmento da cabeça do epidídimo, sob a redução dos níveis séricos de DHT, pode seguir os mesmos mecanismos observados na próstata, uma vez que as células epiteliais do segmento da cabeça do epidídimo dependem significativamente da atuação e estimulação de andrógenos, principalmente DHT. É descrito que cerca de 75% das proteínas que participam da maturação epididimária são secretadas nas regiões iniciais deste ducto (segmento inicial e cabeça do epidídimo) e 48% dessas proteínas são dependentes de DHT (Syntin et al., 1999, Robaire et al., 2000; Toshimori, 2003; Dacheux et al., 2005) e essenciais ao processo de fecundação natural (Robaire et al., 2000).

Corroborando com os resultados do presente estudo, no que diz respeito a regionalização da sensibilidade do epidídimo a depleção parcial de DHT e, baseado no perfil de expressão gênica regional do epidídimo, alguns segmentos epididimários parecem se comportar como diferentes unidades funcionais (Kirchhoff, 2002; Johnston et al., 2005; Jelinsky et al., 2007).

Sendo assim, sugere-se que a resposta frente à depleção parcial de DHT na região da cabeça proximal do epidídimo seja em decorrência dessa região corresponder uma unidade funcional que apresenta uma maior suscetibilidade e resposta a redução dos níveis séricos de DHT podendo comprometer a secreção de proteínas que são importantes para o processo de maturação do espermatozoide e fertilidade masculina (Sterrs, 2001, Chiba et al., 2011, Fiu et al., 2011).

A recuperação dos parâmetros morfométricos e estereológicos analisados para essa região, após a interrupção do tratamento com finasterida, foi significativa e semelhante aos valores encontrados no grupo controle indicando que essa recuperação decorre da normalização dos níveis séricos de DHT, como reportado para o peso do epidídimo (Cayette et al., 2006; Kolasa et al., 2008). Nossos resultados morfométricos e estereológicos são inéditos, principalmente no que diz respeito à identificação da região proximal da cabeça do epidídimo como mais susceptível a depleção de DHT.

Contudo, nem todos os parâmetros morfométricos e estereológicos são recuperados totalmente após a interrupção do tratamento com finasterida. Este fato pode ser em decorrência do intervalo de tempo (30 dias) utilizado para a interrupção do tratamento. Para a completa recuperação dos parâmetros analisados pode ser necessário um tempo superior a 30 dias ou alternativamente esses parâmetros não sejam passíveis de recuperação total e comprometam significativamente a qualidade do espermatozoide e a fertilidade masculina de forma definitiva.

Com relação ao tempo de trânsito do espermatozoide, sabe-se que o epidídimo possui uma inervação autônoma proveniente do plexo mesentérico inferior e gânglios pélvicos (Ricker, 1998). Essa inervação simpática controla a musculatura lisa existente no ducto epididimário em todos os diferentes segmentos e, fatores como a temperatura (Caballed e Saling, 1997), entotelina 1 cGMP (Mewe et al., 2006), prostaglandinas (Cosentino et al., 1984), T e DHT (Kempinas et al., 1998; Fernandez et al., 2008) interferem na atividade contrátil dessa musculatura. Dessa forma, alterações nesses fatores, como a redução dos níveis séricos de DHT justificam a redução do tempo de trânsito do espermatozoide e a aceleração da passagem do mesmo pelos diferentes segmentos do ducto epididimário. Conseqüentemente essa aceleração da passagem dos espermatozoides no ducto epididimário reduz o tempo que os espermatozoides estão

disponíveis para a maturação epididimária interferindo na qualidade do gameta, como por exemplo, na motilidade do espermatozoide e na fertilidade masculina como pôde ser comprovado com a redução de alguns parâmetros de fertilidade (Klinefelter et al., 2002; Kermani-Alghoraishi et al., 2010; Garcia et al., 2011).

A depleção parcial de DHT provocada pela administração de finasterida, em ambos os tratamentos desencadeou significativas alterações no padrão de motilidade dos espermatozoides no tratamento crônico. Essa significativa alteração denota o quanto a maturação epididimária foi comprometida pela alteração dos níveis séricos desses andrógenos, uma vez que a aquisição da motilidade do espermatozoide é um dos eventos marcantes desse processo no epidídimo (Robaire et al., 2000; Robaire et al., 2005). Sugere-se que glicoproteínas e proteínas que eventualmente são incorporadas ou removidas da membrana do espermatozoide podem não ter desempenhado sua função específica no processo de maturação epididimária e comprometido tanto a motilidade, integridade da membrana do espermatozoide e a capacidade do espermatozoide em fecundar o gameta feminino como reportados por outros estudos que avaliam as alterações no tempo de transito do espermatozoide pelo epidídimo e seu impacto na fertilidade masculina (Oliva et al., 2006, Fernandez et al., 2007; Kermani-Alghoraishi et al., 2010).

A integridade da membrana plasmática do espermatozoide é um dos mais importantes aspectos da biologia do mesmo e dentro dessa característica pode-se destacar a troca de metabólitos com o meio ambiente proporcionando um importante papel em vários eventos precedentes a fertilização do gameta feminino (capacitação, reação acrossomal e fusão com o ovócito II). Dessa forma, as alterações na integridade da membrana plasmática do espermatozoide observadas pelos testes de coloração de Eosina Y e hiposmolaridade nos animais submetidos ao tratamento com finasterida são

mais uma evidência do comprometimento da qualidade do espermatozoide (Jeyndran et al., 1984).

A somatória dos fatores anteriormente mencionados culminou com uma redução no potencial de fertilidade, bem como um aumento nas perdas pós implantacionais principalmente nos grupos cronicamente tratados com finasterida. Esses resultados fornecem evidências sobre o comprometimento da qualidade do espermatozoide decorrentes da aceleração da passagem dos espermatozoides através do epidídimo, o que compromete a integridade da membrana dos espermatozoides e principalmente a motilidade dessas células. Além disso, mesmo após 30 dias de interrupção do tratamento com finasterida, os parâmetros de fertilidade, a qualidade do espermatozoide e do tempo de trânsito epididimário manteve-se reduzidos em relação aos grupos controles.

Alterações nos parâmetros de fertilidade dos animais tratados com finasterida e que tiveram o tratamento interrompido por 30 dias não pode ser explicado unicamente pela diminuição da secreção da glândula de coagulação e consequente ausência do plug vaginal (Cukierski et al., 1991; Wise et al., 1991), uma vez que na inseminação artificial intra útero, as fêmeas foram previamente acasaladas com machos vasectomizados permitindo e garantindo a formação do plug vaginal. Mesmo nesta condição, o potencial de fertilidade nos animais tratados com finasterida e que tiveram o tratamento interrompido por 30 dias foi menor que o valor observado nos controles e a inseminação artificial intra útero por ter um número fixo e crítico de espermatozoides aumenta a probabilidade de detectar uma diminuição na qualidade dos espermatozoides (Perobelli et al., 2011).

Corroborando com os resultados observados em ratos, recentemente, foi relatado que a infertilidade masculina e o aumento nas perdas em uma gestação podem estar associados com os efeitos da administração contínua de pequenas doses de finasterida

em homens, o que pode influenciar negativamente a integridade do DNA de espermatozoides (Tiu e Zini, 2011). Embora a interrupção do tratamento com finasterida aumente imediatamente o volume do sêmen, a concentração dos espermatozoides permanece abaixo do normal pelo menos quatro meses após o fim do tratamento (Chiba et al., 2011). O mesmo foi observado em outros dois casos de azoospermia e oligospermia grave após seis meses de interrupção do tratamento (Liu et al., 2008).

Outros estudos devem ser realizados para complementar o conhecimento existente sobre a fisiologia do epidídimo após a depleção parcial de DHT, sobre o tempo necessário para a recuperação dos parâmetros de fertilidade após a interrupção do tratamento com finasterida, e se estes parâmetros podem ser totalmente recuperados, uma vez que, um número cada vez maior de jovens faz uso de finasterida como um método preventivo e paliativo contra a alopecia androgênica.

6. TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Peso Corpóreo em gramas de ratos Sprague Dawley. C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Para o Peso Corpóreo foi utilizado ANOVA seguido pelo teste Tukey, $p < 0.05$.

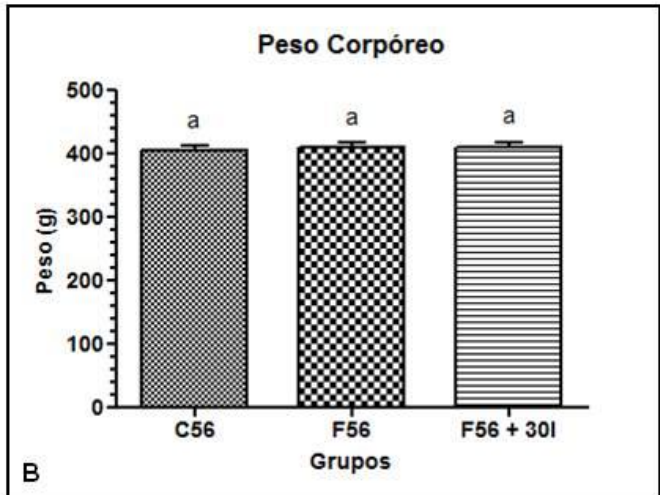
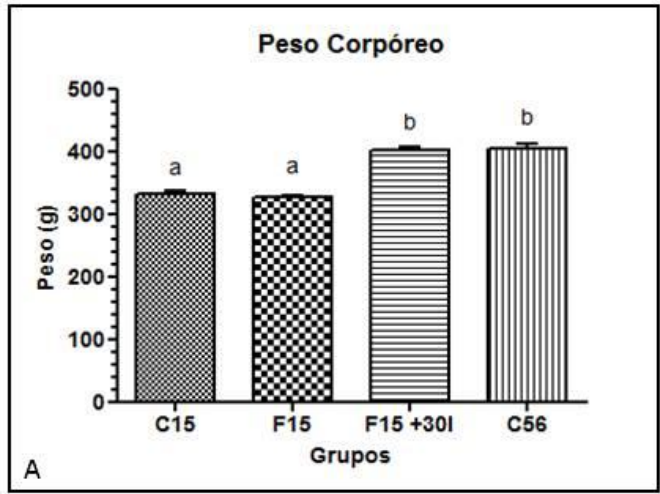


Figura 2: Dosagem Sérica de Testosterona (T) e Dihidrotestosterona (DHT). Em A e C dosagem sérica de T e em B e D dosagem sérica de DHT. C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle. Para a Dosagem Sérica de T foi utilizado ANOVA seguido do teste de Bonferroni (A e C) e para a Dosagem Sérica de DHT foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey (B e D)

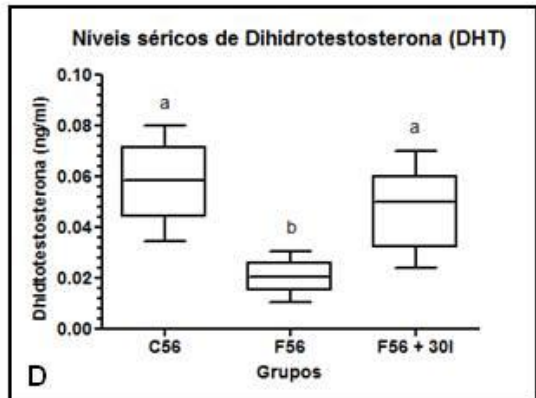
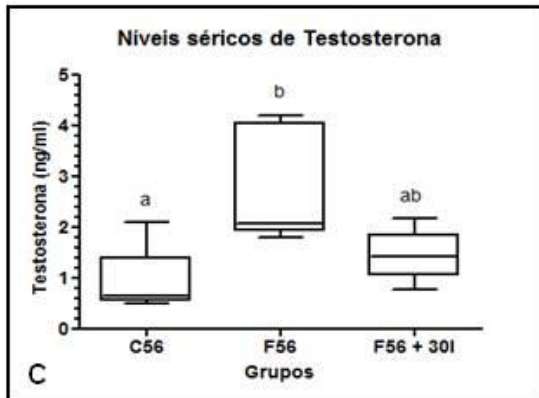
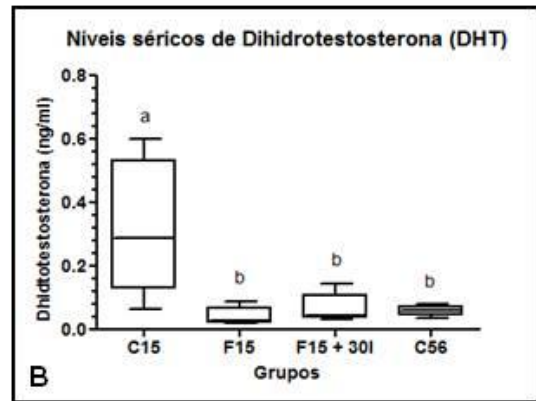
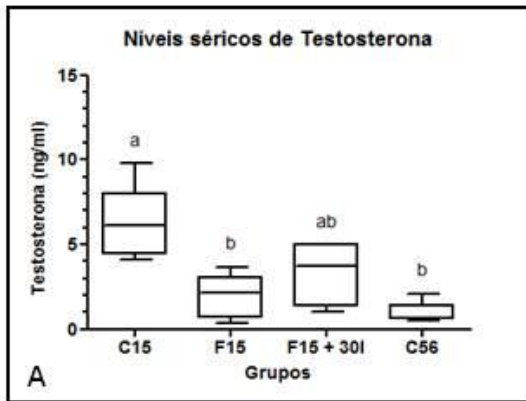


Figura 3: Razão do Peso dos Órgãos pelo Peso Corpóreo em gramas (g). Razão do Peso do Testículo pelo Peso Corpóreo (A-B), Razão do Peso da Próstata pelo Peso Corpóreo (C-D), Razão do Peso da Vesícula Seminal pelo Peso Corpóreo (E-F). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Para a Razão do Peso dos Órgãos foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle, ^c estatisticamente diferente do controle e tratado.

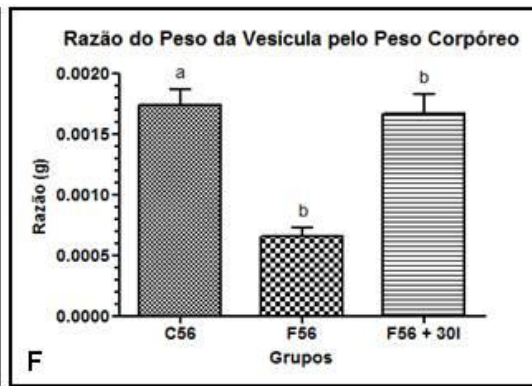
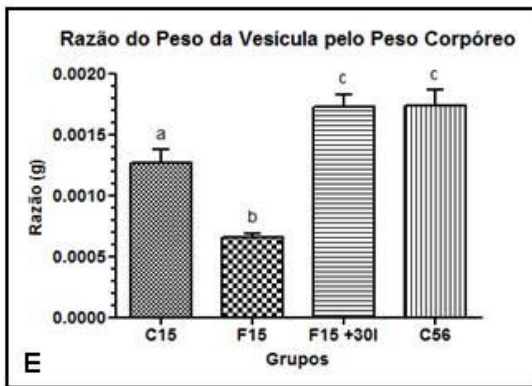
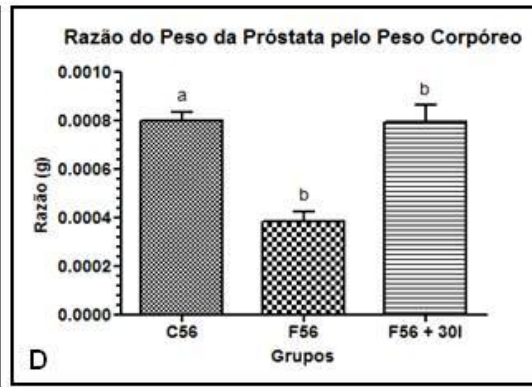
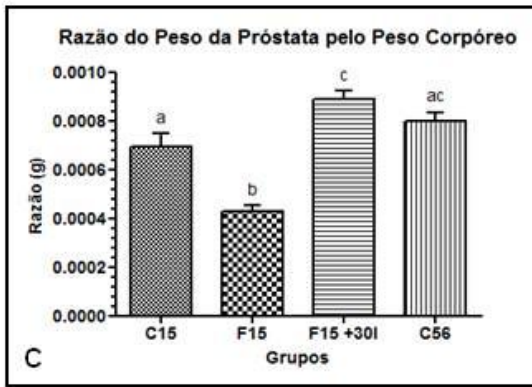
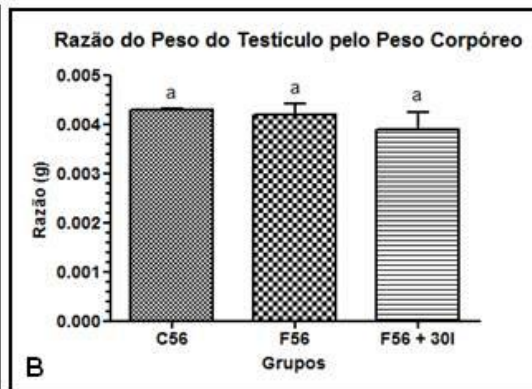
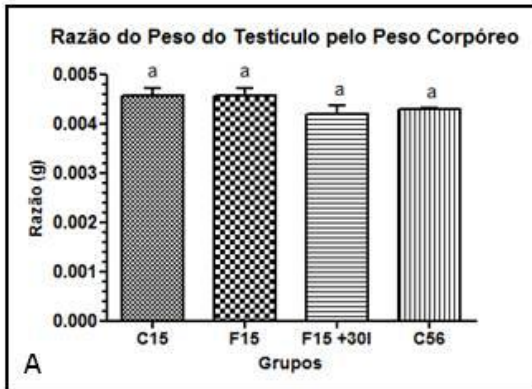


Figura 4: Razão do Peso dos Órgãos pelo Peso Corpóreo em gramas (g). Razão do Peso do Epidídimo pelo Peso Corpóreo (A), Razão do Peso da Cabeça do Epidídimo pelo Peso Corpóreo (B), Razão do Peso do corpo do epidídimo pelo peso corpóreo (C), do peso da cauda do epidídimo pelo peso corpóreo (D). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Para a Razão do Peso dos Órgãos foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

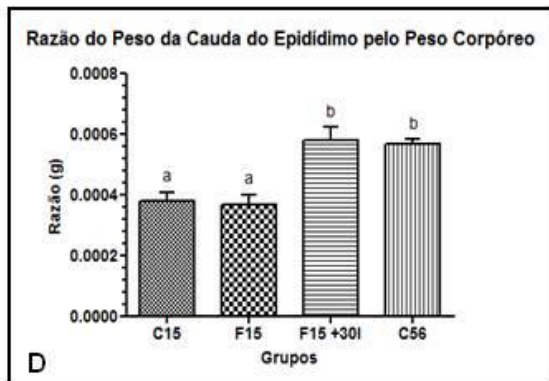
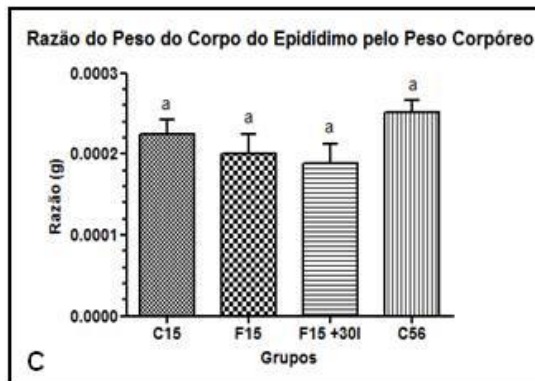
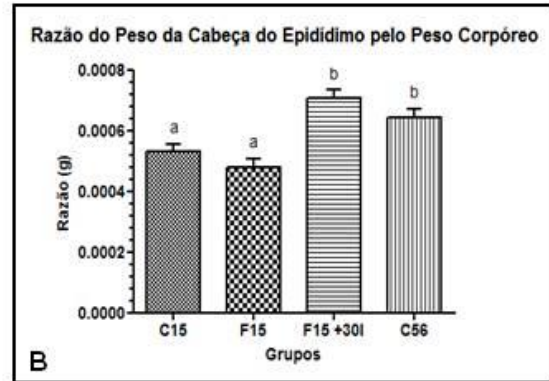
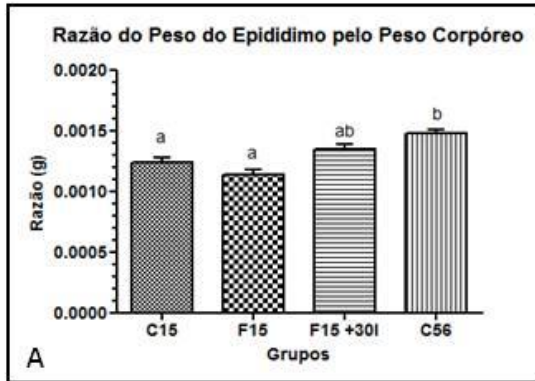


Figura 5: Razão do peso dos órgãos pelo peso corpóreo em gramas (g). Razão do peso do epidídimo pelo peso corpóreo (A), razão do peso da cabeça do epidídimo pelo peso corpóreo (B), razão do peso do corpo do epidídimo pelo peso corpóreo (C), do peso da cauda do epidídimo pelo peso corpóreo (D). C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Para a Razão do Peso dos Órgãos foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

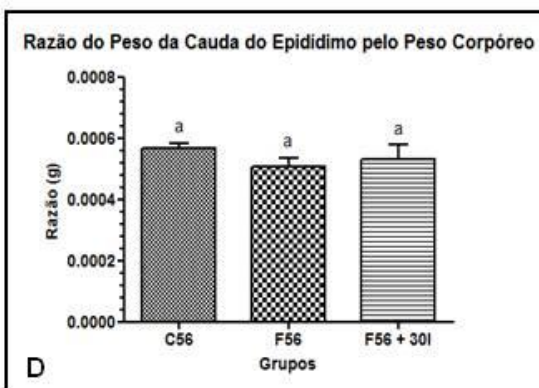
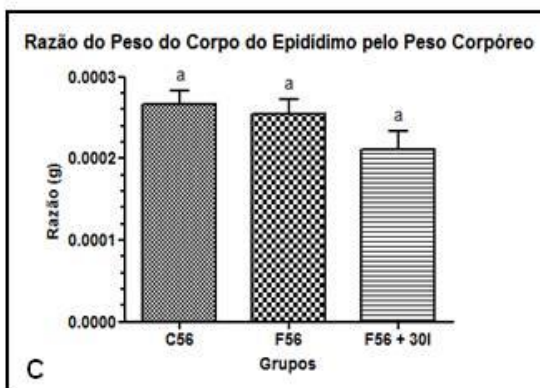
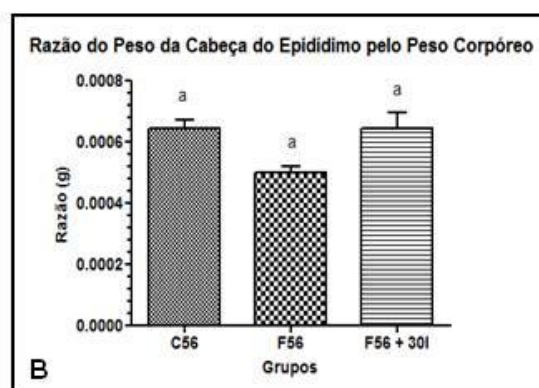
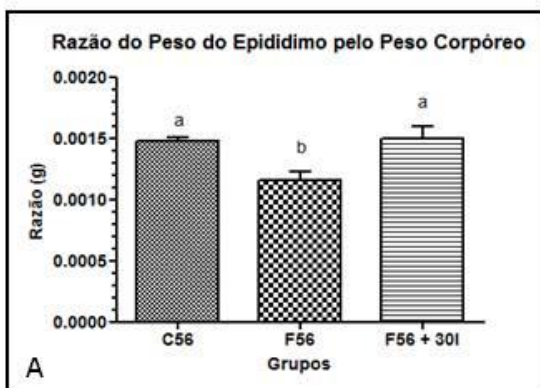


Figura 6: Fotomicrografias das regiões do segmento da cabeça do epidídimo (A-L). Região R1 (A, B, C), região R2 (D, E, F), região R3 (G, H, I), região R4 (J, K, L). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente: A, D, G, J); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias: B, E, H, K); F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias: C, F, I, L). Barra de referência: A-L: 10 μ m (objetiva de 60x). Epitélio do ducto epididimário (EP), tecido intersticial (TI), espermatozoides (esp).

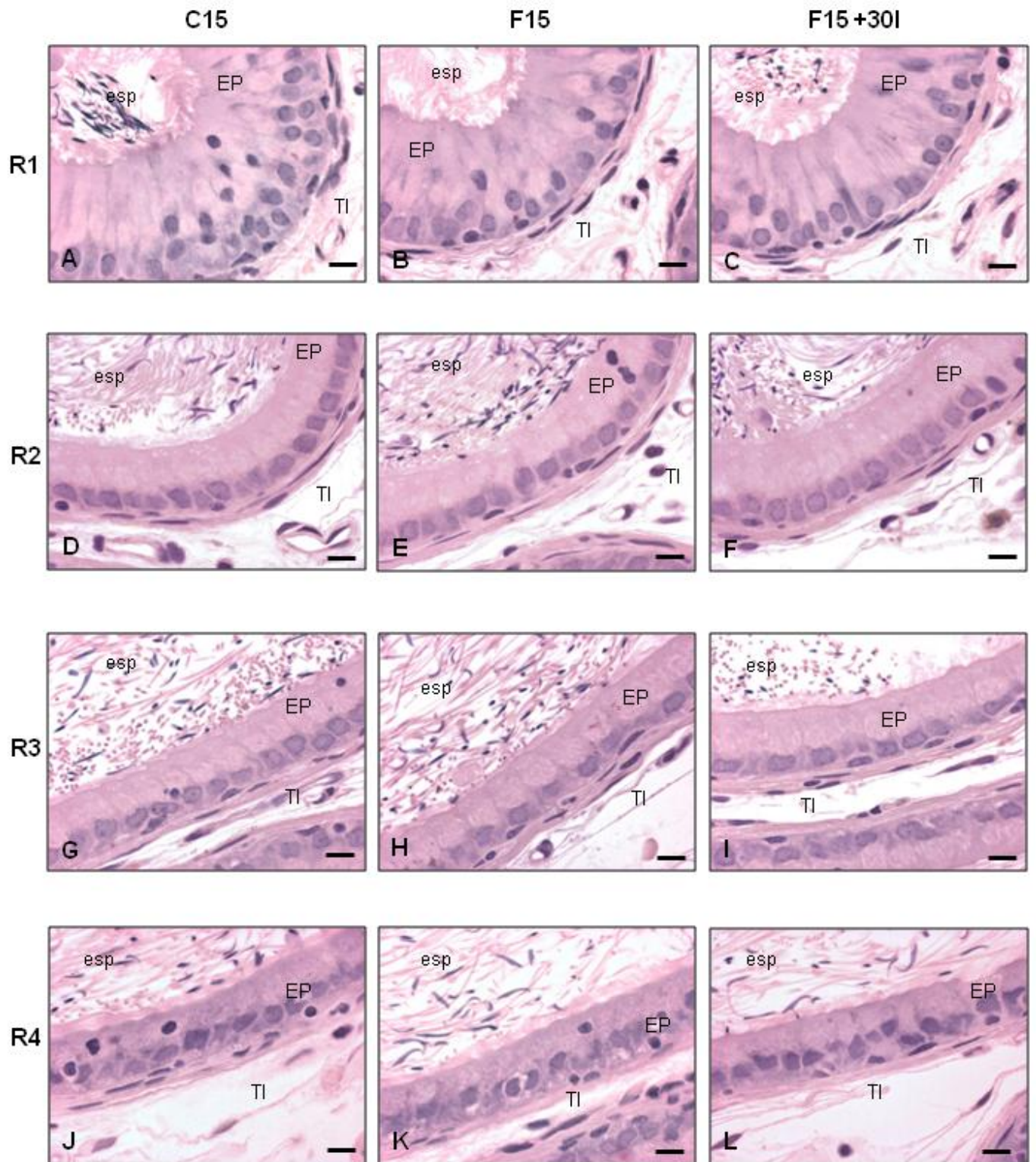


Figura 7: Fotomicrografias das regiões do segmento da cabeça do epidídimo (A-L). Região R1 (A, B, C), região R2 (D, E, F), região R3 (G, H, I), região R4 (J, K, L). C15 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente: A, D, G, J); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias: B, E, H, K); F15 + 30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias: C, F, I, L). Barra de referência: A-L: 10 μ m (objetiva de 60x). Epitélio do ducto epididimário (EP), tecido intersticial (TI), espermatozoides (esp).

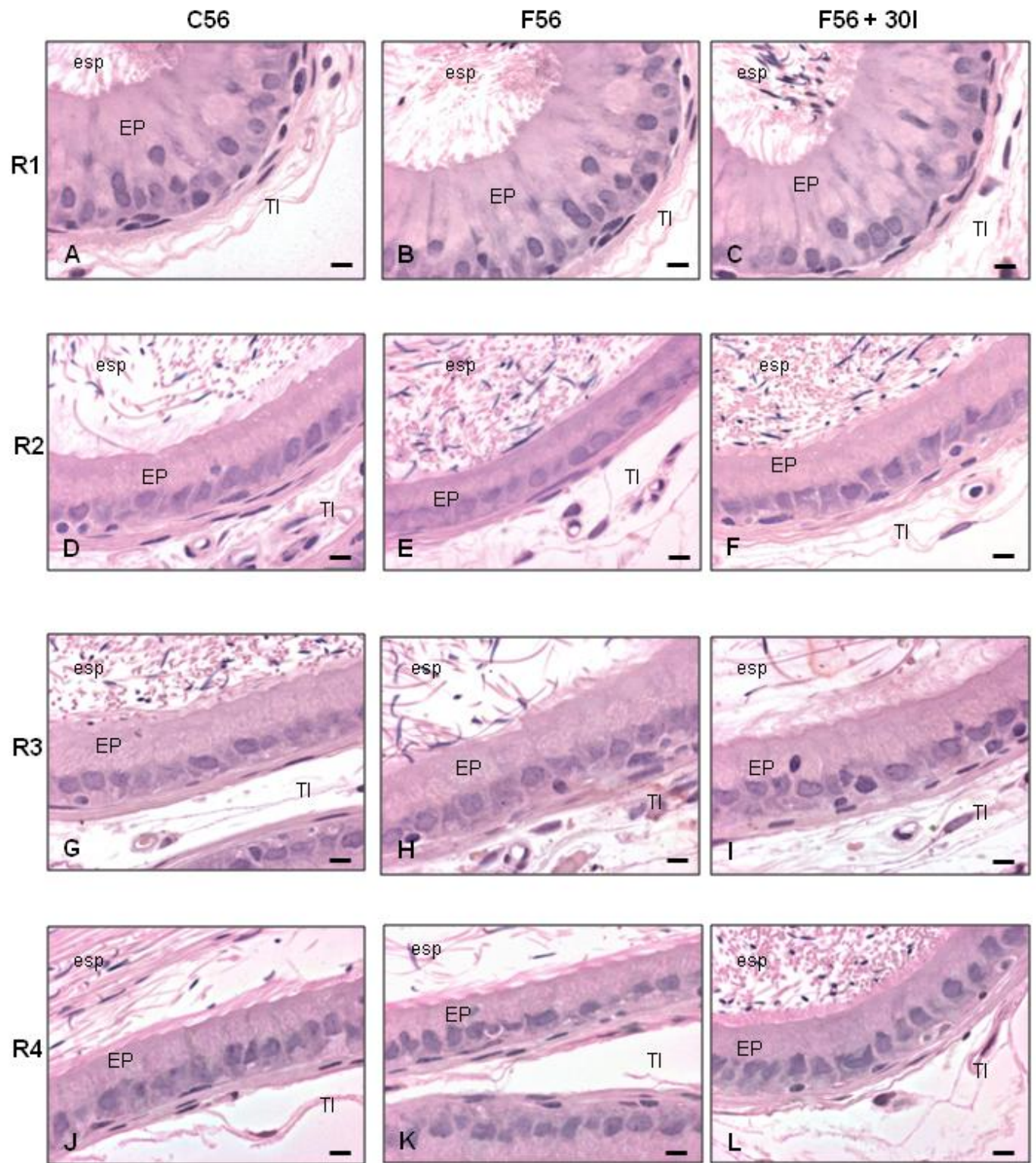


Figura 8-: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) (A-L). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente: A, D, G, J); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias: B, E, H, K); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias: C, F, I, L). Barra de referência: A-C: 2156 μm ; D-F: 12930 μm G-I: 27800 μm J-L: 6000 μm . Panorâmica do epitélio secretor do ducto epididimário (A-C), organelas citoplasmáticas (D-F), junções celulares (G-I), estereocílios e axonema do espermatozóiide (J-L). Barra de referência: A-C: 2156 μm ; D-F: 12930 μm G-I: 27800 μm J-L: 6000 μm . Células principais (p), células basais (b), Complexo de Golgi (CG), Mitocôndria (M), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), Fagossomos (F), Junções celulares (JC), Grânulos de Secreção (GS), Axonema (A) e Estereocílios (ES).

C15

F15

F15 +30I

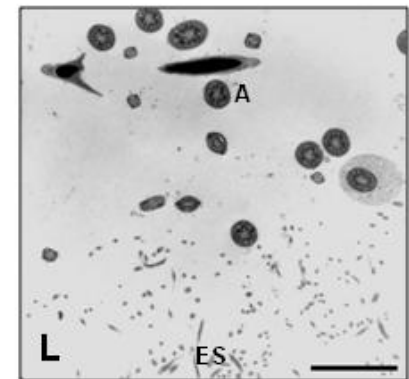
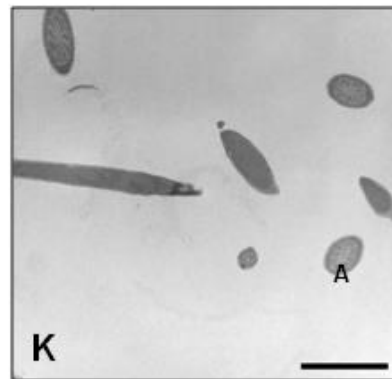
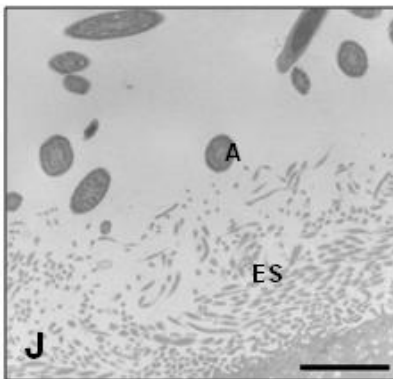
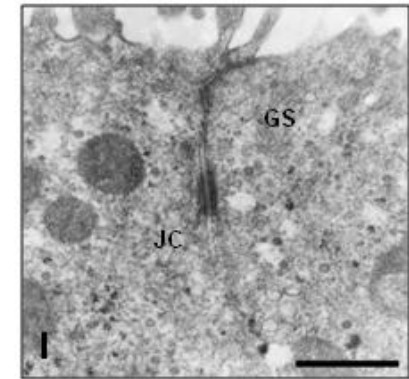
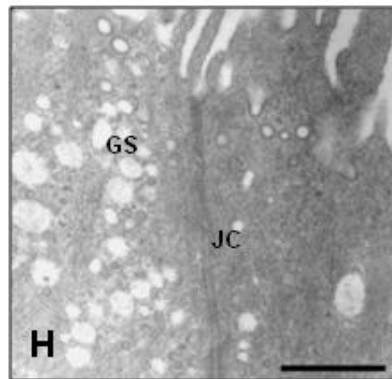
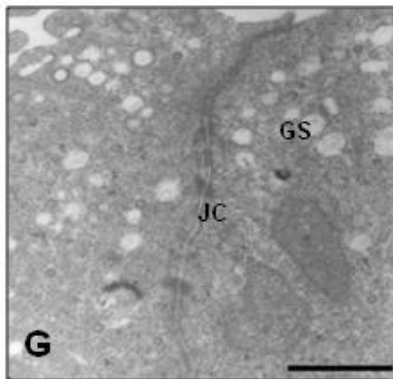
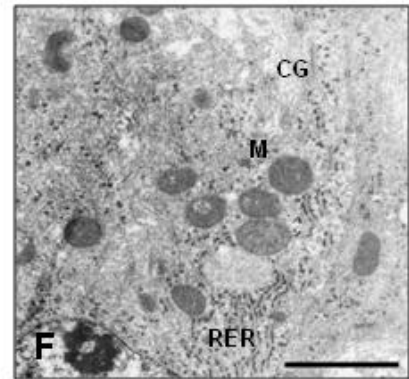
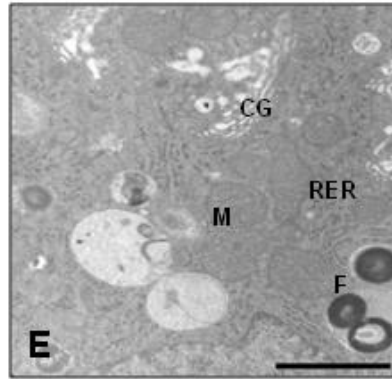
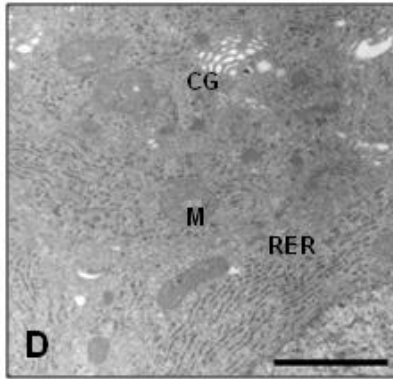
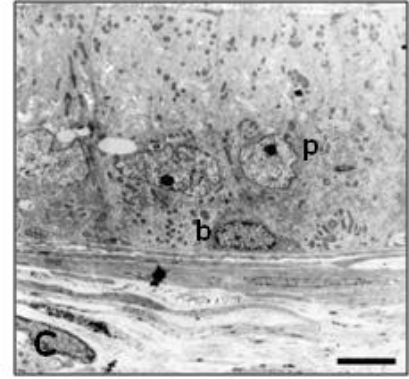
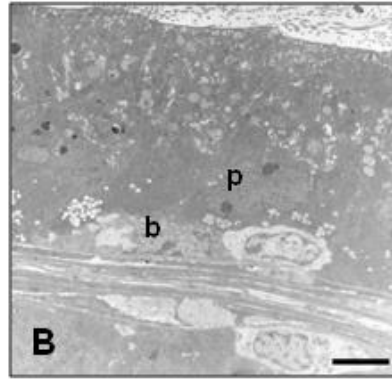
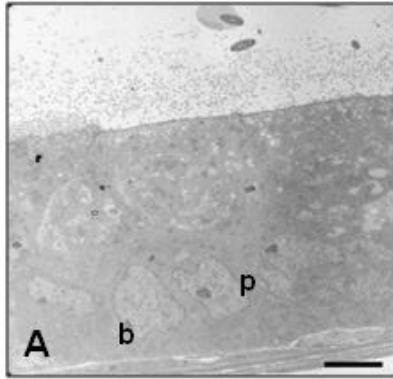


Figura 9- Fotomicrografias eletrônicas de transmissão da região proximal da cabeça do epidídimo (A-L). C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente: A, D, G, J); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias: B, E, H, K); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias: C, F, I, L). Panorâmica do epitélio secretor do ducto epididimário (A-C), organelas citoplasmáticas (D-F), junções celulares (G-I), estereocílios e axonema do espermatozóide (J-L). Barra de referência: A-C: 2156 μm ; D-F: 12930 μm G-I: 27800 μm J-L: 6000 μm . Células principais (p), células basais (b), Complexo de Golgi (CG), Mitocôndria (M), Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), Fagossomos (F), Junções celulares (JC), Grânulos de Secreção (GS), Axonema (A) e Estereocílios (ES).

C56

F56

F56 +30I

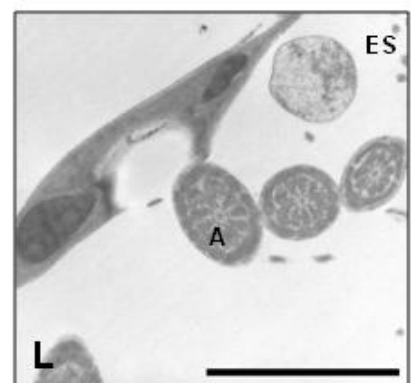
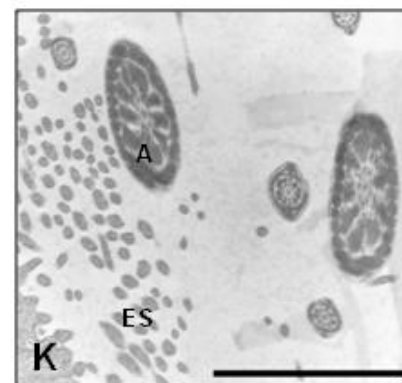
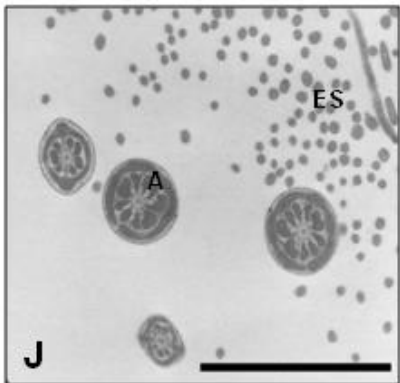
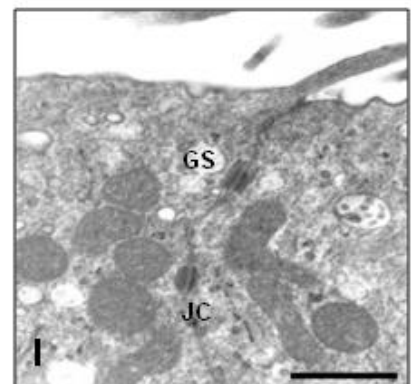
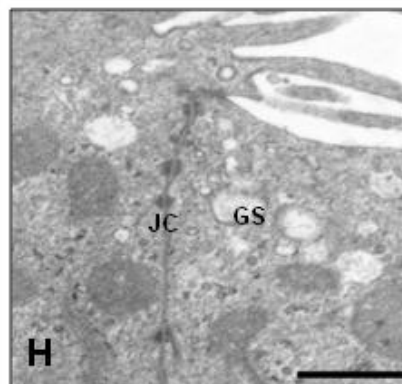
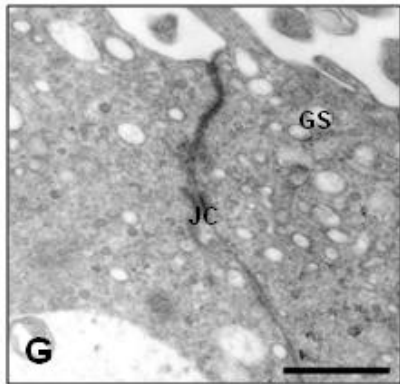
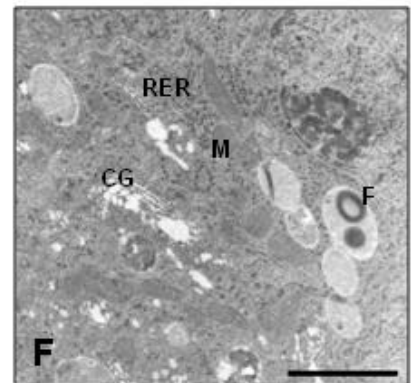
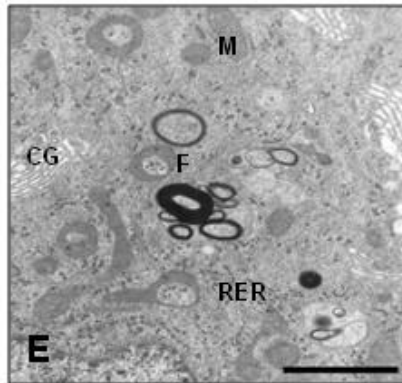
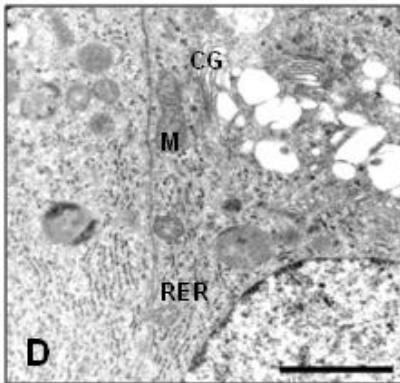
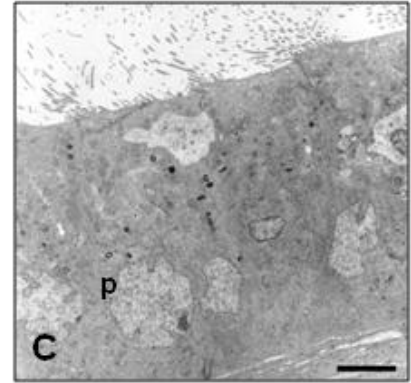
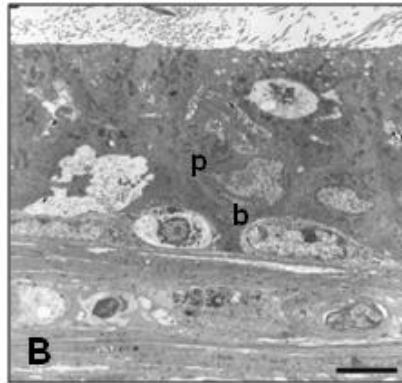
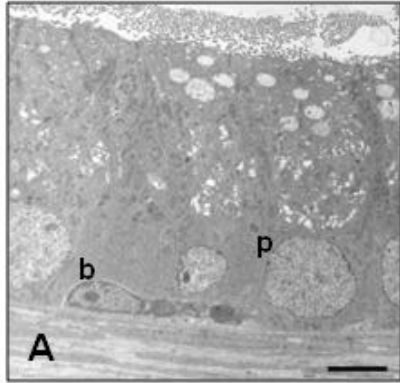


Tabela 1 – Análise morfométrica da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) Altura do epitélio epididimário ($\log \mu\text{m}$), Área do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$), Área epitelial do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$) e Área do lúmen do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	Regiões	GRUPOS				P
		C15	F15	F15 + 30I	C56	
Altura do epitélio epididimário (log μm)	R1*	1.62±0.11 ^a	1.60±0.09 ^a	1.64±0.07 ^a	1.62±0.03 ^a	NS
	R2*	1.50±0.03 ^a	1.49±0.03 ^a	1.52±0.02 ^a	1.54±0.07 ^a	NS
	R3*	1.46±0.04 ^a	1.45±0.03 ^a	1.45±0.06 ^a	1.46±0.02 ^a	NS
	R4**	1.42±0.01 ^a	1.43±0.02 ^a	1.43±0.05 ^a	1.43±0.02 ^a	NS
Área do ducto epididimário (log μm^2)	R1*	4,38±0.11 ^a	4.37±0.12 ^a	4.36±0.10 ^a	4.38±0.07 ^a	NS
	R2*	4,44±0.09 ^a	4.43±0.05 ^a	4.42±0.03 ^a	4.42±0.12 ^a	NS
	R3*	4,95±0.04 ^a	4.96±0.11 ^a	4.94±0.03 ^a	4.96±0.03 ^a	NS
	R4*	4,92±0.03 ^a	4.91±0.09 ^a	4.97±0.03 ^a	4.98±0.08 ^a	NS
Área do epitélio do ducto epididimário (log μm^2)	R1**	4,23±0.14 ^a	4.22±0.15 ^a	4.23±0.12 ^a	4.24±0.06 ^a	NS
	R2*	4,22±0.05 ^a	4.22±0.05 ^a	4.26±0.04 ^a	4.27±0.14 ^a	NS
	R3*	4,45±0.12 ^a	4.46±0.05 ^a	4.45±0.07 ^a	4.47±0.02 ^a	NS
	R4*	4,49±0.06 ^a	4.48±0.06 ^a	4.52±0.10 ^a	4.52±0.09 ^a	NS
Área do lúmen do ducto epididimário (log μm^2)	R1*	3,72±0.14 ^a	3.73±0.19 ^a	3.77±0.15 ^a	3.79±0.16 ^a	NS
	R2*	4,15±0.16 ^a	4.12±0.05 ^a	3.84±0.05 ^a	3.83±0.21 ^a	NS
	R3**	4,72±0.01 ^a	4.74±0.14 ^a	4.76±0.06 ^a	4.79±0.04 ^a	NS
	R4*	4,70±0.02 ^a	4.71±0.12 ^a	4.76±0.07 ^a	4.78±0.08 ^a	NS

Os dados foram expressões em Média \pm SD. *ANOVA seguido pelo teste Tukey; **ANOVA seguido pelo teste Bonferroni;
^b: Significativamente diferente do controle.

Tabela 2 – Análise morfométrica da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) Altura do epitélio epididimário ($\log \mu\text{m}$), Área do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$), Área epitelial do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$) e Área do lúmen do ducto epididimário ($\log \mu\text{m}^2$). C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	Regiões	GRUPOS			P
		C56	F56	F56 + 30I	
Altura do epitélio epididimário (log μm)	R1*	1.62±0.03 ^a	1.61±0.05 ^a	1.61±0.08 ^a	NS
	R2*	1.54±0.07 ^a	1.49±0.07 ^b	1.57±0.07 ^a	<0.001
	R3*	1.46±0.02 ^a	1.47±0.03 ^a	1.47±0.05 ^a	NS
	R4*	1.47±0.02 ^a	1.46±0.05 ^a	1.47±0.03 ^a	NS
Área do ducto epididimário (log μm^2)	R1*	4.38±0,07 ^a	4.37±0,07 ^a	4.38±0.12 ^a	NS
	R2*	4.42±0,12 ^a	4.36±0,12 ^b	4.44±0.08 ^a	<0.05
	R3*	4.96±0,03 ^a	4.96±0,03 ^a	4.96±0.01 ^a	NS
	R4*	4.98±0,08 ^a	4.96±0,05 ^a	5.00±0.02 ^a	NS
Área do epitélio do ducto epididimário (log μm^2)	R1*	4.24±0.06 ^a	4.23±0.07 ^a	4,25±0.16 ^a	NS
	R2**	4.27±0.14 ^a	4.05±0.37 ^b	4.23±0.10 ^a	<0.0001
	R3**	4.47±0.02 ^a	4.48±0.05 ^a	4,49±0,03 ^a	NS
	R4*	4.48±0.09 ^a	4.42±0.03 ^a	4.48±0.05 ^a	NS
Área do lúmen do ducto epididimário (log μm^2)	R1*	3.79±0.16 ^a	3.78±0.08 ^a	3.76±0.08 ^a	NS
	R2**	3.83±0.21 ^a	3.99±0.13 ^b	3.99±0.13 ^b	<0.0001
	R3*	4.79±0.04 ^a	4.78±0.02 ^a	4.78±0.02 ^a	NS
	R4**	4.80±0.08 ^a	4.81±0.07 ^a	4.83±0.04 ^a	NS

Os dados foram expressões em Média \pm SD. *ANOVA seguido pelo teste Tukey; **ANOVA seguido pelo teste Bonferroni; b: Significativamente diferente do controle.

Tabela 3 – Análise estereológica da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) Volume do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$); Volume da cabeça do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$); Volume do ducto epididimário (%); Volume do epitélio do ducto epididimário (%); Volume do lúmen do ducto epididimário (%); Volume do tecido intersticial (%). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias); C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

ANÁLISES ESTEREOLÓGICAS	Regiões	GRUPOS				P
		C15	F15	F15 + 30I	C56	
Volume do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$)*		5.20±0.20 ^a	4.90±0.39 ^a	5.40±0.50 ^a	5.90 ±0.35 ^a	NS
Volume da cabeça do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$)*		2.20±0.11 ^a	2.30±0.20 ^a	2.12±0.31 ^a	2.60 ±0.20 ^a	NS
Volume do ducto epididimário (%)	R1*	48.86± 4.69 ^a	45.56± 1.07 ^a	42.72± 2.15 ^a	49.32± 6,72 ^a	NS
	R2*	58.74± 6.34 ^a	56.56± 1.07 ^a	52.72± 2.15 ^a	52.74 ± 9.16 ^a	NS
	R3*	69.71 ±6.67 ^a	65.72 ±4.30 ^a	66.18 ±2.43 ^a	69.54 ±4.49 ^a	NS
	R4**	67.65 ±5.37 ^a	63.18 ±2.30 ^a	69.04 ±9.40 ^a	71.61 ±5.81 ^a	NS
Volume do epitélio do ducto epididimário (%)	R1*	36.72±8.39 ^a	29.42±4.22 ^a	31.95±2.82 ^a	34.92±5.57 ^a	NS
	R2**	29.86±5.41 ^a	26.34±3.53 ^a	30.84±2.52 ^a	30.10±7.07 ^a	NS
	R3**	22.90±2.24 ^a	18.06±4.96 ^a	22.84±2.88 ^a	22.66±3.54 ^a	NS
	R4*	19.96±5.05 ^a	21.62±4.73 ^a	24.22±3.19 ^a	21.09±2.82 ^a	NS
Volume do lúmen do ducto epididimário (%)	R1*	12.14±4.50 ^a	16.14±5.01 ^a	11.03±1.93 ^a	14.40±6.71 ^a	NS
	R2**	28.88±9.76 ^a	20.88± 4.87 ^a	19.24±3.67 ^a	25.50±14.5 ^a	NS
	R3*	46.81±5.67 ^a	47.66±4.90 ^a	42.90±2.42 ^a	46.88±5.93 ^a	NS
	R4**	47.70±3.14 ^a	41.56±5.27 ^a	44.82±9.50 ^a	50.52±4.45 ^a	NS
Volume do tecido intersticial (%)	R1**	53.17±4.61 ^a	56.44±1.07 ^a	58.46±2.51 ^a	52.68±6.72 ^a	NS
	R2**	43.26±6.34 ^a	44.78±3.21 ^a	42.50±4.91 ^a	44.30±13.2 ^a	NS
	R3**	32.29±6.68 ^a	30.88±15.3 ^a	35.82±2.43 ^a	32.49±4.54 ^a	NS
	R4**	34.28±5.40 ^a	38.82±2.30 ^a	33.22±9.42 ^a	30.39±5.80 ^a	NS

Os dados foram expressões em Média ± SD. *ANOVA seguido pelo teste Tukey; **ANOVA seguido pelo teste Bonferroni. ^b: Significativamente diferente do controle.

Tabela 4 – Análise estereológica da região proximal da cabeça do epidídimo (R2) Volume do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$); Volume da cabeça do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$); Volume do ducto epididimário (%); Volume do epitélio do ducto epididimário (%); Volume do lúmen do ducto epididimário (%); Volume do tecido intersticial (%). C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle.

ANÁLISES ESTEREOLÓGICAS	Regiões	GRUPOS			P
		C56	F56	F56 + 30I	
Volume do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$)*		5.90 ± 0.35 ^a	4.70 ± 0.60 ^b	6.20 ± 0.10 ^a	<0.05
Volume da cabeça do epidídimo ($10^{-2} \mu\text{m}^3$)*		2.60 ± 0.20 ^a	2.00 ± 0.20 ^b	2.60 ± 0.50 ^a	<0.05
Volume do ducto epididimário (%)	R1*	49.32 ± 6.72 ^a	45.56 ± 1.07 ^a	42.72 ± 2.15 ^a	NS
	R2*	52.74 ± 9.16 ^a	54.44 ± 11.34 ^a	51.60 ± 10.07 ^a	<0.001
	R3*	69.54 ± 4.49 ^a	65.72 ± 4.30 ^a	66.18 ± 2.43 ^a	NS
	R4**	71.61 ± 5.81 ^a	63.18 ± 2.30 ^a	68.78 ± 9.42 ^a	NS
Volume do epitélio do ducto epididimário (%)	R1*	34.92 ± 5.57 ^a	27.72 ± 5.39 ^a	35.18 ± 5.21 ^a	NS
	R2**	30.10 ± 7.07 ^a	22.80 ± 6.30 ^b	30.10 ± 6.25 ^a	<0.05
	R3*	22.66 ± 3.54 ^a	21.21 ± 2.42 ^a	19.42 ± 3.25 ^a	NS
	R4*	21.09 ± 2.82 ^a	17.44 ± 1.68 ^a	20.58 ± 2.11 ^a	NS
Volume do lúmen do ducto epididimário (%)	R1*	14.40 ± 6.71 ^a	15.38 ± 3.46 ^a	12.08 ± 2.62 ^a	NS
	R2**	25.50 ± 14.50 ^a	33.90 ± 15.20 ^b	20.50 ± 7.20 ^a	<0.0001
	R3*	46.88 ± 5.93 ^a	42.71 ± 4.82 ^a	43.72 ± 10.77 ^a	NS
	R4*	50.52 ± 4.45 ^a	45.20 ± 11.03 ^a	51.90 ± 9.26 ^a	NS
Volume do tecido intersticial (%)	R1*	52.68 ± 6.72 ^a	58.90 ± 5.87 ^a	53.82 ± 4.80 ^a	NS
	R2**	44.30 ± 13.20 ^a	43.70 ± 14.10 ^b	49.40 ± 9.90 ^b	<0.0001
	R3*	32.49 ± 4.54 ^a	38.07 ± 2.99 ^a	37.28 ± 8.19 ^a	NS
	R4**	30.39 ± 5.80 ^a	39.36 ± 10.49 ^a	29.90 ± 8.71 ^a	NS

Os dados foram expressões em Média ± SD. *ANOVA seguido pelo teste Tukey; **ANOVA seguido pelo teste Bonferroni; b: Significativamente diferente do controle.

Tabela 5- Contagem de espermatozoides, integridade de membrana do espermatozoide e parâmetros de fertilidade. Produção diária de espermatozoides (x10⁶/testículo/dia); Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cabeça-corpo (dias); Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cauda (dias); Motilidade (%); Coloração Eosina Y (espermatozoides vivos %); HOS teste (espermatozoides vivos %); Taxa Gestacional (%), Índice de Fecundidade (%); Potencial de fertilidade (%); Perdas pré-Implantacionais (%) e Perdas Pós-Implantacionais (%). C15 (animais tratados durante 15 dias com solução diluente); F15 (animais tratados com finasterida durante 15 dias); F15 +30I (animais tratados com finasterida durante 15 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle; ^c estatisticamente diferente do controle e do tratado.

CONTAGEM E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES E PARÂMETROS DE FERTILIDADE	GRUPOS				P
	C15 (n=5)	F15 (n=5)	F15 + 301 (n=5)	C56 (n=5)	
Produção diária de espermatozoides (x10 ⁶ /testículo/dia)**	36.55±2.58 ^a	32.93±3.93 ^a	32.14±6.67 ^a	32.94±2.14 ^a	NS
Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cabeça-corpo (dias)**	2.95±0.36 ^a	2.52±1.78 ^a	2.36±0.68 ^a	3.27±0.33 ^a	NS
Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cauda (dias)*	5.62± 0.17 ^a	4.28± 1.00 ^a	4.52± 0.64 ^a	5.58± 0.78 ^a	NS
Motilidade (%)***	91.5±2.90 ^a	86.6±9.30 ^a	84.43±7.52 ^a	89.80±4.55 ^a	NS
Coloração Eosina Y (espermatozoides vivos %)***	86.00±1.77 ^a	84.00±4.61 ^a	77.40±4.19 ^b	89.00±1.77 ^a	<0.005
HOS teste (espermatozoides vivos %)***	75.80±6.76 ^a	68.00±4.24 ^b	69.00±3.24 ^b	78.80±6.76 ^a	<0.005
Taxa Gestacional (AN %)****	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	NS
Índice de fecundidade (AN %)***	100.00±0.00 ^a	92.30±7.60 ^a	87.30±12.70 ^a	100.00±0.00 ^a	NS
Potencial de fertilidade (AN %)***	100.00±0.00 ^a	89.50±7.45 ^a	92.50±6.79 ^a	100.00±0.00 ^a	NS
Perdas Pré-implantacionais (AN %)***	1.00±0.10 ^a	10.50±6.40 ^a	7.60±3.20 ^a	100.00±0.00 ^a	NS
Perdas Pos-implantacionais (AN %)***	3.00±1.50 ^a	11.50±5.60 ^a	13.25±6.07 ^a	0.00±0.00 ^a	NS

Os dados são expressos em Média ± SD. AN = Acasalamento Natural, NS = Não Significativo. *ANOVA seguido pelo teste de Tukey; **ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; ***Kruskal Wallis teste seguido pelo teste Dunn; ****q-quadrado teste com resultados expressos em porcentagem. ^b: Significativamente diferente do grupo controle.

Tabela 6- Contagem de espermatozoides, integridade de membrana do espermatozoide e parâmetros de fertilidade. Produção diária de espermatozoides (x10⁶/testículo/dia); Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cabeça-corpo (dias); Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cauda (dias); Motilidade (%); Coloração Eosina Y (espermatozoides vivos %); HOS teste (espermatozoides vivos %); Taxa Gestacional (%), Índice de Fecundidade (%); Potencial de fertilidade (%); Perdas pré-Implantacionais (%) e Perdas Pós-Implantacionais (%). C56 (animais tratados durante 56 dias com solução diluente); F56 (animais tratados com finasterida durante 56 dias); F56 +30I (animais tratados com finasterida durante 56 dias e interrupção do tratamento por 30 dias). Legenda: ^b estatisticamente diferente do controle; ^c estatisticamente diferente do controle e do tratado.

CONTAGEM E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES E PARÂMETROS DE FERTILIDADE	GRUPOS			P
	C56 (n=5)	F56 (n=5)	F56 + 30I (n=5)	
Produção diária de espermatozoides ($\times 10^6$ /testículo/dia) **	32.94 \pm 2.14 ^a	30.20 \pm 1.80 ^a	29.73 \pm 1.68 ^a	NS
Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cabeça-corpo (dias) *	3.27 \pm 0.34 ^a	1.13 \pm 0.28 ^b	2.60 \pm 0.34 ^c	<0.0001
Tempo de trânsito de espermatozoide no segmento da cauda (dias) *	5.58 \pm 0.78 ^a	3.81 \pm 1.04 ^b	4.00 \pm 0.45 ^b	<0.01
Motilidade (%)**	89.80 \pm 4.55 ^a	55.60 \pm 8.87 ^b	66.20 \pm 6.09 ^b	<0.001
Coloração Eosina Y (espermatozoides vivos %)*	89.00 \pm 1.77 ^a	46.00 \pm 4.61 ^b	73.40 \pm 3.19 ^c	<0.001
HOS teste (espermatozoides vivos %)*	78.80 \pm 6.76 ^a	50.00 \pm 4.24 ^b	62.00 \pm 3.24 ^c	<0.0001
Taxa Gestacional (AN %)**	100.00 ^a	60.00 ^a	40.00 ^a	NS
Índice de fecundidade (AN %)**	100.00 \pm 0.00 ^a	60.00 \pm 41.83 ^a	90.00 \pm 22.36 ^a	NS
Potencial de fertilidade (AN %)**	100.00 \pm 0.00 ^a	68.80 \pm 5.67 ^b	81.10 \pm 9.60 ^a	<0.01
Perdas Pré-implantacionais (AN %)**	0.00 \pm 0.00 ^a	30.26 \pm 12.40 ^a	19.05 \pm 13.8 ^a	NS
Perdas Pos-implantacionais (AN %)**	2.02 \pm 0.14 ^a	21.64 \pm 1.16 ^b	14.60 \pm 7.27 ^b	<0.001
Taxa Gestacional (IAI %)****	72.80 ^a	27.30 ^a	26.40 ^a	NS
Fertility potential (IAI %)**	45.07 \pm 9.35 ^a	26.46 \pm 8.50 ^b	26.34 \pm 6.02 ^b	<0.01

Os dados são expressos em Média \pm SD. IAI =Inseminação Artificial Intra útero, AN = Acasalamento Natural, NS = Não Significativo. * ANOVA seguido pelo teste de Tukey; **ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; ***Kruskal Wallis teste seguido pelo teste Dunn; ****q-quadrado teste com resultados expressos em porcentagem. ^b: Significativamente diferente do grupo controle., ^c: Significativamente diferente do grupo controle e tratado com finasterida.

7. MANUSCRITO (ACEITE PARA PUBLICAÇÃO EM ANEXO)

Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period.

Patrick Vianna Garcia, M.Sc.,^a; Mainara Ferreira Barbieri, B.Sc.,^a; Juliana Elaine Perobelli M.Sc.,^b; Sílvio Roberto Consonni, M.Sc.,^a; Suzana de Fátima Paccola Mesquita, Ph.D.,^c Wilma de Grava Kempinas, Ph.D.,^b and Luis Antonio Violin Pereira, M.D., Ph.D.^{a,d}

^a Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

^c Department of Biology, Institute of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^d To whom correspondence should be addressed: Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, SP, 13083-970, Brazil. E-mail: lviolin@unicamp.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate morphometric-stereological changes in the epididymal caput, sperm quality and fertility parameters in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period.

Design: Experimental study in a research laboratory.

Setting: Reproductive biology research laboratory.

Animal(s): Male and female Sprague Dawley rats.

Intervention(s): Treatment with finasteride (5 mg/kg/day) for 56 days followed by 30 days without treatment.

Main Outcome Measure(s): Serum hormone analyses, morphometric-stereological and ultrastructural evaluation of the epididymal caput, sperm transit time, natural mating, in utero insemination, sperm membrane integrity and fertility parameters.

Result(s): Serum DHT levels in the finasteride group decreased by ~40% compared to control rats. Ultrastructural analysis revealed significant reductions in several morphometric-stereological parameters of the epididymal caput. All parameters recovered significantly in the post-treatment period. There was no alteration in daily sperm production in the finasteride group. However, significant reductions in sperm transit time, motility, sperm membrane integrity and fertility parameters were observed in rats treated with finasteride.

Conclusion(s): Treatment with finasteride caused morphometric-stereological and functional changes in the epididymis and in sperm function that led to a reduction in fertility parameters. A 30-day post-treatment recovery period was insufficient to restore normal sperm motility, sperm transit time and some fertility parameters.

Keywords: Finasteride, epididymis, sperm and fertility.

INTRODUCTION

In men testosterone is produced by Leydig cells in the testis and converted into dihydrotestosterone (DHT) by the enzymatic action of 5 α -reductase in the skin, liver and urogenital tissues such as the prostate and epididymis. DHT participates in the differentiation of external male genitalia, the growth of reproductive organs and maintenance of secondary male sexual characteristics (1-3).

However, high DHT levels in adulthood can lead to various disorders such as androgenic alopecia (4-6). Androgenic alopecia, the most frequent type of hair loss, decreases the number of hair follicles and is one of the most common dermatological conditions to affect both genders (7-9); this condition affects about 30% of the male population above 30 years of age and about 50% of men above 50 years of age (10-12).

Many medications, such as finasteride, were produced to inhibit the action of 5 α -reductase (13). For the treatment of androgenic alopecia, finasteride (1 mg/day) reduces serum DHT levels by 60-70% and significantly attenuates hair loss (6, 8, 14). Indeed, the early use of finasteride by young people in an attempt to prevent and minimize androgenic alopecia has become common (12, 14). Many of the effects of finasteride are not fully understood, especially those related to organs of the male reproductive system such as the epididymis (15, 16). Approximately 75% of the detected proteins that participate in epididymal maturation are secreted by epithelial cells of the initial epididymal segment and caput and 48% of these proteins are dependent on DHT (17-20).

Studies in humans have reported cases of male infertility associated with the chronic use of finasteride at a dose of 1 mg/day (21). These studies reported a reduction in ejaculate volume, abnormal sperm concentration and motility (22), a reduction in sperm quality, sperm DNA damage (5, 6, 23) and persistent sexual dysfunction in young men (16). Moreover, in rats, finasteride significantly reduces the weight of the epididymis (13,

25-26), which results in significant phenotypic changes (27, 28) and reduces fertility parameters (29, 30). However, no investigation has examined whether changes in sperm quality are correlated with epididymal maturation.

The aim of this study was therefore to evaluate the morphometric-stereological and functional alterations in the epididymal caput, sperm quality and fertility parameters in rats treated with finasteride and those treated with this drug followed by a 30-day post-treatment recovery period.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male and female Sprague Dawley rats were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation at the State University of Campinas (CEMIB/UNICAMP) and were housed at $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12 h light/dark cycle with free access to pelleted rodent chow and water.

The male rats (60 days old) were randomly allocated to three groups: Group I (control group) consisted of rats that were treated by gavage with the vehicle solution of finasteride (0.5% aqueous methyl cellulose) for 56 days ($n = 25$), Group II (finasteride group) consisted of rats that were treated with finasteride (5 mg/kg/day) by gavage for 56 days ($n = 25$) and Group III (post-treatment group) consisted of rats that were treated with finasteride (5 mg/kg/day) by gavage for 56 days followed by a 30-day post-treatment recovery period ($n = 25$). Sixty three female rats were used to determine the fertility parameters after natural mating and in utero insemination.

This study was approved by an institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEUA/UNICAMP, protocol number 1622-1). The NIH *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* were followed.

Treatment

For experiments involving serum hormone and morphometric-stereological analyses finasteride was provided in pure form by Merck Sharp & Dohme Corp., USA. For other analyses, finasteride was purchased commercially upon presentation of a certificate of the manufacturer's quality. Finasteride was diluted in an aqueous solution containing 0.5% methyl cellulose (Sigma, USA) and administered once a day (5 mg/kg/day) by gavage (25, 26). This dose was chosen to mimic that used clinically to treat androgenic alopecia (in humans, this dose reduces the concentration of testosterone to 60-70% of the normal values). In the control and finasteride groups, all analyses were done 24 h after the final dose whereas in the post-treatment group all analyses were done 30 days after terminating the treatment.

Serum Hormone Analyses

Five rats per group were anesthetized and sacrificed by decapitation. An ACTIVE DSL testosterone kit (Diagnostic Systems Laboratories Inc., USA) was used to determine the serum testosterone levels and an ACTIVE DHT radioimmunoassay kit S/E DSL 96100 (without extraction) (Diagnostic Systems Laboratories) was used to determine the serum DHT levels. All of the samples were assayed in duplicate and the intra- and inter-assay coefficients of variation were, respectively, $\leq 8.5\%$ and $\leq 8.7\%$ for testosterone and $\leq 4.3\%$ and $\leq 6.4\%$ for DHT.

Tissue Collection and Processing for Morphometric-Stereological Analysis and Electron Microscopy

Five rats per group were weighed, anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde (Sigma) and 2% glutaraldehyde (Electron Microscope Science, USA) in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 (Electron Microscope Science) that contained 0.3% tannic acid (Riedel-de Haen, Germany). One epididymis from each animal was processed for morphometric-stereological analysis and the other was processed for transmission electron microscopy. The epididymides were weighed and the epididymal weight to body weight ratio and total epididymal volume (V) were determined as described elsewhere (31). The epididymides were then post-fixed with perfusion solution for 4 h.

The epididymal caput was sectioned stereomicroscopically (Leica Microsystems CMS GmbH, Leica, Germany) into four anatomically distinct regions based on connective tissue septation (32): region 1 (initial segment), region 2 (proximal caput), region 3 (medial caput) and region 4 (distal caput). These regions were used for morphometric-stereological and ultrastructural analyses (Figure 1A).

For morphometric-stereological analysis, the tissues were dehydrated in a graded ethanol series, embedded in historesin (Leica), sectioned (2 μm thick) and stained with hematoxylin-floxin (Sigma) (33). For transmission electron microscopy, the tissues were washed in 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide (Electron Microscope Science) for 1 h at 4°C. The samples were then dehydrated in a graded ethanol series and embedded in epoxy resin Epon 812 (Electron Microscope Science). Ultrathin sections were collected on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate (Electron Microscope Science) (34).

Morphometric-Stereological Analysis

Morphometric-stereological analysis was done on 30 random, histological cross-sections of the four regions of epididymal caput from each animal. The total duct diameter and area, luminal area and epithelial height and area were measured using a x10 objective lens connected to a computer image analysis system (Image Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc, USA). The total duct, epithelial, luminal and interstitial volumes were calculated (31).

Ultrastructural Analysis

Ultrastructural analysis was done by transmission electron microscopy (LEO 906, Electron Microscope Ltd., England). The ultrastructural analysis involved qualitatively observing the location, number and conservation of cytoplasmic organelles, as well as the presence of cell junctions and the integrity of the epithelial and stromal tissue.

Daily Sperm Production and Transit Time in the Epididymis

The right testis and epididymis were removed from five rats per group. The homogenization-resistant testicular spermatids (i.e., stage 19 of spermiogenesis) and sperm in the caput-corporis and cauda epididymis were counted as described elsewhere (35, 36). The daily sperm production in the testis (DSP) was estimated by dividing the number of spermatids at stage 19 by 6.1 (i.e., the number of days these spermatids are present in the seminiferous epithelium). The sperm transit time through the caput/corporis and cauda epididymis were determined by dividing the number of sperm in each portion by the DSP.

Sperm Motility and Assessment of Epididymal Necropermia

A suspension of sperm was prepared from sperm isolated from the distal cauda of the left epididymis from five rats per group. The number of sperm in a 2.5 µl aliquot of this suspension was counted and the sperm were classified as mobile or immobile (36). To assess epididymal necropermia 10 µl aliquots of sperm suspension were stained with Eosin-Y and also processed for the hypoosmotic solution (HOS)-test (37).

Natural Mating

Females (n=10 per group) in natural estrus were housed with male rats (n=5 per group). Vaginal smears were collected and the day of initial sperm detection was determined to be day zero of gestation (36, 38).

In Utero Insemination

Females in estrus were paired with sexually experienced, vasectomized males for 1 h. Receptive females were selected for insemination (n=11 females per group). Five male rats per group were used for insemination and sperm isolation as previously described (36, 39). Briefly, the sperm were released from the proximal epididymal cauda by nicking the duct and collecting the sperm in 2 ml of modified human tubular fluid (HTF) medium (Irvine Scientific). After a 10-fold dilution the sperm were counted and each uterine horn was injected with a volume containing 5×10^6 sperm (36, 37).

Fertility Parameters

On the 20th day of gestation, the females used for natural mating and in utero artificial insemination were euthanized. The number of corpora lutea, implants, resorptions and dead and live fetuses was recorded.

For females subjected to in utero insemination the gestation rate (number of pregnant females/number of inseminated females x 100) and fertility potential (implantation sites/corpora lutea x 100) were calculated as described elsewhere (36, 37). For females subjected to natural mating an additional three parameters were analyzed, namely, the fecundity index (number of males siring at least one viable fetus/number of males exposed for mating x 100) and the pre- (number of corpora lutea - number of implantation sites/number of corpora lutea x 100) and post-implantation losses (number of implantation sites – number of live fetus/number of implantation sites x 100) (31, 36, 37).

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean±SD. The normal distribution of the data was checked with the Kolmogorov-Smirnov test. One-way ANOVA followed by the Tukey or Bonferroni post-hoc test was used for parametric data, Kruskal Wallis analysis followed by Dunn's post-hoc test was used for nonparametric data and the chi-square test was used for categorical dependent variables. In all cases, a value of $p < 0.05$ indicated significance. All data analyses were done using GraphPad Prism software v.5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Serum Hormone Levels

The serum DHT levels in the finasteride group were significantly lower than in the control and post-treatment groups (the reduction was ~40% when compared to the control group) but there was no significant difference between the control and post-treatment groups (Figure 1B). There was a significant increase in the serum testosterone levels of the finasteride group compared to the control group but no significant difference between the control and post-treatment groups (Figure 1C).

Morphometric-Stereological Analyses

Morphometric-stereological analyses showed alterations only in the proximal epididymal caput (region 2) of the finasteride group when compared to the control and post-treatment groups.

The epididymal-to-body weight ratio, epithelial height (Figure 2 A-C) and epididymal and epithelial duct area were significantly lower in the finasteride group compared to the control and post-treatment groups. Additionally, there was a significant increase in the lumen epididymal duct area in the finasteride and post-treatment groups compared to the control group (Table 1).

The epididymal, epididymal caput and epithelial duct volumes were significantly lower in the finasteride group than in the control and post-treatment groups (Table 1). However, the lumen duct volume was significantly higher than in the control and post-treatment groups. There was no significant difference in the epididymal duct and interstitial tissue volumes (Table 1).

Ultrastructural Analyses

Ultrastructural analyses showed a reduction in epithelial height only in the proximal caput (region 2) in the finasteride group (Figure 2 D-F). There were no alterations in the location, number and conservation of cytoplasmic organelles (Figure 2 G-I) or in the integrity of the cell junction complex in the four regions of the epididymal caput in any of the groups (Figure 2 J-L).

Daily Sperm Production and Transit Time in the Epididymis

There was no significant difference in the daily sperm production in any of the groups (Table 2). However, there was a significant decrease in sperm transit time in the caput-corporis and cauda in the finasteride and post-treatment groups, indicating an increased rate of sperm passage in these segments. There was a significant difference in sperm transit time between the finasteride and post-treatment groups in the caput-corporis segment but no significant difference between finasteride and the post-treatment groups in the cauda segment (Table 2).

Sperm Motility

There was a significant reduction in sperm motility in the finasteride and post-treatment groups compared to the control group. However, there was no significant difference between the finasteride and post-treatment groups (Table 2).

Epididymal Necrospermia

Eosin-Y staining revealed a significant reduction in the percentage of live sperm in the finasteride and post-treatment groups compared to the control group. There was significant difference between the finasteride and post-treatment groups (Table 2).

Similarly, the HOS-test revealed a significant reduction in the percentage of live sperm in the finasteride and post-treatment groups compared to the control group. There was significant difference between the finasteride and post-treatment groups (Table 2).

Fertility Parameters in Natural Mating and In Utero Insemination

In natural mating, there was no significant difference in the gestational rate and fecundity index of all groups. There was a significant reduction (by ~32%) in the fertility potential of the finasteride group compared to the control group but there was no significant difference between the control and post-treatment groups (Table 2). There was no significant difference in the preimplantation loss among the groups although there was an evident increase in this rate in the finasteride and post-treatment groups. There was a significant increase in the post-implantation loss in the finasteride and post-treatment groups compared to the control group, but there was no significant difference between the finasteride and post- treatment groups (Table 2).

In utero insemination, there was no significant difference in the gestational rate among the groups, but there was an evident reduction in this rate in the finasteride and post-treatment groups. There was a significant reduction in the fertility potential of the finasteride and post-treatment groups compared to the control group but there was no significant difference between the finasteride and post-treatment groups (Table 2).

DISCUSSION

Many studies have shown that DHT is responsible for most androgen-stimulated responses in the epididymis and that this hormone has an important role in maintaining the epididymal microenvironment (40-44). In the present study, the percentage reduction in serum DHT in the finasteride group corresponded to that seen in men undergoing

androgenic alopecia treatment (i.e., DHT levels were reduced to 60-70% of the control) (8, 14). This finding indicated that the rats were exposed to the same DHT variations that occur in men who use finasteride chronically to treat hair loss (7, 12). In addition, the serum DHT and testosterone levels returned to normal 30 days after cessation of treatment, as previously described (6, 13, 41).

The variations in serum DHT levels were accompanied by a reduction in the epididymal-to-body weight ratio (24, 25, 45). However, the only region to show a marked reduction in the height, area and volume of the epididymal epithelium was only the proximal caput (region 2). The regional specificity of these morphometric-stereological alterations has been also observed in some gene expression profile studies. These regions appear to be functional units within the epididymis and more susceptible to changes in the microenvironment (46-49).

Many studies have shown that finasteride reduces prostate size by decreasing the intra-prostatic levels of DHT. This reduction involves a decrease in the stimulatory effect of this androgen on the cellular replacement of the secretory epithelium, which in turn diminishes the protective effect of these cells against apoptosis and results in a progressive decrease in the functionality of epithelial cells and an increase in the rate of cell death (49). Our morphometric-stereological and ultrastructural results on the epididymis caput agree with the alterations seen in the prostate upon DHT depletion.

The reduction in serum DHT levels and consequent decrease of this hormone in the intra-epididymal compartment in the finasteride group could explain the epididymal structural alterations and the decrease in sperm transit time, despite the unaltered daily sperm production in any of the groups studied. Local factors such as endothelin-1 (50), cGMP, androgens (51, 52) and prostaglandins (53) can affect peristalsis in the epididymal duct by modulating the activity of epididymal muscle.

Sympathetic innervation controls smooth muscle contractions in all regions of the epididymal duct and testosterone, estradiol and DHT can interfere with this sympathetic control to modulate epididymal contractile activity, thereby influencing sperm transit time through this organ (36, 54, 55). The acceleration of sperm passage in the epididymal duct, such as seen in the finasteride and post-treatment groups, reduces the time that sperm are available for epididymal maturation and interferes with sperm quality and some fertility parameters (31, 37, 56).

The efficiency of implantation, i.e., fertility potential, was clearly compromised in rats treated with finasteride and may indicate sperm genotoxicity or a problem in sperm recognition by the oocyte. A decrease in fertility potential is frequently seen as an increase in postimplantation loss (57). Although there were no significant differences in the preimplantation loss, gestational rate and fecundity index of the finasteride and post-treatment groups these data should nevertheless be considered when evaluating patterns of fertility.

Changes in the fertility parameters of the finasteride and post-treatment groups cannot be explained solely by a decrease in secretion by the coagulation gland and the absence of vaginal plug formation (29, 30), particularly since in *in utero* insemination all of the females that were previously mated with vasectomized males formed vaginal plugs. Even in this condition, the fertility potential in the finasteride and post-treatment groups was lower than in the controls. Since rats produce and ejaculate an excess of qualitatively normal sperm, insemination *in utero* of a fixed, critical number of sperm can increase the probability of detecting a decrease in sperm quality in this species (56).

The changes in fertility described here agree with the recent finding that human male infertility and an increase in pregnancy loss may be associated with the continuous administration of small doses of finasteride, possibly because of a negative influence on

sperm quality and DNA integrity (23). In addition, the interruption of treatment with finasteride does not ensure immediate recovery from the side effects of this compound. Although the cessation of treatment with finasteride immediately increases semen volume the sperm concentration remains below normal for up to four months after treatment (6). A similar improvement in semen volume has been observed in two other cases of azoospermia and severe oligospermia six months after stopping treatment with finasteride (5).

Our findings indicate that the finasteride-stimulated acceleration of sperm transport through the epididymis compromises sperm maturation, thereby affecting sperm motility, sperm membrane intactness and fertility potential, and that a 30-day post-treatment recovery period is insufficient for the restoration of all parameters. Further studies are required to establish the ideal post-treatment recovery period for the restoration of fertility parameters, and to determine whether these parameters can indeed be fully restored. Our findings also suggest that young men who use finasteride as a preventive and palliative method against androgenic alopecia may be at risk of impaired fertility.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Merck Sharp & Dohme Corp. for donating finasteride for the morphometric-stereological and hormonal analyses. Garcia PV was supported by a fellowship from National Counsel of Technological and Scientific Development (Cnpq).

REFERENCES

- 1- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974; 186: 1213-1215.
- 2- Amory JK, Wang C, Swerdloff RS, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ, et al. The effect of 5 α -reductase inhibition with dutasteride and finasteride on semen parameters and serum hormones in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1659-1665.
- 3- Hsieh JT, Chen SC, Yu HJ, Chang HC. Finasteride upregulates expression of androgen receptor in hyperplastic prostate and LnCap cells: implications for chemoprevention of prostate cancer. *Prostate* 2011; 12: 1-7.
- 4- Geller J, Albert J, Lopez D, Geller S, Niwayama G. Comparison of androgen metabolites in benign prostatic hypertrophy (BPH) and normal prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 43: 486-488.
- 5- Liu KE, Binsaleh S, Lo KC, Jarvi K. Propecia induced spermatogenic failure: a report of two cases. *Fertil Steril* 2008; 90: 849-851.
- 6- Chiba K, Yamaguchi K, Li F, Ando M, Fujisawa M. Finasteride associated male infertility. *Fertil Steril* 2011; 5: 1786. e 9-11.
- 7- Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand K, Gorin-Meyer RE, et al. A new look the 5 α -reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev* 2006; 12: 53-76.
- 8- Camacho FM, Hernandez MJG, Fernandez-Crehuet JL. Values of hormonal levels in patients with male androgenetic alopecia treated with finasteride: better response in patients under 26 years old. *Br J Dermatol* 2008; 158: 1121-1124.
- 9- Schweiger ES, Boychenko O, Bernstein RM. Update on the pathogenesis, genetics and medical treatment of patterned hair loss. *J Drugs Dermatol* 2010; 11: 1412-1419.

- 10- Bienová M, Kucerová R, Fiuráková M, Hadjúch M, Kolá Z. Androgenic alopecia and current methods of treatment. *Acta Dermatoven APA* 2005; 14: 5-8.
- 11- Tosti A, Duque-Estrada B, Murrel DF. Alopecia in epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010; 28: 165-169.
- 12- Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G. Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. *Arch Dermatol* 2010; 146: 1141-1150.
- 13- Bilinska B, Wiszniewska B, Kosimak-Kamysz K, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Hejmej A, et al. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reprod Biol* 2007; 6: 43-58.
- 14- Camacho FM. Prostate specific antigen levels as hyperandrogenism marker in women. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 221-223.
- 15- Traish AM, Hassani J, Guay AT, Zitzmann M, Hansen ML. Adverse side effects of 5 α -reductase inhibitors therapy: persistent diminished libido and erectile dysfunction and depression in a subset of patients. *J Sex Med* 2011; 3: 872-884.
- 16- Irwig MS, Kolukula S. Persistent sexual side effects of finasteride for male pattern hair loss. *J Sex Med* 2011; 6: 1747-1753.
- 17- Syntin P, Dacheux JL, Dacheux F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol Reprod* 1999; 61: 1622-1635.
- 18- Robaire B, Jégou B, Pineau C, Saez J. Testis, epididymis and technologies in the year 2000. In: Ernst Schering Research Foundation Workshop Supplement 6. Springer 2000.
- 19- Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 1-6.
- 20- Dacheux JL, Castella S, Gatti LJ, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis. *Theriogenology* 2005; 63: 319-341.

- 21- Overstreet JW, Fuh VL, Gould J, Howards SS, Lieber MM, Hellstrom W, et al. Chronic treatment with finasteride daily does not affect spermatogenesis or semen production in young men. *J Urol* 1999; 162: 1295-1300.
- 22- Glina S, Neves PA, Saad R, Netto NR Jr, Soares JB, Galuppo AG. Finasteride-associated male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2004; 4: 203-205.
- 23- Tu HY, Zini A. Finasteride-induced secondary infertility associated with sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2011; 6: 2125.
- 24- Shao TC, Kong A, Marafelia P, Cunnighan GR. Effects of finasterida on the rat ventral prostate. *J Androl* 1993; 14:79-86.
- 25- Cayatte C, Pons C, Guignon JM, Pizzol J, Elies L, Kennel P, et al. Protein profiling of rat ventral prostate following chronic finasteride administration. *Mol Cell Proteomic* 2006; 11: 2031-2043.
- 26- Tindall DJ, Rittmaster RS. The rationale for inhibiting 5alpha-reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. *J Urol* 2008; 4:1235-1242.
- 27- Bilinska B. LH as a modular of cytoskeleton arrangement and steroidogenic function in Leydig cells in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 1992; 30: 35-38.
- 28- Carballada R, Saling PM. Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 171-181.
- 29- Wise LD, Minsker DH, Cukierski MA, Clark RL, Prahalada S, Antonello JM, et al. Reversible decreases of fertility in male Sprague-Dawley rats treated orally with finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor. *Reprod Toxicol* 1991; 5: 337-346.
- 30- Cukierski MA, Sina JL, Prahalada S, Wise LD, Antonello JM, Macdonald JS, et al. Decreased fertility in male rats administered the 5 α reductase inhibitor, finasteride, is due to deficits in copulatory plug formation. *Reprod Toxicol* 1991; 5: 353-362.

- 31- Garcia PV, Arrotéia KF, Joazeiro PP, Mesquita SFP, Kempinas WG, Pereira LA. Orchidopexy restores morphometric-stereologic changes in the caput epididymis and daily sperm production in cryptorchidic mice, although sperm transit time and fertility parameters remain impaired. *Fertil Steril* 2011; 3: 739-744.
- 32- Turner TT, Jonhston DS, Jelinsky SA, Tomsig JL, Finger JN. Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose. *Asian J Androl* 2007; 9: 565-573.
- 33- Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol* 1976; 51: 71-97.
- 34- Moraes SG, Campos Pinheiro M, Toledo OM, Joazeiro PP. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. *Cell Tissue Res* 2004; 315: 223-231.
- 35- Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 103-107.
- 36- Fernandez CD, Porto EM, Arena AC, Kempinas WG. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl* 2008; 4: 427-437.
- 37- Kermani-Alghoraishi M, Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 153: 52-55.
- 38- Fernandes GSA, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007, 23: 106-112.

- 39- Klinefelter GR, Laskey JW, Kelce WR, Ferrell J, Roberts NL, Suarez JD, et al. Chloroethylmethanesulfonate-induced effects on the epididymis seem unrelated to altered Leydig cell function. *Biol Reprod* 1994; 1: 82-91.
- 40- Robaire B, Hamzeh M. Androgen action in the epididymis. *J Androl* 2011; 32: 592-599.
- 41- Steers W. 5 α reductase activity in the prostate. *Urology* 2001; 58: 17-24.
- 42- Robaire B, Henderson NA. Action of 5 α reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 250: 190-195.
- 43- Rosen HN, Tollin S, Balena R., Middlebrooks VL, Moses AC, Yamamoto M, et al. Bone density is normal in male rats treated with finasteride. *Endocrinology* 1995; 136: 1381-1387.
- 44 - Corradi LS, Campos SGP, Santos FCA, Vilamoior PSL, Goes RM, Taboga SR. Long-term inhibition of 5 alpha-reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. *Int J Exp Path* 2009; 90: 79-94.
- 45- Imperato-McGinley J, Sanches RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED. Comparison of the effects of the 5 α reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose response studies. *Endocrinology* 1992; 131: 1149-1156.
- 46- Kirchhoff C. The dog as a model to study human epididymal function at the molecular level. *Mol Human Reprod* 2002; 8:695-701.
- 47- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP. Sonic hedgehog pathway genes are expressed and transcribed in the adult mouse epididymis. *J Androl* 2004; 25: 514-522.
- 48- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, Dicandoloro P, Wilson E, Kopf GS, et al. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 2005; 74: 404-413.

- 49- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JL, Solarz MK, Wilson E, et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segments gene expression in rat and mouse epididymis. *Biol Reprod* 2007; 76: 561-570.
- 50- Peri A, Fantoni G, Granchi S, Vannelli GB, Barni T, Amerini S, et al. Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. *Steroids* 1998; 63: 294-298.
- 51- Da Silva E, Souza MC, Gimeno MF, Gimeno AL. Spontaneous and testosterone-induced motility of isolated guinea-pig cauda epididymis. *Experientia* 1974; 30: 1063-1065.
- 52- Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R. Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cGMP-dependent pathways. *Endocrinology* 2006; 147: 2051-2062.
- 53- Cosentino MJ, Takihara H, Burhop JW, Cockett ATK. Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *J Androl* 1984; 5: 216-222.
- 54- Ricker DD. The autonomic innervations of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* 1998; 19: 1-4.
- 55- Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, et al. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod* 1998; 59: 890-896.
- 56- Klinefelter GR. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT, eds. *The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2002: 353-369.
- 57- Perobelli JE, Alves TR, de Toledo FC, Fernandez CD, Anselmo-Franci JA, Klinefelter GR, Kempinas WD. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. *Reprod Toxicol*, in Press, DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.12.011

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1: Schematic epididymis: segmentation for morphometric-stereological analysis (A) and serum DHT (B) and testosterone (C) measurements in the control, finasteride and after a 30 days post-treatment groups. ANOVA followed by the Tukey test to serum DHT measurements and ANOVA followed by the Bonferroni test to testosterone measurements. b: Significantly different from the control group, $p < 0.01$.

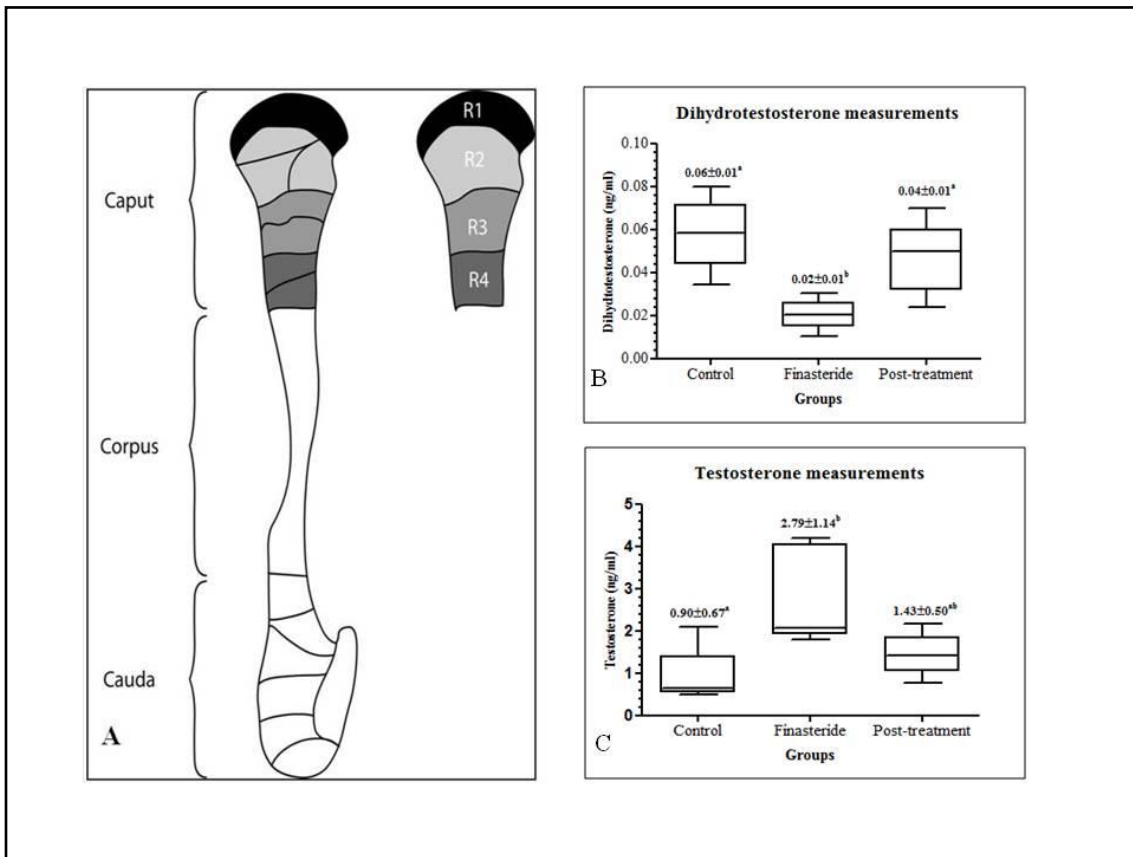


Figure 2: Photomicrographs of region 2 (proximal caput) of the epididymal caput (A-C) and transmission electron micrographs of region 2 of the epididymal caput (D-L). Control group (A, D, G, J), finasteride group (B, E, H, K) and after a 30 days post-treatment group (C, F, I, L). Note the reduction in the height of the secretory epithelium in the finasteride group (B, E) compared to the control (A,D) and after a 30 days post-treatment (C, F) groups, and the presence of basal (b) and principal (p) cells and stereocilia (s) in all groups (D-F). Cytoplasmic organelles (G-I) were apparent: Golgi complex- Gc, mitochondria - M, rough endoplasmic reticulum - Rer (D-F) and cell junction complex - Cj, in all groups (J-L). Scale bars: 10 μm (A-C), 4 μm (D-F), 1500 nm (G-I) and 500 nm (J-L).

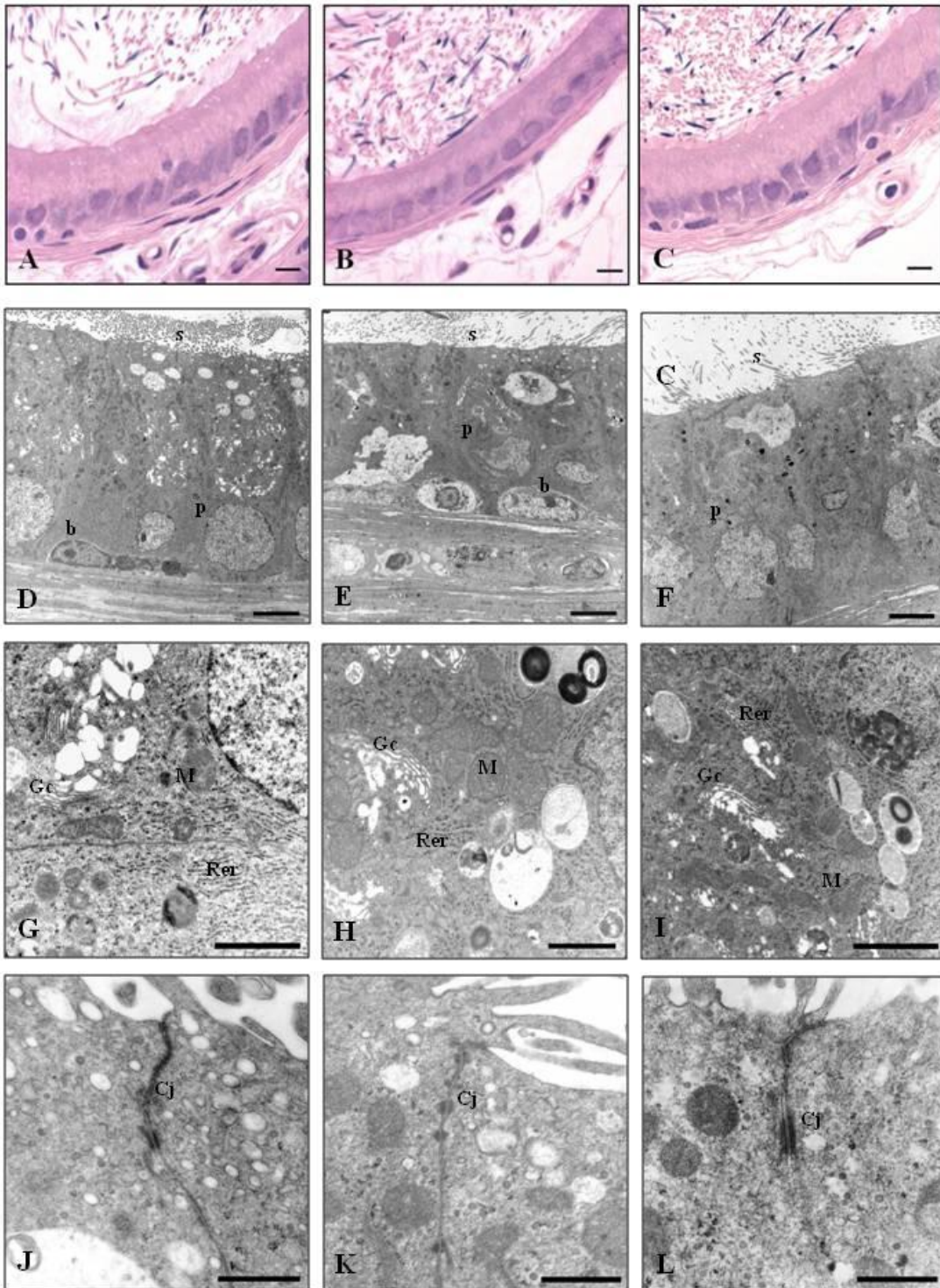


Table 1: Morphometric-stereological analysis of the control, finasteride and after 30 days post-treatment groups.

TABLE 1	GROUPS			P
	Control (n=5)	Finasteride (n=5)	Post-treatment (n=5)	
Epididymal weight/body weight ratio (mg/mg)*	1.52±0.08 ^a	1.20±0.16 ^b	1.58±0.23 ^a	<0.05
Epithelial height (log μm)*	1.54±0.07 ^a	1.49±0.07 ^b	1.57±0.07 ^a	<0.001
Epididymal duct area (log μm ²)*	4.42 ±0.12 ^a	4.36±0.13 ^b	4.44±0.08 ^a	<0.05
Epithelial duct area (log μm ²)**	4.27±0.14 ^a	4.05±0.37 ^b	4.23±0.10 ^a	<0.0001
Luminal duct area (log μm ²)**	3.83±0.21 ^a	3.99±0.13 ^b	3.99±0.13 ^b	<0.0001
Epididymal volume (10 ⁻² μm ³)*	5.90 ±0.35 ^a	4.70 ±0.60 ^b	6.20 ±0.10 ^a	<0.05
Epididymal caput volume (10 ⁻² μm ³)*	2.60 ±0.20 ^a	2.00 ±0.20 ^b	2.60±0.50 ^a	<0.05
Epididymal duct volume (%)*	52.74 ±9.16 ^a	54.44±11.34 ^a	51.60 ±10.07 ^a	NS
Epithelial duct volume (%)***	30.10 ±7.07 ^a	22.80 ±6.30 ^b	30.10 ±6.25 ^a	<0.0001
Luminal duct volume (%)**	25.50 ±14.50 ^a	33.90 ±15.20 ^b	20.50 ±7.20 ^a	<0.0001
Interstitial tissue volume (%)**	44.30 ±13.20 ^a	43.70 ±14.10 ^a	49.40 ±9.90 ^a	NS

The data are expressed as the mean±SD. The epithelial height, epididymis duct area, luminal duct area, epididymal duct volume, epithelial duct volume, luminal duct volume and interstitial tissue volume were calculated for region 2 (proximal caput) of the epididymal caput. NS= not significant. *ANOVA followed by the Tukey test; **ANOVA followed by the Bonferroni test; ***Kruskal Wallis test followed by Dunn's test.
b: Significantly different from the control group

Table 2: Sperm counts, motility, epididymal necropermia and fertility parameters in natural mating and in utero insemination in the control, finasteride and after a 30 days post-treatment groups.

TABLE 2				
	GROUPS			
	Control (n=5)	Finasteride (n=5)	Post-treatment (n=5)	p
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day) **	32.94±2.14 ^a	30.20±1.80 ^a	29.73±1.68 ^a	NS
Sperm transit time in the caput/corpus epididymis (days)*	3.27±0.34 ^a	1.13±0.28 ^b	2.60±0.34 ^c	<0.0001
Sperm transit time in the cauda epididymis (days)*	5.58±0.78 ^a	3.81±1.04 ^b	4.00±0.45 ^b	<0.01
Motility (%)**	89.80±4.55 ^a	55.60±8.87 ^b	66.20±6.09 ^b	<0.001
Eosin Y staining (live sperm %)*	89.00±1.77 ^a	46.00±4.61 ^b	73.40±3.19 ^c	<0.001
HOS test (live sperm %)*	78.80±6.76 ^a	50.00±4.24 ^b	62.00±3.24 ^c	<0.0001
Gestational rate (NM %)**	100.00	60.00	40.00	NS
Fecundity index (NM %)**	100.00±0.00 ^a	60.00±41.83 ^a	90.00±22.36 ^a	NS
Fertility potential (NM %)**	100.00±0.00 ^a	68.80±5.67 ^b	81.10±9.60 ^a	<0.01
Preimplantation loss (NM %)**	0.00±0.00 ^a	30.26±12.40 ^a	19.05±13.8 ^a	NS
Postimplantation loss (NM %)**	2.02±0.14 ^a	21.64±1.16 ^b	14.60±7.27 ^b	<0.001
Gestational rate (IUI %)**	72.80	27.30	26.40	NS
Fertility potential (IUI %)**	45.07±9.35 ^a	26.46±8.50 ^b	26.34±6.02 ^b	<0.01
<p>The data are expressed as the mean±SD. IUI = In utero insemination, NM = natural mating, NS = not significant. *ANOVA followed by the Tukey test; **ANOVA followed by the Bonferroni test; ***Kruskal Wallis test followed by Dunn's test; ****Chi-square test with results expressed in percentage. b: Significantly different from the control group. c: Significantly different from the control and finasteride groups.</p>				

8- CONCLUSÕES

- O tratamento de ratos adultos Sprague Dawley com 5 mg/kg/dia de finasterida durante 15 e 56 dias mostra significativo efeito na redução dos níveis séricos de DHT.
- A dose de 5 mg/kg/dia de finasterida efetivamente mimetizou a porcentagem de redução dos níveis séricos de DHT observados no tratamento da alopecia androgênica (1 mg/dia de finasterida) em humanos.
- As análises morfométricas e estereológicas do epidídimo dos animais tratados com finasterida por 56 dias (tratamento crônico) mostraram redução significativa, especificamente na região proximal da cabeça do epidídimo (R2).
- Os animais submetidos ao tratamento crônico com finasterida durante 56 dias seguido pela interrupção do tratamento por 30 dias mostraram recuperação significativa dos parâmetros morfométricos e estereológicos.
- As análises ultraestruturais corroboram com as análises morfométricas e estereológicas na região proximal da cabeça do epidídimo (R2).
- Nos animais tratados cronicamente com finasterida houve um aumento da velocidade de passagem dos espermatozoides no epidídimo diminuindo o tempo de trânsito dos espermatozoides.
- Em decorrência da diminuição do tempo de trânsito houve diminuição na motilidade e integridade da membrana dos espermatozoides culminando com redução de alguns parâmetros de fertilidade.
- O período de 30 dias de interrupção de tratamento não foi suficiente para a recuperação desses parâmetros. Sugerindo a necessidade de um tempo maior de recuperação ou esses parâmetros não são recuperáveis.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO.

Abou-Haila A, Fain-Maurel MA. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. **Anat. Rec.**, 209: 197–208, 1984.

Amory JK, Wang C, Swerdloff RS, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Walker SE, Haberer LJ, Clark RV.. The effect of 5 α reductase inhibition with dutasteride and finasterida on semen parameters and serum hormones in health men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 92: 1659-1665, 2007.

Araujo AB, Wittert GA. Endocrinology of the aging male. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, 2: 313-319, 2011.

Bhasin S. Approach to the infertile man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 92: 1995-2004, 2007.

Bienová M, Kucerová R, Fiurásková M, Hajdúch M, Kolá Z. Androgenic alopecia and current methods of treatment. **Acta Dermatoven. APA.**, 14: 05-08, 2005.

Bilinska B. LH as a modular of cytoskeleton arrangement and steroidogenic function in Leydig cells in vitro. **Folia Histochem. Cytobiol.**, 30: 35-38, 1992.

Bilinska B, Wiszniewska B, Kosimak-Kamysz K, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Hejmej A, Sadowska J, Marchlewicz M, Kolasa A, WendaNDA-Rosewicka L. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. **Reprod. Biol.**, 6: 43-58, 2007.

Boué F, Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. **Biol. Reprod.**, 54:1018-24. 1996.

- Borst SE, Jun LK, Conoven CF. Inhibition of 5 alpha reductase blocks prostate effects of testosterone without blocking anabolic effects. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 28: 222-227, 2005.
- Carballada R, Saling PM. Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. **J. Reprod. Fertil.**, 110: 171-181, 1997.
- Camacho FM, Hernandez MJG, Fernandez-Crehuet JL. Values of hormonal levels in the patients with male androgenetic alopecia treated with finasterida: better response in patients under 26 years old. **Brit. J. Dermatol.**, 158: 1121-1124, 2008.
- Camacho FM. Prostate specific antigen levels as hyperandrogenism marker in women. **J. Eur. Acad.Dermatol.Venereol.**, 23: 221-223, 2009.
- Cayette C, Pons C, Guigonis JM, Pizzol J, Elies L, Kennel P, Rouquié D, Bars R, Rossi B, Samson M. Protein profiling of rat ventral prostate following chronic finasteride administration. **Mol. Cell. Proteomic.**, 5.11: 2031-2043, 2006.
- Chiba K, Yamaguchi K, Li F, Ando M, Fujisawa M. Finasteride associated male infertility. **Fertil. Steril.**, 5: 1786. E 9-11.
- Cohen DJ, Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Muñoz MW, Battistone MA, Cuasnicú PS. Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. **J. Androl.**, 32: 672-678, 2011.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. **H. Reprod. Update.**, 15: 213-227, 2009.

- Corradil LS, Campos SGP, Santos FCA, Vilamaior PSL, Goes RM, Taboga SR. Long-term inhibition of 5 alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. **Int. J. Exp. Path.**, 90: 79-94, 2009.
- Cosentino MJ, Takihara H, Burhop JW, Cockett ATK. Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. **J. Androl.**; 5:216– 222, 1984.
- Crawford ED, Andriole GL, Marberg M, Rittmaster RS. Reduction in the risk of prostate cancer: Future directions after the prostate cancer prevention trial. **Urology.**, 75: 502-509, 2009.
- Cukierski MA, Sina JL, Prahalada S, Wise LD, Antonello JM, Macdonald JS, Robertson RT. Decreased fertility in male rats administered the 5 α reductase inhibitor, finasteride, is due to deficits in copulatory plug formation. **Reprod. Toxicol.**, 5: 353-362, 1991.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti LJ, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis. **Theriogenology.**, 63: 319-341, 2005.
- Da Silva E, Souza MC, Gimeno MF, Gimeno AL. Spontaneous and testosterone-induced motility of isolated guinea-pig cauda epididymis. **Experientia.**, 30: 1063–1065, 1974.
- Delella FK, Justulin LA, Felisbino SL. Finasteride treatments alter MMP 2 and 9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. **Int. J. Androl.**, 33:114-122, 2010.

- Dubé E, Hermo L, Chan PTK, Cyr DG. Alterations in gene expression in the caput epididymis of nonobstructive azoospermic men. **Biol. Reprod.**, 78: 342-351, 2008.
- Ellis JA , Panagiotopoulos S, Akdeniz A, Jerums G, Harrap SB. Androgenic correlates of genetic variation in the gene encoding 5 alfa reductase type I. **J. Hum. Genet.**, 50: 534-537, 2005.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. **Eur.J.Cancer.**, 46: 765-781, 2010.
- Fernandes GSA, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reprod. Toxicol.**, 23: 106-112, 2007.
- Fernandez CDB, Porto EM, Arena AC, Kempinas WDG. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **Int. J. Androl.**, 31: 427-437, 2007.
- Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand K, Gorin-Meyer RE, Wiren KM. A New Look the 5á-Reductase Inhibitor Finasteride. **CNS Drug. Review.**, 12: 53-76, 2006.
- Geller J, Albert J, Lopez D, Geller S, Niwayama G. Comparison of androgen metabolites in benign prostatic hypertrophy (BPH) and normal prostate. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 43: 486–488, 1976.

George FW. Androgen metabolism in the prostate of the finasterida treated, adult rat: A possible explanation for the differential action of testosterone and 5 α dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract. **Endocrinology.**, 138: 871-877, 2007.

Gisleskog PO, Hermann D, Hammarlund-Udenaes M, Karlsson MO. A model for the turnover of dihydro-testosterone in the presence of the irreversible 5 α -reductase inhibitors G1198745 and finasteride. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 64: 636–647, 1998.

Gormley GJ. Finasteride: A clinical review. **Biomed. Pharmacol. Ther.**, 49: 319–24, 1995.

Greenlee RT, Hill-Harmon M, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. **CA Cancer. J. Clin.**, 51: 15-36, 2001.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg b, Sorensen FB, Vesterby AI. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS.**, 96: 379–94, 1988.

Hann MC, Lau PE, Tempest HG. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? **Asian J. Androl.**, 13: 212-218, 2011.

Hermo L; Chong DL; Moffatt P; Sly WS; Waheed A, Smith CE. Region and cell – specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII and XIV in the adult rat epididymis. **J. Histochem. Cytochem.**, 53: 699-713, 2005.

Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. **Int. J. Androl.**, 27: 335-342, 2004.

Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology, Springer-Verlag New York Inc. In: Association with BIOS Scientific Publishers Ltda, p.246, 1998.

Hsieh JT, Chen SC, Yu HJ, Chang HC. Finasteride upregulates expression of androgen receptor in hyperplastic prostate and LnCap cells: Implications for chemoprevention of prostate cancer. **Prostate.**, 71: 1115-1121, 2011.

Imperato-Mcginley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5-alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. **Science.**, 186: 1213-1215, 1974.

Imperato-Mcginley J, Sanches RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED. Comparison of the effects of the 5 α reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: Dose response studies. **Endocrinology.**, 131: 1149-1156, 1992.

Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JL, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS. The rat epididymal transcriptome: Comparison of segments gene expression in rat and mouse epididymis. **Biol. Reprod.**, 76: 561-570, 2007.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer. J. Clin.**, 55: 10-30, 2005.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics 2010. **CA Cancer. J.Clin.**, 60: 277-300, 2010.

Jervis KM, Robaire B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, 65: 696-703, 2001.

Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, 70: 219-228, 1984.

Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, Dicandoloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT. The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. **Biol. Reprod.**, 74: 404-413, 2005.

Jin Y, Penning TM. Steroid 5 α reductase and 3 α hydroxysteroid dehydrogenases: Key enzymes in androgen metabolism. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, 15: 79-94, 2001.

Johnston DS, Turner TT, Finger JN, Owtscharuk TL, Kopf GS, Jelinsky SA. Identification of epididymis-specific transcripts in the mouse and rat by transcriptional profiling. **Asian J. Androl.**, 9: 522-527, 2007.

Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. **Biol. Reprod.**; 59: 890– 896, 1998.

Kermani-Algoraishi M, Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on the sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 153: 52-55, 2010.

Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, Klinefelter GR. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. **Biol. Reprod.**, 59: 897-904, 1998b.

Kermani-Alghoraishi M, Mortaza Anvari M, Talebi AR, Amini-Rad O, Ghahramani R, Miresmaili SM. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. **Eur. J. Obstet. Gynecol.**, 153: 52-55, 2010.

Kirchhoff C. The dog as a model to study human epididymal function at the molecular level. **Mol. Human. Reprod.**; 8: 695-701, 2002.

Klinefelter GR, Laskey JW, Kelce WR, Ferrell J, Roberts NL, Suarez JD, Slott V. Chloroethylmethanesulfonate- induced effects on the epididymis seem unrelated to altered leydig cell function. **Biol. Reprod.**, 51: 82-91, 1994.

Klinefelter GR. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT (Eds). *The Epididymis - From Molecules to Clinical Practice* (eds). New York, Kluwer Academic/Plenum Publisher, p. 353-369, 2002.

Kolasa A, Marchlewicz M, Adler G, Ciechanowicz A, Glabowski W, Wiszniewska B. Expression of E-SOD, GPX5 mRNAs and immunoexpression of Cu/ZnSOD in epididymal epithelial cells finasteride treated rats. **Andrologia.**, 40: 303-311, 2008.

Lacerda CAM. Stereological Tools in biomedical research. **Acad. Braz. Sc.**, 75: 469-486, 2003.

Lebdai S, Bigot P, Azzouzi AR. High-grade prostate cancer and finasteride. **BJUI.**, 105: 456-459, 2009.

Ley ZM, Mishra S, Ponnuru P., Li X, Yang ZW, Rao CHV. Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. **Biol. Reprod.**, 71: 1605-1613, 2004.

Liu KE, Binsaleh S, Lo KC, Jarvi K. Propecia induced spermatogenic failure: a report of two cases. **Fertil. Steril.**, 90: 849-851, 2008.

Madesbacher S, Aalcaraz A, Emberton M, Hammerer P, Ponholzer A, Schroder FH, Tubaro A. The influence of family history on prostate cancer risk: implications of clinical management. **BJU. Int.**, 26: 1-6, 2010.

Marchlewicz M, Wiszniewska B, Kurzawa R, Wendarosewiczka L. Possible involvement of microtubules and microfilaments of the epididymal cell in 17 β - estradiol synthesis. **Folia. Histochem. Cytobiol.**, 42: 19-27, 2004.

McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GLJR, Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, Mcvary KT, Nyberg LMJR, Clarke HS, et al. The long term effect of Doxazosin, Finasteride and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. **N. Engl J. Med.**, 349: 3287-3298, 2003.

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. **Recent. Prog. Horm. Res.**, 57: 149-179, 2002.

Meistrich ML, Hughes TH, Bruce WR. Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. **Nature**, 258: 145-147, 1975.

- Mella JM, Perret MC, Manzotti M, Catalano HN, Guyatt G. Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. **Arch. Dermatol.**, 146: 1141-1150, 2010.
- Mendis-Handagama SM. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. **Histol. Histopathol.**, 12: 869-882, 1997.
- Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R. Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cGMP-dependent pathways. **Endocrinology.**; 147: 2051-2062, 2006.
- Morgan AM, El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. **Pharmacol. Res.**, 47: 75-85, 2003.
- Motrich RD, Ponce AA, Rivero V. Effect of tamoxifen on the semen quality and fertility of the male rat. **Reprod. Biol.**, 88: 452-461, 2007.
- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. **Cardiovasc. Pathol.**, 19: 65-82, 2010.
- O'Hara L, Welsh M, Saunders PTK, Smith LB. Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. **Endocrinology.**, 152: 718-729, 2011.
- Oliva SU, Messias AG, Silva DAF, Pereira COM, Gerardin DCC, Kempinas WG. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. **Reprod. Toxicol.**, 22: 599-605, 2006.

- Peri A, Fantoni G, Granchi S, Vannelli GB, Barni T, Amerini S, Pupilli C, Barbagli G, Serio M, Maggi M, Forti G. Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. **Steroids.**; 63: 294-298, 1998.
- Perobelli JE, Alves TR, de Toledo FC, Fernandez CD, Anselmo-Franci JA, Klinefelter GR, Kempinas WD. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reprod Toxicol**, in Press, DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.12.011
- Pinheiro M.C, Mora O.A, Caldini E.G, Battlehner C.N, Joazeiro P.P, Toledo O.M. Ultrastructural, immunohistochemistry and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. **Cell. Biol. Int.**, 29: 458-471, 2005.
- Piffer RC, Pereira OCM. Reproductive aspects in female rats exposed prenatally to hydrocortisone. *Comparative. Bioch. Phys.*, 139: 11-16, 2004.
- Plapinge L. Surface morphology of uterine and vaginal epithelia in mice during normal postnatal development. **Biol. Reprod.**, 5: 961-972, 1982.
- Rámirez R, Martín R, Martín JJ, Rámirez JR, Paniagua R, Santamaria L. Changes in number, proliferation rates and bcl-2 protein immunoexpression of epithelium and periductal cells from rat epididymis during postnatal development. **J. Androl.**, 20: 702-712, 1999.
- Reid BL, Cleland KW. The structure and function of the epididymis: histology of the rat epididymis **J Zool.**, 5: 223-246, 1957.

- Rhoden EL, Gobbi D, Menti E, Rhoden C, Teloken C. Effects of the chronic use of finasterida on testicular weight and spermatogenesis in Wistar rats. **BJU. Int.**, 89: 961-963, 2002.
- Robaire B, Jégou B, Pineau C, Saez J. Testis, Epididymis and Technologies in the year 2000 (Eds). In: Ernst Schering Research Foundation Workshop Supplement 6. Springer, 2000.
- Robaire B, Henderson NA. Action of 5 α reductase inhibitors on the epididymis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 250: 190-195, 2005.
- Robaire B; Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. In: Knobil L, Neil J. (Eds). The physiology of reproduction, New York, Elsevier, p. 1071-1148, 2006.
- Robaire B, Henderson NA. Actions of 5 α -reductase inhibitors on the epididymis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 250: 190-195, 2006.
- Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J. Reprod. Fert.**; 54: 103–107, 1978.
- Romieu P, Martin-Fardon R, Bowen WD, Maurice T. Sigma 1 Receptor- related neuroactive steroids modulate cocaine – induced reward. **J. Neurosci.**, 23: 3572-3576, 2003.
- Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Moses AC, Yamamoto M, Zeind AJ, Greenspan SL. Bone density is normal in male rats treated with finasterida. **Endocrinology.**, 136: 1381-1387, 1995.

Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Moses AC, Yamamoto M, Zeind AJ, Greenspan SL. Bone density is normal in male rats treated with finasteride. **Endocrinology.**, 136: 1381-1387, 2008.

Scarano WR, Messias AG, Olivia SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantify and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. **Int J Androl**, 4: 482-48, 2006.

Schweiger ES, Boychenko O, Bernstein RM. Update on the pathogenesis, genetics and medical treatment of patterned hair loss. **J. Drugs. Dermatol.**, 9: 1412-1419, 2010.

Seenundun S, Robaire B. Cloning and characterization of the 5 α reductase Type 2 promoter in the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, 72: 851-861, 2005.

Shao TC, Kong A, Marafelia P, Cunningham GR. Effects of finasterida on the rat ventral prostate. **J. Androl.**, 14: 79-86, 1993.

Shorr B. A new technic for staining vaginal smears: A single differential stains. **Science.**, 94: 545-546, 1941.

Steers w. 5 α redutase activity in the prostate. **Urology.**, 58: 17-24, 2001.

Smith BA, Carson CC. Finasteride in the treatment of patients with benign prostate hyperplasia: a review. **Ther. Clin. Risk. Manag.**, 5: 535-545, 2009.

Syntin P, Dacheux JL, Dacheux F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. **Biol. Reprod.**, 61: 1622-1635, 1999.

Sudduth SL, Koronkowski MJ. Finasteride: The first 5 α reductase inhibitor. **Pharmacotherapy.**, 13: 309–329, 1993.

Sun H, Li TJ, Sun LN, Qiu Y, Huang BB, Yi B, Chen WS. Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Zi-Shen Pill on benign prostatic hyperplasia in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 115: 203-208, 2008.

Talebi AR, Khalili MA, Hossaini A. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. **Int. J. Androl.**, 30: 163-169, 2007.

Tindall DJ, Rittmaste RS. The rationale for inhibition 5 α reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. **J. Urol.**, 179: 1235-1242, 2008.

Titus MA, Gregory CW, Ford OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5 α reductase Isozymes I and II in recurrent prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, 11: 4365-4371, 2005.

Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5 alpha reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. **The Prostate.**, 63: 231-239, 2005.

Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Too CKL, Rittmaster RS, Tindall DJ. Type 1 and type 2 5 α reductase expression in the development and progression of prostate cancer. **Euro. Urol.**, 53: 244-252, 2008.

- Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microsc. Res. Tech.**, 61: 1-6, 2003.
- Tosti A, Duque-Estrada B, Murrel DF. Alopecia in epidermolysis bullosa. **Dermatol. Clin.**, 28: 165-169, 2010.
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP. Sonic hedgehog pathway genes are expressed and transcribed in the adult mouse epididymis. **J. Androl.**; 25: 514-522, 2004.
- Turner TT, Johnston DS, Finger JN, Jelinsky SA. Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. **Biol. Reprod.**, 77: 165-171, 2007.
- Trybek G, Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rozewicka L, Wiszniewska B. Immunolocalization of androgen receptor in the epididymis of rats with dihydrotestosterone deficiency. **Reprod. Biol.**, 5: 291-301, 2005.
- Weibel ER. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **J. Microsc.**, 155: 393-403, 1989.
- Wise LD, Minsker DH, Cukierski MA, Clark RL, Prahalada S, Antonello JM, et al. Reversible decreases of fertility in male Sprague-Dawley rats treated orally with finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor. **Reprod Toxicol.**, 5: 337-346, 1991;.
- Yamashita S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. **Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, 279: 768-78, 2004.

Yannunci J, Manola J, Garnick MB, Bhat G, Bublely GJ. The effect of androgen deprivation therapy on fasting serum lipid and glucose parameters. **J. Urol.**, 176: 520-525, 2006.

Yoo HG, Kim JS, Lee SR, Pyo HK, Moon HI, Lee JH, Kwon OS, Chung JH, Kim KH, EUN HC and CHO KH. Perifollicular fibrosis: Pathogenetic role in androgenetic alopecia. **Biol. Pharm. Bull.**, 29: 1246-1250, 2006.

Zengshun MA, Nguyen TH, Huynh TH, Do PT, Huynh H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. **J.Endocrinol.**, 181: 493-507, 2004.

10. ANEXOS (COMITE DE ÉTICA E ACEITE DO MANUSCRITO)



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

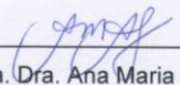
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1622-1, sobre "Análise histológica, estereológica e microarray do epidídimo e dosagem hormonal sérica em ratos submetidos ao tratamento com finasterida seguido da suspensão do tratamento", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Luís Antonio Violin Pereira / Patrick Vianna Garcia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

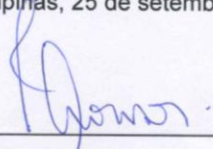
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1622-1, entitled "Histological, stereological analyses and microarray of the epididymis and serum hormonal dosage in the rat submitted to finasteride treatment following suspension of the treatment", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Date: Mar 14, 2012
To: "Luis Violin D Pereira" lviolin@unicamp.br
From: "Fertil Steril" Fertstert@asrm.org
Subject: Your Submission, F and S13070R1

Ref.: Ms. No. F and S13070R1

Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period.

Dear Dr. Pereira,

We are pleased to inform you that the above-mentioned manuscript has been accepted for publication in *Fertility and Sterility*.

Accordingly, your manuscript will now be transmitted to production for copy editing. You should receive your galley proof in about 4 weeks. Please review the galley and answer the copy editor's queries.

Thank you again for submitting your manuscript to *Fertility and Sterility*.

Sincerely,

Antonio Pellicer, M.D.
Craig Niederberger, M.D.
Co-Editors-in-Chief
Fertility and Sterility