

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Elusa Cristina de Oliveira

***Imprinting* estrogênico: efeito sobre a expressão do receptor de
andrógeno no hipotálamo de ratos Wistar**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Elusa Cristina de Oliveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Campinas, 2008.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

OL42i	Oliveira, Elusa Cristina de Imprinting estrogênico: efeito sobre a expressão do receptor de andrógeno no hipotálamo de ratos Wistar / Elusa Cristina de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Diferenciação sexual. 2. Hipotálamo. 3. Imprinting estrogênico. 4. Receptores de andrógeno. I. Carvalho, Hernandes Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
--------------	---

Título em inglês: Effects of estrogenic imprinting on the androgen receptor expression in the hypothalamus of Wistar rats.

Palavras-chave em inglês: Sexual differentiation; Hypothalamus; Estrogen imprinting; Androgen receptors.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Hernandes Faustino de Carvalho, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Celso Rodrigues Franci.

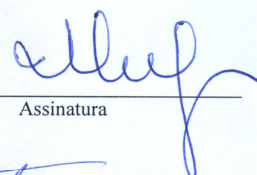
Data da defesa: 09/04/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 09 de abril de 2008.

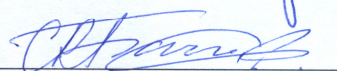
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)



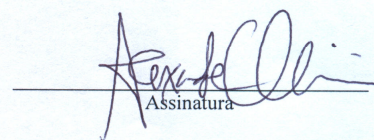
Assinatura

Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Maria Julia Marques

Assinatura

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Assinatura

Aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar ao meu orientador o professor Hernandes, por ter me recebido prontamente e pela confiança depositada. Aceitou me orientar, acreditou no meu potencial, me deu força, confiança e incentivo para desenvolver esse trabalho.

Aos meus pais pelos ensinamentos, incentivo e apoio em todas as ocasiões.

À minha irmã Elaine pela colaboração nos momentos difíceis da vida em Campinas e pelo apoio.

Ao meu namorado Marcelo pela paciência e compreensão.

Ao professor Jackson Bittencourt pelo amparo profissional, pela acolhida e pela atenção, sempre com muito carinho e amizade. Abriu as portas de seu laboratório e me fez sentir “em casa”, e a sua técnica de laboratório Amanda pela atenção e amizade.

Ao professor Newton Canteras por algumas sugestões prévias do trabalho.

Aos professores Lício Velloso e Francesco Langone que disponibilizaram alguns de seus alunos para me auxiliar no início dos trabalhos, em especial ao André, a Talita e a Maristela.

À professora Laurecir Gomes por ter disponibilizado seu laboratório para meu estágio prévio.

Às professoras Maria Júlia Marques, Luciana Bolsoni, Edson Pimentel e Laurecir Gomes que compuseram a banca do exame de qualificação e proficiência, pelas críticas, sugestões e elogios.

Aos professores que aceitaram participar da análise prévia da dissertação, mesmo num período de início de ano, Alexandre Oliveira, Maria Júlia Marques, Newton Canteras, Humberto Santo Neto, Edson Pimentel e Celso Franci, em especial aos professores Alexandre, à Maria Júlia e Celso (que foram os escolhidos para a análise) pelas sugestões, correções e elogios.

Ao programa e demais docentes da Biologia Celular e Estrutural pela excelente oportunidade de formação, em especial aos professores Edson, Laurecir e Heidi pelo auxílio em vários momentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da dissertação.

À secretária do programa, Líliam Panagio, pela paciência, dedicação, cuidado e profissionalismo durante todo o curso.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular pela atenção.

Aos amigos de departamento (e alguns de departamentos vizinhos) que sempre estiveram à disposição, principalmente nos momentos mais difíceis, Andréia, Adriano, Tatiana, Juliana, Juliana Moya, Fabrícia, Pedro, Marcos, Rodrigo, Alberto, Flávia, Karina, Eduardo, Wilson, Júlio (me perdoem se esqueci de alguém).

Aos colegas de laboratório e de vários momentos bons, Alexandre, Lilian, Silvia, Eliane, Sheila, Esdras, Fabiana, Danilo, Helene, Henrique, Taize e Manuel, todos vocês tiveram uma participação muito especial na minha passagem pelo laboratório, cada um me ajudou de uma forma, mas todos contribuíram para minha formação e aprendizagem, devo muito a vocês.

Às amigas de república, porque passamos por momentos bons e alguns (poucos) difíceis, mas todos compensaram esses três anos vivendo em Campinas, muito obrigada Taize, Lucinha, Tati, Jú, Elaine.

Aos amigos Tarcísio, Fabiana, Renata e Michele pelo apoio mesmo de longe.

Aos meus familiares mais próximos pelo apoio mesmo à distância.

Por fim (mas não com menor importância) a Deus por sempre estar ao meu lado e por me proporcionar calma, tranquilidade e força durante toda essa jornada tão importante da minha vida.

“Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do *homo ludens*: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão” (Jacques Barzun).

Resumo

Em ratos machos, a completa função reprodutiva é criticamente dependente da adequada ação do estrógeno nos diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. A administração de altas doses de estrógeno durante o período de diferenciação sexual resulta em diversas alterações no sistema reprodutor masculino. De forma geral, os estrógenos têm efeito anti-androgênico atuando no eixo hipotálamo-hipófise-testículos e, assim, reduzindo a produção de testosterona pelos testículos. A administração de estrógeno nos períodos críticos do desenvolvimento promove um mecanismo conhecido como *imprinting* estrogênico. Este fenômeno é extremamente importante, pois pode ser acionado pela exposição do recém-nascido a várias substâncias com caráter estrogênico, e não somente ao estrógeno. Um dos efeitos do *imprinting* estrogênico causado por altas doses de estrógeno é a regulação negativa da expressão de receptores de andrógenos (ARs) na próstata e reduzida resposta a aplicações de andrógenos, o que parece alterar padrões de comportamento em machos. Diante disso, este trabalho investigou os aspectos relacionados aos mecanismos gerais envolvidos no *imprinting* estrogênico, com o propósito de analisar a participação do estrógeno e a sua influência sobre os ARs no hipotálamo de ratos *Wistar*. Para tanto, ratos machos foram tratados no período neonatal inicial com três doses de 15 mg/kg de 17 β -estradiol (E2) e comparados com ratos controle (tratados apenas com óleo de milho) e com fêmeas que não receberam nenhum tratamento farmacológico, e os efeitos foram observados na idade adulta. Foram verificados os padrões de distribuição do AR por imunoistoquímica, o conteúdo total de AR por *Western blotting* e do correspondente RNAm por RT-PCR no hipotálamo dos animais submetidos à estrogenização neonatal. A estrogenização promoveu diminuição no conteúdo total de AR e na expressão do RNAm correspondente, e modificações no padrão de distribuição do AR nos núcleos ventromedial, pré-óptico medial anterior, paraventricular e área pré-óptica, aproximando-se do padrão apresentado por fêmeas. Portanto, esses dados indicam que o estrógeno é capaz de promover *imprinting* neonatal no hipotálamo e alterar a expressão do AR, o que possivelmente pode afetar o comportamento sexual desses animais.

Abstract

In male rats, complete reproductive function is critically dependent on adequate estrogen action at different levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The administration of high doses during the period of sexual differentiation results in irreversible alterations in the male reproductive system. In brief, the estrogens have anti-androgenic effects they act in the hypothalamus-pituitary-testes axis, reducing the testosterone production by the testes. The administration of estrogen in critical periods of development promotes a mechanism known as estrogen imprinting. This phenomenon is extremely important, because it can be started by the exposure of the neonate to several estrogen-like substances with estrogen characteristics, and not only to estrogen. One of the estrogenic imprinting effects caused by high doses of estrogen is the negative regulation of the expression of androgen receptors (ARs) in the prostate and reduced responses to androgen exposure that seems to alter the male behavior. This study investigated the participation of estrogen and its influence on the ARs in the hypothalamus of Wistar rats after estrogen imprinting. For this, male rats were treated in the early neonatal period with 17 β -estradiol (E2) three doses of 15mg/kg and compared with control rats (only treated with corn oil) and with not treated females, and the effects were analyzed in the adulthood. The AR distribution pattern was analyzed by immunohistochemistry, the total content of the AR by Western blotting and its mRNA by RT-PCR in the hypothalamus of treated animals. The neonatal estrogenization promoted decrease of expression of the AR and its mRNA. Also revealed that the AR distribution pattern at the ventromedial, anterior medial preoptic and paraventricular nuclei and preoptic area were altered and with a pattern close to not treated females. Therefore, our data indicate that estrogen is able to induce estrogen imprint in the hypothalamus and to alter the AR expression and possibly affecting the sexual behavior.

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract.....	9
Lista de abreviaturas	11
1. Introdução	12
1.1 Determinação sexual.....	12
1.2 Diferenciação e hormônios sexuais	13
1.2.1 Andrógenos e diferenciação sexual	15
1.2.2 O papel do estrógeno na diferenciação sexual.....	21
1.3 Dimorfismos sexuais no hipotálamo	24
1.4 <i>Imprinting</i> estrogênico.....	25
2. Objetivo	27
3. Artigo	28
3.1 Resumo	30
3.2 Abstract.....	31
3.3 Introdução.....	32
3.4 Materiais e Métodos	33
3.4.1 Grupos Experimentais	33
3.4.2 Remoção de material	34
3.4.3 Análise do material coletado	35
3.4.4 Análises Estatísticas	39
3.5 Resultados.....	39
3.5.1 Variação do peso da próstata frente à aplicação de estrógeno	39
3.5.2 Efeito do estrógeno sobre a expressão do AR	39
3.5.3 Níveis de expressão do gene do AR nos grupos experimentais	40
3.5.4 Variação no padrão de distribuição da imunorreatividade do AR nos núcleos hipotalâmicos.....	40
3.6 Discussão	40
3.7 Referências	44
3.8 Figuras	47
4. Conclusões Gerais	58
5. Referências	59
6. Anexo	72

Lista de abreviaturas

AR – receptor de andrógeno
DHT – diidrotestosterona
DNA – ácido desoxirribonucléico
E2 – 17 β -estradiol
ER – receptor de estrógeno
GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas
GH - hormônio do crescimento
INAH - núcleos intersticiais do hipotálamo anterior
LH - hormônio luteinizante
MIS – substância inibidora dos ductos mullerianos
MPN - núcleo pré-óptico medial anterior
MPO – área pré-óptica medial
POA - área pré-óptica
PVH – núcleo paraventricular do hipotálamo
SDN-POA – núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica
siRNA – interferência de moléculas curtas de RNA
SNC – sistema nervoso central
SRY - região determinante do sexo de Y
RNA - ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
T – testosterona
TDF - fator determinante do testículo
VMH – núcleo ventromedial do hipotálamo

1. Introdução

A diferenciação sexual masculina ocorre nas diversas fases do desenvolvimento. Inicialmente, ocorre a determinação sexual mediada pelos cromossomos sexuais. Por sua vez, o padrão cromossômico inicia a cascata de eventos genéticos levando ao desenvolvimento de gônadas masculinas. As gônadas, então, secretam hormônios esteróides que são essenciais para o desenvolvimento da genitália interna e externa.

Durante esse processo ocorre simultaneamente a diferenciação das estruturas cerebrais. Com isso, pode-se prever que os sistemas neurais de machos e fêmeas sejam diferentes, ou seja, sexualmente dimórficos, e que circuitos específicos se desenvolvam de acordo com o sexo do animal (Damiani *et al.*, 2005).

Comportamentos sexuais dimórficos representam um conjunto de respostas que incluem acasalamento, lactância, agressão e marcação territorial. Comportamentos masculinos que incluem acasalamento e agressão requerem andrógenos durante um período crítico do desenvolvimento, quando o cérebro é mais susceptível a influências exógenas, mas também durante a maturidade, presumivelmente estabelecendo e mantendo os circuitos neurais responsáveis por esses comportamentos (Goy e McEwen, 1980).

1.1 Determinação sexual

A diferenciação sexual começa com a determinação genética das gônadas que quando formadas determinam o sexo cerebral (MacCarthy *et al.*, 1997). O sexo cromossômico do indivíduo é estabelecido na concepção, dependendo do cromossomo que é transmitido pelo espermatozóide. A partir daí, será determinado qual o tipo de estrutura (ovário ou testículos) será diferenciada a partir da gônada primordial (Kandel *et al.*, 1997).

Estudos iniciados com as técnicas de biologia molecular identificaram no braço curto do cromossomo Y de mamíferos, o gene SRY responsável pela síntese do sinalizador TDF. Este por sua vez, determina que a gônada indiferenciada se torne um testículo (De Vries *et al.*, 2002).

O gene SRY atua como fator de transcrição ligando-se ao DNA para induzir a transcrição gênica da MIS, da enzima citocromo p450 aromatase e do componente de AP-1, o fra-1. As duas primeiras moléculas têm funções importantes na fisiologia reprodutiva e desenvolvimento sexual,

conforme será descrito posteriormente. O *fra-1* tem um papel pouco conhecido na determinação do sexo, mas o AP-1 é um importante sítio de ligação ao DNA e está envolvido em diversos processos de ativação gênica (Sinclair *et al.*, 1990; MacLaughlin e Donahoe, 2004).

As etapas subseqüentes da diferenciação sexual para o padrão masculino resultam da ação dos hormônios produzidos pelos testículos do feto e, em contraste o fenótipo feminino pode desenvolver-se na ausência de qualquer tecido gonádico. Isto foi demonstrado removendo-se o tecido gonádico de embriões de coelho. Nesse experimento, todos os animais, independente do sexo cromossômico, desenvolveram-se como fêmeas (Beato, 1989).

Esta interação foi inicialmente observada em casos como a Síndrome de Turner. Nessa síndrome não se forma um tecido gonádico funcional, já que o genótipo é representado apenas por um cromossomo X. Assim, os ovários fetais brotam e, depois, atrofiam; os ductos de Wolff involuem, e com isso não há o desenvolvimento do sistema reprodutivo interno masculino; os ductos de Müller desenvolvem-se já que não há produção da MIS, secretada normalmente pelos testículos do feto, dando origem aos ovidutos, ao útero, ao cérvix e à vagina (Kandel *et al.*, 1997).

Outra anomalia genética conhecida como Síndrome da insensibilidade ao andrógeno demonstra o papel dos hormônios durante o desenvolvimento precoce. Nessa síndrome, os indivíduos XY desenvolvem testículos, produzem andrógenos, mas são incapazes de responder aos andrógenos produzidos. Com isso, desenvolvem fenótipo feminino, mas não têm útero nem ovidutos (Beato, 1989; Kirn e de Voogal, 1989).

Em estudos com ratos e camundongos mutantes com Síndrome da insensibilidade androgênica foi observada a ausência de ARs. Estes animais produzem andrógenos normalmente, porém as células alvo são incapazes de responder ao sinal hormonal. Com isso, apesar do genótipo XY, esses animais desenvolvem características sexuais secundárias femininas durante a fase púber em resposta aos estrógenos produzidos pelas adrenais e pelos testículos (via aromatização da T) (Dewing *et al.*, 2003).

1.2 Diferenciação e hormônios sexuais

O período crítico de diferenciação sexual é próprio para cada espécie e é fundamental para a diferenciação e desenvolvimento completos do sexo masculino.

Dados experimentais em ratos demonstram que o período crítico segue-se à diferenciação das células de Leydig e o início da produção de T (Weisz e Ward, 1980). Os testículos iniciam a síntese de andrógenos por volta do 13º dia de desenvolvimento fetal e continuam a produzir até o 10º dia após o nascimento (Bakker *et al.*, 2004).

Em ratos, a manipulação do ambiente hormonal durante o período crítico de desenvolvimento perinatal ou neonatal altera permanentemente tanto a estrutura quanto a função dos órgãos relacionados à reprodução, dentre eles as estruturas cerebrais (Damiani *et al.*, 1990), com efeitos diferentes para machos e fêmeas (Pereira *et al.*, 2003).

A exposição de fetos femininos a altas doses de T, injetadas nas cobaias mães, promove um pseudo-hermafroditismo, e o comportamento sexual adulto dessas fêmeas hermafroditas também é alterado. Quando tratadas subsequentemente com estrógeno e progesterona na fase adulta, essas cobaias XX mostram alguns elementos de comportamentos sexuais próprios de fêmeas, mas sua capacidade para exibir esses comportamentos é significativamente menor que a das fêmeas controles (Phornphutkul e Fausto-Sterling, 2000). Por outro lado, exibem mais comportamentos de montada, típico de machos, que as fêmeas normais. Se forem tratadas com T na fase adulta, essas fêmeas exibem um grau de montada comparável ao dos machos, e o padrão de lordose, próprio do sexo feminino, é suprimido. Estes estudos permitem a distinção dos efeitos dos hormônios presentes durante o desenvolvimento dos efeitos dos mesmos hormônios circulantes no adulto (Wilson, 2001).

A exposição perinatal de ratos machos ao estrógeno promove alterações permanentes e irreversíveis no sistema reprodutor masculino, o que será discutido no item 1.2.2 (Kincl *et al.*, 1965; Aguilar *et al.*, 1984).

Outra fonte de esteróides que pode influenciar os fetos em desenvolvimento de ambos os sexos é a placenta, que atua como glândula endócrina secretando progesterona e estradiol. O papel das secreções placentárias ainda não é bem compreendido. O LDL (LDL - lipoproteína de baixa densidade) associado ao colesterol (materno) é metabolizado em progesterona pela placenta, e para formar outros esteróides, a progesterona de origem placentária é transportada para as glândulas adrenais fetais e para o fígado, e depois é devolvida à placenta para a transformação em estrógeno e um grupo de andrógenos, inclusive a T (Kandel *et al.*, 1997; Harris e Crabb, 2002).

O posicionamento no útero também é um fator que promove consequências no comportamento sexual. Camundongos do sexo feminino que se desenvolveram entre dois fetos machos têm concentração mais alta de T, tanto no sangue quanto no líquido amniótico, do que as fêmeas que se desenvolveram entre um macho e uma fêmea ou entre duas fêmeas, e apesar de se reproduzirem normalmente, exibem ciclos estrais erráticos, começam a se acasalar mais tarde e cessam a reprodução mais cedo que as fêmeas que se desenvolveram entre duas fêmeas. Os tipos de fêmeas definidos pela posição intra-uterina diferem também em muitas características como agressividade e aceitabilidade ao macho (Beato, 1989).

Nos machos, a posição intra-uterina tem um efeito importante sobre as características masculinas nos roedores. O tamanho e o peso dos testículos de machos que se desenvolveram entre dois machos é maior que os dos machos não cercados por dois irmãos machos, e as vesículas seminais são mais sensíveis à T (Dohle, 2003).

Além disso, Kacsóh *et al.* (1986) mostraram que a amamentação precoce também é necessária para a masculinização do eixo hipotálamo-hipófise em ratos. Além disso, foi proposto que a amamentação no período neonatal é importante para o completo desenvolvimento sexual de ratos (Carlos *et al.*, 1996). Esses relatos necessitam de maiores investigações sobre o papel do leite materno e do colostro na diferenciação sexual.

1.2.1 Andrógenos e diferenciação sexual

Os hormônios sexuais são moléculas hidrofóbicas e, para serem transportados do sangue para os tecidos-alvo, ligam-se a proteínas transportadoras e se difundem facilmente através das membranas celulares por difusão simples. No interior do núcleo da célula, ligam-se a receptores altamente específicos, cuja distribuição varia amplamente nos vários órgãos envolvidos com a reprodução e comportamento sexual, promovendo modificações na expressão gênica e metabolismo (Nelson e Cox, 2004; Rosenzweig, 2000).

A ligação do hormônio desencadeia mudanças na conformação das proteínas receptoras de forma que elas se tornam capazes de interagir com seqüências reguladoras específicas do DNA, chamados de elementos responsáveis ao hormônio, alterando dessa forma a expressão gênica (Nelson e Cox, 2004).

Os andrógenos, T e seu metabólito a DHT exercem suas funções via AR, que por sua vez tem a função de regular a transcrição de diversos genes associados a vários aspectos do desenvolvimento de indivíduos do sexo masculino.

A T e a DHT promovem a diferenciação de ductos internos e da genitália externa, respectivamente, para o sexo masculino, enquanto na ausência deles, expressa-se o programa inicial para o sexo feminino.

O AR atua fundamentalmente como fator de transcrição. A molécula inativa localiza-se no citoplasma. Com a ligação da T ou da DHT, ela passa por uma série de modificações pós-traducionais, dissocia-se de uma proteína, a HSP (*heat shock protein*), dimeriza-se e é translocada para o núcleo, onde, em conjunto com uma série de co-ativadores ou co-repressores, liga-se aos elementos de resposta ao andrógeno (AREs) e ativa ou inativa genes.

O AR é uma molécula extremamente importante, pois responde pela diferenciação sexual masculina primária (formação das gônadas e genitália) e secundária (associadas à adolescência e puberdade – Sisk e Foster, 2004), sendo com isto responsável pela maioria dos casos de insensibilidade androgênica total ou parcial (Dohle *et al.*, 2003), conforme descrito anteriormente, mas também está envolvido com o desenvolvimento do câncer prostático e, principalmente, das recidivas independentes de andrógeno (Lee e Chang, 2003; Heinlein e Chang, 2004; Feldman e Feldman, 2001).

Apesar do mecanismo resumido apresentado acima, a regulação da expressão e atividade do AR é complexa, dependendo de vários elementos de regulação nos níveis transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais.

A região codificadora do gene do AR possui 8 éxons, intercalados com íntrons de tamanhos variáveis, de menos de 1 Kbp a mais de 26 Kbp (Figura 1).

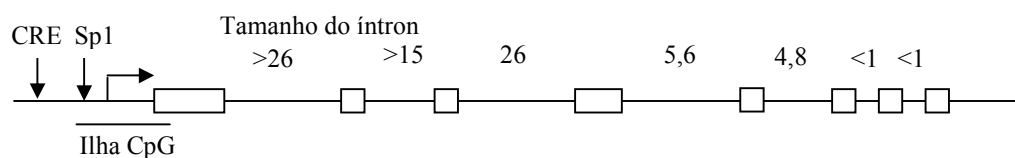


Figura 1 – A região codificadora do gene do AR

O promotor do gene do AR não possui nem um TATA box nem um CAAT box (Lindzey et al., 1994), mas possui sítios de ligação para a CREB (proteína de ligação com o elemento de resposta ao AMP cíclico) (Mizokami *et al.*, 1994; Lindzey *et al.*, 1993) e para a SP1 (Lindzey *et al.*, 1993).

Uma lista dos elementos de regulação presentes na região 5' do gene do AR de camundongos é mostrada na Tabela I.

Tabela I – Elementos de regulação prováveis, presentes na região 5' do gene do AR^a

Elemento provável	Seqüência consenso	Seqüência do camundongo	Localização
TATA Box	TATAA	ausente	
CAAT Box	CCAAT	ausente	
Sp1	GGGCGG	GGGCGG	-39 a -44
	CCGCCC	CCGCCC	+200 a +205
		CCGCCC	+557 a +562
Ap1	TGACGTCA	TGAGTCA	-193 a -199
Ap2	CCCCAGGC	CCCTGGGGGG	-433 a -442
		GCGGGGGCGG	-39 a -48
		CCCACCC	+151 a +158
		CCCCACCC	+864 a +871
CRE	TGACGTCA	TCCCGTCA	+733 a +740
AREGREPRE	TGTTCT	TGTTCT	-483 a -488
<i>Half-site</i>		TGTTCT	-449 a -454
		TGTTCT	+299 a +304
		TGTTCT	+762 a +767
Pu Box	GAGGAA	TTCCTC	-375 a -380
		TTCCTC	+218 a +223
		GAGGAA	+258 a +263
OCT	ATTGTCAT	ATTGTCAC	+675 a +682

^aReproduzida de Lindzey et al. (1994)

Há pelo menos cinco regiões ricas em CpG (citosinas e guaninas) no gene do AR humano, estendendo-se da posição -500 até a -1500 (Kinoshita *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002), o

que permite o silenciamento do gene por metilação do DNA em alguns tipos celulares tumorais prostáticos.

Recentemente foi demonstrado que células tumorais e linhagens estabelecidas de tumores prostáticos variam quanto aos níveis de expressão do AR. No caso dos tumores, a expressão é bastante heterogênea. Dentre as linhagens, a LNCaP (célula derivada de um sítio metastático em casos de adenocarcinoma de próstata) expressa o AR, enquanto a PC3 (célula metastática de osso também presente em adenocarcinoma de próstata) apresenta uma quantidade mínima e a DU145 (célula metastática encontrada no cérebro em casos de carcinoma prostático) não expressa AR (Nakayama *et al.*, 2000). Alguns autores investigaram o padrão de metilação de duas regiões correspondentes a ilhas CpG na região promotora do gene do AR e demonstraram que a ausência de expressão na DU145 pode ser atribuída a um elevado índice de metilação nestas regiões. Além disto, o tratamento destas células com o inibidor de metilação azacitidina, restaura a expressão do AR. Os mesmos autores demonstraram uma grande heterogeneidade no padrão de metilação destas regiões em células provenientes de tumores prostáticos. Situação similar foi demonstrada para células tumorais prostáticas de ratos para as quais foram identificados 19 dinucleotídeos CpG passíveis de metilação no gene do AR (Takahashi *et al.*, 2002 – Tabela II).

Tabela II - Dezenove CpGs alvos de metilação na região 5' do gene do AR em ratos^a

-578	-561	-428	-401	-342	-336	-312	-274	-206	-195	-162	-152	-66	-59	-53	-25	-9	-1	43
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	----	----	----

^a De acordo com Takahashi et al. (2002)

O mesmo mecanismo de hipermetilação resultando em silenciamento do gene foi descrito em outros receptores nucleares, como o ER e o receptor de progesterona (Sasaki *et al.*, 2002; 2003).

O AR tem 110kDa e possui várias características em comum com os membros da família dos receptores nucleares, como os ERs, de progesterona, dos hormônios da tireóide e com os PPARs (receptores para os ativadores da proliferação dos peroxissomos) (Jacobs *et al.*, 2003). As principais regiões da molécula do AR são mostradas na Figura 2.

Em algumas situações foi detectada uma forma de massa molecular ao redor de 87 kDa, que corresponde a cerca de 4-26% do conteúdo protéico total do AR, de acordo com experimentos de *Western blotting* (Wilson e McPhaul, 1996; Gao e McPhaul, 1998).

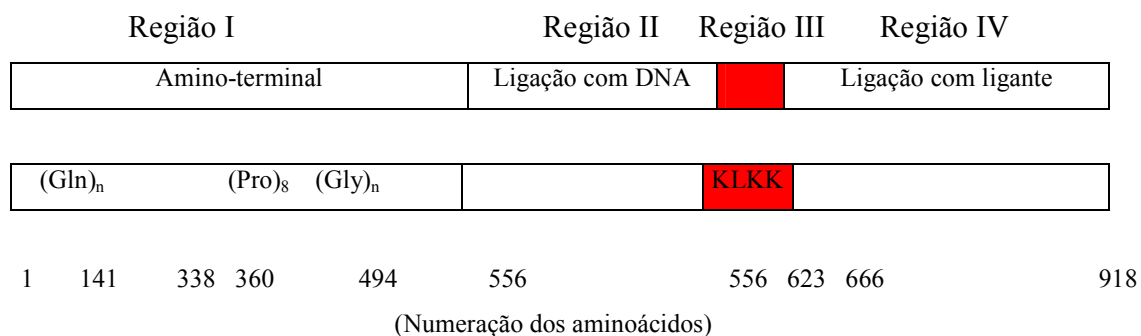


Figura 2 – Principais regiões da molécula do AR

Esta forma molecular tem sido atribuída ao uso de uma segunda metionina, como início da tradução (Gao e McPhaul, 1998) ou ao resultado de proteólise da molécula íntegra (Lee e Chang, 2003), sendo que a existência de isoformas do AR não é muito bem aceita (Lee e Chang, 2003).

A região amino-terminal contém dois tipos de repetições, uma região de poli-glutamina e outra de poli-glicina. O número de aminoácidos em cada repetição é variável e associado com polimorfismos nestas regiões. No caso da região de poli-glutamina, a extensão do número deste aminoácido além de 40, resulta em uma desordem neuromuscular, conhecida como doença de Kennedy, associada à baixa virilização. A aparente causa desta doença consiste na agregação e acúmulo do AR, levando à insensibilidade androgênica e degeneração celular (La Spada *et al.*, 1991; Choong e Wilson, 1998; Merry *et al.*, 1998). Já uma redução do número de glutaminas para menos de 17 parece favorecer a incidência de câncer de próstata.

Na porção amino-terminal há ainda outra região com oito prolinas repetitivas, mas com número bastante constante. Segue-se uma região de ligação com o DNA, que consiste de dois dedos de zinco, uma região de dobradiça (*hinge*, em vermelho na Figura 2), que apresenta a sequência consenso de acetilação (KLKK) e o sinal de localização nuclear, e uma região de ligação com o ligante.

Há vários mecanismos envolvidos na regulação da atividade do AR. A Tabela III apresenta os principais eventos relacionados com a ativação/inativação do AR.

Tabela III. Eventos pós-traducionais relacionados à ativação/inativação do AR

Evento	Agente	On/Off	Referência
Ligação com ligante	T ou DHT	On	--

Acetilação (₆₃₀ KLKK)	p300, Tip60, PCAF	On	Fu et al., 2004
Fosforilação	Proteína serina-quinases	On	LaFevre-Bernt e Ellerby, 2003; Hirawat et al., 2003; Thompson et al., 2003
Sumoilação	PIAS (Sumo E3-ligases	Off	Nishida e Yasuda, 2002
Translocação para o núcleo	T ou DHT	On	--
Translocação para o citoplasma	T ou DHT	Off	--
Ligação com co-ativadores	Tip60, p300, PCAF, SRC1	On	Heinlein e Chang, 2004
Ligação com co-repressores	SMRT, HDACs, SIRT, N-CoR, Sumo1,	Off	--

Hoje são conhecidas ações não genômicas do AR, que envolveriam a ativação de várias vias de sinalização e diferentes efeitos sobre o comportamento celular (Heinlein e Chang, 2002; 2004). As características principais destas ações são a sua velocidade de ocorrência, antecipando qualquer efeito de ativação e transcrição gênica (Castoria *et al.*, 2003). Em células LNCaP, os efeitos estudados correspondem ao rearranjo do citoesqueleto de actina e à secreção de PSA (antígeno prostático específico) em células (Castoria *et al.*, 2003; Papakonstanti *et al.*, 2003).

Aparentemente estas ações dependeriam de receptores de membrana, cuja função já foi reconhecida, com o uso de derivados dos andrógenos que não são capazes de atravessar a membrana plasmática (Castoria *et al.*, 2003). Porém, dentre os hormônios esteróides, apenas a progesterona teve seu receptor de membrana clonado e caracterizado (Zhu *et al.*, 2003; Losel *et al.*, 2005).

Adicionalmente, existe também a possibilidade de ação do AR na ausência de ligantes (Cenni e Picard, 1999; Culig *et al.*, 2002), além da possibilidade de modulação da atividade do AR por modificações pós-traducionais, dentre elas a fosforilação (LaFevre-Bernt e Ellerby, 2003; Hirawat *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003). Em algumas mutações do gene do AR, moléculas

com ação antagonista são alojadas na região de ligação com andrógenos e passam a atuar como agonistas. Este é o caso da mutação T877A encontrada nas células LNCaP (Veldscholte *et al.*, 1990).

Recentemente, foi demonstrado que a inibição da expressão do AR, com o uso de siRNA, leva à hiperexpressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, causando inibição da proliferação de células LNCaP (Hååg *et al.*, 2005). Nas condições dos experimentos, a aplicação do siRNA causou inibição da expressão do AR por 48 horas. Neste trabalho não foram investigadas as possíveis alterações associadas ao gene do AR.

A privação androgênica leva à regressão da próstata (Kerr e Searle, 1973; Isaacs, 1994). Da mesma forma, compostos que bloqueiam a ação do AR, que impedem a ação da enzima 5 α -redutase (que converte T a DHT) ou que tem efeito inibitório sobre o eixo hipotálamo-hipófise, têm ação anti-androgênica e induzem a regressão prostática.

1.2.2 O papel do estrógeno na diferenciação sexual

Os estrógenos tem efeito anti-androgênico por inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e promover a inibição da produção de T pelos testículos, causando regressão prostática, quando aplicado a indivíduos adultos (Putz *et al.*, 2001).

Evidências de uma ação direta dos estrógenos na próstata surgem da observação da existência de ERs, nas células prostáticas epiteliais e estromais, respectivamente (Prins *et al.*, 1998; Jarred *et al.*, 2000; 2002). Um efeito direto do estrógeno, estimulando o crescimento prostático, foi demonstrado em camundongos hipogonadais (*hpg*), que não possuem andrógenos circulantes. Apesar de promover um crescimento da próstata, este foi bem menor que os controles e estava associado a diferentes neoplasias (Bianco *et al.*, 2002).

Os estrógenos também têm papel essencial na regulação da estrutura e função de muitos sistemas neuronais no cérebro do rato e contribuem para a diferenciação sexual, sendo suas ações mediadas pelos ERs (MacLusky e Naftolin, 1981).

O ER se apresenta sob dois subtipos diferentes, o ER α e o ER β . Essa duas formas possuem propriedades funcionais diferentes e mostram distintos padrões de distribuição tecidual e regulação gênica. Em neurônios do hipotálamo de ratos machos observou-se a expressão de RNAm do ER α e ER β por hibridização *in situ* (Kamegai *et al.*, 2001).

Os ER α e ER β estão presentes no núcleo arqueado e na área pré-óptica, enquanto o ER α está presente no VMH e o ER β no PVH. Estes núcleos do hipotálamo são importantes para a reprodução e comportamento sexual (Simpson e Davis, 2000).

Há atualmente evidências de que a aromatização local da T no hipotálamo, isto é, a transformação dela em estradiol pela enzima citocromo p450 aromatase, que consiste na inserção de ligações duplas na molécula, transformando o primeiro anel carbônico da T no anel aromático do estradiol, seja a responsável pela masculinização das estruturas cerebrais.

A citocromo p450 aromatase está envolvida na transformação irreversível de andrógenos em estrógenos e está presente no retículo endoplasmático de numerosos tecidos, dentre eles o tecido nervoso (Fisher *et al.*, 1998).

A expressão e ativação dessa enzima estão aumentadas durante o período crítico de desenvolvimento neural em roedores (Roselli *et al.*, 2003).

O complexo citocromo p450 aromatase é composto por duas proteínas; a NADPH-citocromo p450 redutase e a citocromo p450 aromatase, esta última contém o grupo heme e o sítio ativo de ligação aos esteróides (Carreu *et al.*, 2003).

Nos humanos, a p450 aromatase é produto do gene CYP19, o qual pertence à família do citocromo p450 que possui mais de 500 membros (Swaab, 2004).

A conversão a estradiol é também a principal via metabólica pela qual circuitos neurais importantes do ponto de vista comportamental, são permanentemente modificados durante o período crítico. Os inibidores farmacológicos dessa conversão química afetam a diferenciação sexual dos machos e bloqueiam a facilitação do comportamento sexual adulto normal induzido pelo E2 (Pereira *et al.*, 1997).

Estudos em camundongos nocaute para aromatase (ArKO), que possuem mutação nos éxons 1 e 2 do gene CYP19, mostraram que houve prejuízo no comportamento sexual desses animais na idade adulta. Para determinar se isto era devido à falta de ativação do comportamento sexual através do estrógeno, os pesquisadores verificaram o comportamento de acasalamento masculino como também investigaram os estímulos olfatórios sexualmente pertinentes, nos ratos ArKO tratados na fase adulta com benzoato de estradiol (EB) ou propionato de testosterona (DHTP) (Bakker *et al.*, 2004). Déficits no comportamento de coito masculino foram corrigidos com EB e DHTP sugerindo que o estrógeno tem efeito de ativação neste comportamento. Por outro lado, o tratamento de machos adultos castrados com EB sugere que este prejuízo pode ser o

resultado da falta da própria organização desse comportamento devido à deficiência crônica de estrógenos (Bakker *et al.*, 2004).

Camundongos nocautes para ER α (α ERKO) raramente ejaculam, são inférteis, mas manifestam frequência normal de montada, porém, com reduzido número de intromissões. Em contraste, nos camundongos nocautes para ER β todos os componentes estão normais (Ogawa *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1999). Em ratos machos nocautes para AR (ARKO) o comportamento sexual está severamente comprometido, incluindo forte redução na frequência de montada e prolongado período de latência (Honda *et al.*, 1998).

A masculinização envolve, portanto, ERs bem como o AR. Estes dados demonstram que a diferenciação do SNC depende da ação de estrógenos, assim como da ação primária de andrógenos (Bakker *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 1997).

Durante a gestação, os fetos de ambos os sexos estão expostos a altos níveis de estrógeno circulantes no sangue materno, a partir disso chegou-se à conclusão de que os fetos são protegidos do estrógeno materno por uma proteína fixadora de estrógeno chamada α -fetoproteína (Roselli *et al.*, 2003).

Em fêmeas, a diferenciação do SNC inicia-se durante o período perinatal com a ação de baixas concentrações de estrógeno sobre os mesmos neurônios alvo presentes nos machos, e se completa no período pós-natal (entre o nascimento e a puberdade) quando a concentração de α -fetoproteína diminui drasticamente (Bakker e Baum, 2008).

Com isso, pode-se concluir que a α -fetoproteína tem ação protetora, impedindo que grandes quantidades de estrógeno ultrapassem a barreira hemato-encefálica e promovam a masculinização das estruturas cerebrais, e por outro lado, tem papel como proteína transportadora de estrógeno (em pequenas quantidades), o que tem grande importância para o desenvolvimento cerebral de fêmeas. Essa hipótese foi apoiada pela descoberta de que vários núcleos hipotalâmicos, tanto de machos quanto de fêmeas, apresentam ERs (Swaab, 2004) e que a α -fetoproteína foi encontrada nos neurônios de machos e fêmeas em todos os estágios do desenvolvimento do SNC (Bakker e Baum, 2008).

A α -fetoproteína é sintetizada pelo fígado fetal e está presente no sangue, no cérebro e no líquido cefalorraquidiano de ratos e camundongos (MacLusky e Naftolin, 1981).

A T, diferentemente do estrógeno, não se liga a essa proteína e, com isso, tem livre acesso aos neurônios sensíveis aos esteróides, nos machos, durante o período crítico.

A T circulante atravessa a barreira hemato-encefálica e, nas células dos núcleos sexualmente dimórficos do hipotálamo, é convertida em estradiol fazendo o *imprint* para o sexo masculino, o que promove a inibição da apoptose desses neurônios. Já nas fêmeas, como grande parte das moléculas de estrógeno circula periféricamente ligada a α -fetoproteína, sua passagem ao SNC fica dificultada, não podendo exercer a inibição da apoptose em núcleos específicos relacionados a reprodução (Hrabovszky e Huston, 2002).

1.3 Dimorfismos sexuais no hipotálamo

Apesar de machos e fêmeas diferirem em muitos aspectos, o programa inicial para o desenvolvimento subjacente a todos os aspectos da determinação sexual é o mesmo. Acredita-se que o programa inicial de desenvolvimento tanto do cérebro quanto do corpo é feminino, pois ambos os sexos apresentam os primórdios para os órgãos sexuais internos masculinos ou femininos e, ao menos em parte, a influência hormonal no período embrionário e pós-natal dirige a diferenciação sexual do sistema nervoso (Damiani *et al.*, 2005).

A presença de dimorfismos no sistema nervoso permite concluir que existem diferenças não apenas anatômicas, mas também bioquímicas entre os sexos. Os dimorfismos sexuais mais evidentes no encéfalo de mamíferos estão agrupados em torno do hipotálamo, que é uma estrutura subcortical do SNC e que ocupa a porção ventral do diencefalo, dispondo-se nas paredes do terceiro ventrículo (Kirm e Lombroso, 1998).

É constituído fundamentalmente de substância cinzenta que se agrupa em núcleos. Algumas formações anatômicas do hipotálamo são visíveis na face inferior do cérebro como o quiasma óptico, o túber cinério, o infundíbulo e os corpos mamilares (Kandel, 1997).

O hipotálamo apresenta uma dimensão pequena se comparada com o cérebro como um todo, mas, apesar disso, possui diversas funções que faz dele uma das estruturas mais importantes do SNC. Todas essas funções estão criticamente envolvidas na manutenção da homeostase do organismo e na coordenação de vários processos fisiológicos.

O hipotálamo atua em conjunto com áreas corticais de controle, que se encarregam dos estados motivacionais; com sistemas motores somáticos que comandam os comportamentos correspondentes; e com sistemas eferentes neurais e humorais, como o sistema nervoso autônomo, o sistema endócrino e, indiretamente, o imunológico (Lent, 2004).

Inicialmente, duas regiões foram identificadas como principais integradoras do comportamento sexual: a POA e o VMH (Gorski, 1999).

Nas fêmeas, o VMH controla os comportamentos de posicionamento sexual para a cópula. Ratas com esse núcleo lesado bilateralmente não curvam a coluna vertebral (provocando uma lordose) como é característico da sua atitude receptiva em relação ao macho. Além disso, a curvatura é imediatamente provocada em ratas normais que receberam estradiol através de microcânulas posicionadas no VMH (Rosenzweig *et al.*, 2000).

Nos machos, a POA (mais especificamente o MPN) é quem comanda a motivação e ativação do comportamento de acasalamento. Ratos submetidos a lesões desse núcleo não exibem comportamento de montar as fêmeas. Por outro lado, esse comportamento é provocado em ratos normais quando se infundem andrógenos localmente na MPO. Nas ratas, a lesão da POA interrompe o ciclo estral (Rosenzweig *et al.*, 2000).

Em roedores observou-se que o SDN-POA é cerca de três vezes maior em machos (Gorski *et al.*, 1980), e uma região análoga do hipotálamo humano é maior em homens (Allen *et al.*, 1989; Byne *et al.*, 2000 e LeVay, 1991).

Há vários grupos de neurônios chamados de INAH. O grupo INAH-1 parece ser o análogo humano do SDN-POA de ratos, já os grupos 2 e 3 são evidentemente maiores (cerca de duas a três vezes) em homens do que em mulheres (Damiani *et al.*, 2005).

1.4 *Imprinting* estrogênico

A exposição perinatal e neonatal ao estrógeno e a manifestação dos seus efeitos na adolescência e na vida adulta denomina-se *imprinting* estrogênico. A exposição do recém nascido a substâncias com caráter estrogênico, e não somente o estrógeno, promove mudanças permanentes na função reprodutiva dos indivíduos por afetar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Bellido *et al.*, 1985).

Dentre os efeitos diretos do *imprinting* estrogênico, encontram-se resposta reduzida a andrógenos na próstata. Este efeito é bem caracterizado pelo fato de que a expressão do AR, reduzida a 6,4% do nível dos controles, atinge apenas 43% dos mesmos níveis controles se os animais forem tratados com reposição androgênica (Rajfer e Coffey, 1979; Naslund e Coffey, 1986).

Além disso, animais adultos estrogenizados apresentam atrofia dos testículos, da vesícula seminal, e do músculo elevador do ânus (Kincl *et al.*, 1965; Aguilar *et al.*, 1984), diminuição da produção de T (Frick; Chang; Kincl, 1969), diminuição do volume prostático (Putz et al., 2001) entre outras alterações no sistema reprodutor masculino.

No SNC os efeitos do *imprinting* estrogênico são múltiplos e incluem a não defeminização (manutenção de comportamentos típicos de fêmeas) e não-masculinização (desenvolvimento incompleto de comportamentos típicos de machos) do hipotálamo, causando distúrbios no comportamento sexual (Dohler, 1991; Pereira *et al.*, 1997; Piffer e Pereira, 2004). Além disso, os mecanismos envolvidos no *imprinting* são distintos para machos e fêmeas (Pereira, 2003).

Embora sejam conhecidos alguns efeitos do *imprinting* estrogênico, como mencionado acima, o mecanismo molecular envolvido permanece desconhecido, e a sua ação sobre o SNC necessita de maiores esclarecimentos.

O interesse nos mecanismos celulares e moleculares que envolvem o desenvolvimento e diferenciação sexual do SNC surge, portanto, a partir dos resultados observados nos órgãos do sistema reprodutor masculino após o *imprinting* estrogênico. Doses altas de estrógeno promovem alterações importantes em vários órgãos e glândulas do sistema reprodutor, assim como mudanças em todo o eixo hipotálamo-hipófise-testículos.

Com isso, a hipótese do presente trabalho é que o padrão de expressão do AR, que nos órgãos do sistema reprodutor sofre alterações pelo *imprinting* estrogênico, tenha um papel importante na diferenciação sexual do SNC, o que é pouco discutido na literatura atual.

Diante disso, o estudo propôs a caracterização dos aspectos relacionados aos mecanismos gerais envolvidos no *imprinting* estrogênico. Para tanto, foi analisado o padrão de distribuição do AR no hipotálamo, bem como a caracterização de variações no padrão de expressão do conteúdo total de AR e do correspondente RNAm.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito do *imprinting* estrogênico sobre a expressão do AR no hipotálamo de ratos machos, e que possam explicar, ao menos em parte, os efeitos do estrógeno sobre o desenvolvimento sexual cerebral. Para isto, foram analisados:

1. Os níveis de expressão do AR hipotalâmico por *Western blotting*,
2. Os níveis de expressão do RNAm do AR hipotalâmico por RT-PCR,
3. O padrão de distribuição do AR em regiões hipotalâmicas relacionadas à regulação do comportamento sexual, por imunistoquímica.

3. Artigo

Effects of estrogen imprinting on the androgen receptor expression in the hypothalamus of Wistar rats

Elusa Cristina Oliveira, Jackson Cioni Bittencourt, Hernandes Carvalho.

Effects of estrogen imprinting on the androgen receptor expression in the hypothalamus of Wistar rats

Elusa Cristina Oliveira, Jackson Cioni Bittencourt, Hernandes Carvalho.

Dept. of Cell Biology – State University of Campinas (UNICAMP)
Campinas SP, Brazil

Key words: brain sexual differentiation, hypothalamus, estrogenic imprinting, androgen receptor.

Running Title: Estrogenic imprinting and hypothalamus.

Grant sponsor: CAPES, FAPESP, CNPq

Corresponding author: Hernandes F Carvalho

Dept. Cell Biology – UNICAMP

Institute of Biology - CP 6109

Zip Code 13083-863 Campinas, SP, Brazil

Tel: 55 19 35216118

Fax: 55 19 35216111

E-mail: hern@unicamp.br

3.1 Resumo

Com o propósito de investigar a participação do estrógeno e a sua influência sobre os ARs durante o período de diferenciação sexual cerebral, ratos Wistar machos foram tratados na fase neonatal com E2 e comparados com ratos controle (tratados apenas com óleo de milho) e com fêmeas que não receberam nenhum tratamento farmacológico. As alterações foram analisadas no hipotálamo dos animais na fase adulta, pelas técnicas de *Western blotting*, RT-PCR e imunoistoquímica. A estrogenização neonatal promoveu nos ratos machos diminuição do peso absoluto e relativo da próstata, diminuição no conteúdo de AR, diminuição na expressão do RNAm do AR, e a imunoistoquímica revelou que o padrão de distribuição do AR nos núcleos ventromedial, pré-óptico medial anterior e paraventricular, e, área pré-óptica dos animais estrogenizados modifica-se aproximando-se do padrão apresentado por fêmeas.

Palavras-chave: diferenciação sexual cerebral, hipotálamo, *imprinting* estrogênico, receptor de andrógeno.

3.2 Abstract

In order to investigate the participation of estrogen and its influence on the ARs) during the period of brain sexual differentiation, male Wistar rats were treated with E2 in the neonatal phase and compared in the adulthood with control rats (only treated with oil corn) and with not treated females. The alterations were analyzed in the hypothalamus, by techniques of the Western blotting, RT-PCR and immunohistochemistry. The neonatal estrogenization in the male rats a significant decreased weight of the prostate, the content of AR, and the expression of the mRNA of the AR. Moreover, the immunohistochemistry revealed that the AR distribution pattern of the ventromedial, anterior medial preoptic and paraventricular nucleus and preoptic area were altered and did not show significative difference in comparison with females.

Key words: androgen receptor, brain sexual differentiation, estrogen imprinting, hypothalamus.

3.3 Introdução

Em mamíferos, a diferenciação sexual inicia-se com a determinação genética das gônadas, que por sua vez determinará a diferenciação sexual cerebral pela secreção dos hormônios esteróides sexuais (McCarthy *et al.*, 1997).

Antes do período crítico do desenvolvimento, o SNC dos mamíferos está organizado intrinsecamente como feminino, e a diferenciação para padrões masculinos ocorre como resultado da exposição aos hormônios testiculares durante o desenvolvimento (MacLusky e Naftolin, 1981).

Com isso, o SNC de mamíferos apresenta dimorfismos, sendo estes mais evidentes no hipotálamo, demonstrando que a influência hormonal no período gestacional e pós-natal direciona a sua diferenciação sexual (Damiani *et al.*, 2005).

Nos machos, a exposição à T durante o período crítico promove a supressão de características femininas (defeminização), e a conversão de T a estrógeno pela citocromo p450 aromatase induz a características masculinas (masculinização) (Pereira *et al.*, 2003).

A diferenciação sexual do cérebro começa no período perinatal após um abrupto aumento de T em ratos, camundongos, cavalos e humanos do sexo masculino (Pereira *et al.*, 2003).

Em ratos, esse pico hormonal ocorre entre o 13º dia de desenvolvimento fetal até o 10º dia após o nascimento e tem um efeito permanente durante a vida (MacLusky e Naftolin, 1981; Csaba, 2000).

A concentração de T aumenta cerca de 400% entre 0 hora no útero e 2 horas após o nascimento, em roedores, enquanto em humanos aumenta durante as primeiras 12 horas após o nascimento (Corbier *et al.*, 1992).

Esses momentos são caracterizados como críticos e promovem o *imprinting* hormonal, um fenômeno dependente do tempo e da concentração hormonal a qual o animal foi exposto (Csaba, 2000).

Por outro lado, no período neonatal o estrógeno tem ação muito importante no desenvolvimento psicosexual do rato macho (Pereira *et al.*, 2003).

A função reprodutiva de roedores do sexo masculino depende da ação estrogênica adequada nos diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-testículos, promovendo a

masculinização de áreas cerebrais relacionadas à reprodução e regulação do comportamento sexual (Tena-Sempere *et al.*, 2000).

Apesar disso, animais adultos que receberam altas doses de estrógeno durante o período neonatal apresentam atrofia dos testículos, da vesícula seminal e do músculo elevador do ânus (Kincl *et al.*, 1965; Aguilar *et al.*, 1984); alteração no desenvolvimento prostático por uma alta regulação do ER α e baixa regulação do AR (citado em Putz *et al.*, 2001); diminuição da produção de T (Frick; Chang; Kincl, 1969); diminuição da concentração de GnRH e consequente alteração na secreção de gonadotrofinas pela hipófise (Tena-Sempere *et al.*, 2001) entre outras alterações no sistema reprodutor masculino, o que demonstra que a exposição a altas doses de estrógeno durante o período crítico do desenvolvimento resulta em danos permanentes observados na idade adulta (Tena-Sempere *et al.*, 2001).

Neste contexto, a caracterização dos mecanismos moleculares sob os efeitos da exposição ao estrógeno durante o período neonatal merece considerável atenção. Entretanto, poucos estudos têm dado atenção aos eventos moleculares da estrogenização no SNC, especificamente no hipotálamo.

Diante disso, o presente trabalho investigou as alterações induzidas pela estrogenização neonatal sobre a expressão do AR no hipotálamo, acreditando que o mesmo tenha ação mais importante na diferenciação sexual do SNC do que se tem creditado. Para tanto, verificou-se o padrão de distribuição do AR em áreas específicas do hipotálamo, bem como a caracterização de variações no padrão de expressão do conteúdo total de AR e do correspondente RNAm hipotalâmico.

Os dados encontrados indicam que o estrógeno é capaz de promover *imprinting* neonatal no hipotálamo e alterar a expressão do AR, o que possivelmente pode afetar o comportamento sexual desses animais.

3.4 Materiais e Métodos

3.4.1 Grupos Experimentais

Os experimentos seguiram as normas adotadas pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP conforme o protocolo anexado no final do trabalho.

Ratos machos tratados com 17 β -estradiol

Ratos Wistar adquiridos do CEMIB-UNICAMP (Centro de Bioterismo Multidisciplinar de Investigação Biológica) foram acasalados e a prenhez acompanhada para determinação do dia do nascimento. Os recém-nascidos do sexo masculino receberam três doses de 15mg/kg de β -estradiol (1,3,5[10]-Estratriene-3, 17 β -diol, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) dissolvido em 25 μ L de óleo de milho nos dias 1, 3 e 5 após o nascimento, por meio de injeções subcutâneas conforme descrito em Putz *et al.* (2001 - a).

Ratos machos controle

Os animais do grupo controle receberam apenas óleo de milho no mesmo período e dosagem.

Ratas fêmeas controle

As ratas fêmeas foram também adquiridas pelo acasalamento dos animais do CEMIB e não receberam nenhum tratamento farmacológico.

Aos 21 dias de idade os animais foram desmamados e mantidos em gaiolas, em grupos de 3-4 animais por gaiola, onde tinham acesso livre à ração e água. Todos os animais foram mantidos sob o ciclo de 12 horas de luz e 12 horas no escuro.

3.4.2 Remoção de material

Aos 90 dias de idade os animais foram pesados e sacrificados. Para as análises imunoistoquímicas alguns animais receberam 1 mL de hidrato de cloral via intraperitoneal, e em seguida foram perfundidos via intracardíaca com solução salina a 0,9% e posteriormente formaldeído a 4% pH 9,5, obtido a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65° C. Após a perfusão foram realizados os procedimentos de dissecação dos encéfalos, pós-fixação e crioproteção. Para as análises bioquímicas e moleculares os animais receberam via intraperitoneal os anestésicos cloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), e os encéfalos foram retirados rapidamente e em seguida dissecados os hipotálamos, que foram estocados em freezer a -70° C. As próstatas ventrais também foram coletadas e pesadas para verificação da eficiência do tratamento por tratar-se de órgão alvo direto do *imprinting* estrogênico (Putz *et al.*, 2001 - a).

3.4.3 Análise do material coletado

Para completa análise dos hipotálamos foram utilizadas as seguintes técnicas:

Extração de proteínas

Os hipotálamos estocados em freezer foram fragmentados em nitrogênio líquido e homogeneizados por 1 minuto em Polytron (Kinematica AG, Lucerne, Suíça) em uma solução contendo 150mM de NaCl, Triton X100 a 1%, 1mM de EDTA, 10mM de Tris-HCl pH 7,4, 1mM de EGTA, 1mM de HEPES, 100mM de PMSF e 10 µL/mL do coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich), na proporção de 250mg de tecido para 1 mL de tampão. Após este procedimento as amostras foram submetidas a duas centrifugações de 9000 rpm a 4° C por 10 minutos cada, sendo o sobrenadante final o extrato total, que posteriormente foram quantificados pelo reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Estados Unidos).

Eletroforese

Posteriormente, seguiu-se eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% com a aplicação de 75µg do extrato total de proteínas fervido por 5 minutos em tampão de amostra com condição redutora. Utilizou-se padrão de peso molecular para o acompanhamento da corrida, pré-corado com Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories).

Western blotting

Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer-Scientific Instruments, San Francisco, CA, Estados Unidos) para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brasil) sob corrente constante de 400mA por uma hora em cuba refrigerada a 4°C. A qualidade da transferência de proteínas foi analisada pela coloração das membranas com Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em TBS-T por 1 hora sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, incubadas *overnight* a 4° C com leite em pó desnatado a 1% em TBS-T contendo o anticorpo policlonal obtido em coelho para detecção de receptor de andrógeno (N-20, cód. sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) na diluição 1:500. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário com peroxidase conjugada (A-6154, Zymed-Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, Estados Unidos) na diluição

1:2500. Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi revelada através do sistema Hybond- ECL (Amersham BioSciences), expondo a membrana ao filme X-Omat da Kodak (New Haven, CT, Estados Unidos) por 1 minuto. A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria das bandas (*Software* Kodak Digital Science 1D 3.6, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, Estados Unidos).

Extração de RNA

Foi adotada a seguinte seqüência de procedimentos tendo o cuidado de eliminar quaisquer resíduos de RNase:

Os hipotálamos congelados em freezer foram colocados em microtubos contendo 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e homogenizados diretamente no Polytron (Kinematica AG). Em seguida foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, e o material foi homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. Após esta segunda incubação, o material foi centrifugado por 20 minutos, a velocidade de 13.000 rpm a 8°C.

A fase aquosa e translúcida (sobrenadante) obtida após a centrifugação foi retirada, tranferida para outro microtubo e precipitada por intermédio da incubação de 10 minutos com 0,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente. Esse material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 8°C. O sedimento formado foi lavado com etanol 75% a -4° C e ressuspendido utilizando Vórtex (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil), e posteriormente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 8°C. Em seguida, os microtubos foram destampados e colocados no Speed Vac (Uniequip, Martinsried, Munich, Alemanha) para evaporação do etanol. Após a evaporação o sedimento foi ressuspendido em 50 µL água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C por 10 minutos para a inativação de qualquer resíduo possível de RNase. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria usando o aparelho Ultraspec 2100 Pro (Amersham Biosciences). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em um gel denaturante de agarose a 1,2%.

Transcrição de cDNA com SuperScript (SSIII)

O RNA extraído foi diluído em água tratada com DEPC, em um volume final de 50 μ L e aquecido a 65°C por 3 minutos, sendo em seguida imediatamente transferido para um banho de gelo. A concentração de RNA utilizada para transcrição foi 5 μ g. Em microtubos de 0,2 mL foram preparadas misturas contendo 1 μ L de oligo dT (Invitrogen Corporation), 1 μ L de dNTP, e água DEPC para um volume final de 13 μ L, onde se adicionou o RNA já diluído, e em seguida aqueceu-se a 60°C por 5 minutos. Posteriormente, acrescentou-se à mistura 4 μ L de tampão 5x, 1 μ L de DTT, 1 μ L de RNaseOUT, 1 μ L de SSIII (Invitrogen Corporation) em um volume final de 20 μ L. A transcrição foi realizada pela incubação das amostras a 50°C por 1 hora, seguida de uma incubação a 70°C por 15 minutos.

RT – PCR

O PCR foi realizado após a transcrição reversa do RNAm, utilizando-se, portanto, o cDNA sintetizado. Para a amplificação do cDNA, foram sintetizados os *sets* de *primers* abaixo (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil). Para o desenho dos mesmos foi utilizado o programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc). Como controle endógeno foi utilizado o gene da β -actina.

AR

Sense 5' – CAC CAT GCA ACT TCT TCA GCA – 3'

Reverse 5' – CGA ATT GCC CCC TAG GTA ACT – 3'

(tamanho do amplificado 150 pb)

β -actina

Sense 5' - CTG GCC TCA CTG TCC ACC TT -3'

Reverse 5' - AGT ACG ATG AGT CCG GCC C -3'

(tamanho do amplificado 65 pb)

Os primers utilizados foram reconstituídos em água DEPC 20 pmoles/mL. A reação foi composta de 1,3 μ L de tampão 10x, 1,04 μ L $MgCl_2$ 25mM; 0,26 μ L de dNTP; 0,26 μ L do primer sense, 0,26 μ L do primer antisense, 100ng do cDNA, 0,078 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen Corporation) e completada com água MilliQ, totalizando um volume de 13 μ L. O

PCR foi realizado com 30 ciclos, com temperatura de anelamento (T_m) de 62°C (para AR) e de 65°C (para β -actina).

As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2,5% e submetidas à eletroforese. Para a verificação das bandas, os géis foram incubados na presença de brometo de etídeo e então observados contra luz ultravioleta. As imagens foram capturadas pelo sistema Kodak EDAS Câmera 290 usando o *software* Kodak Digital Science 1D 3.6, e a densitometria das bandas foi realizada pelo programa Scion Image (Scion Corporation, Rochester, NY, Estados Unidos).

Imunoistoquímica

Como preparação anterior à imunoistoquímica, os animais foram perfundidos conforme citado anteriormente. Em seguida, os encéfalos foram dissecados e pós-fixados em solução de formaldeído a 4% e sacarose a 20% por 24 horas. Após a pós-fixação os encéfalos foram armazenados em solução contendo tampão KPBS e sacarose a 20% até o processamento. Utilizou-se o micrótomo para cortes em congelação Microsystems SM2000R (Leica, Wetzlar, Alemanha), realizando-se cortes seriados de 30 μ m, que em seguida, foram mantidos em solução anticongelante.

Para a análise imunoistoquímica utilizou-se a técnica *free-floating*, pré-estabelecida pelo Laboratório de Neuroanatomia Química do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP-SP, sendo usadas as séries de cortes de cada animal para o procedimento.

Os cortes foram lavados duas vezes (por 10 minutos cada) em KPBS e em seguida bloqueados com peróxido de hidrogênio a 0,3% por 30 minutos. Lavagens de 10 minutos em KPBS foram realizadas posteriormente até não haverem mais bolhas. Em seguida, os cortes foram incubados com 1% do soro de cabra em KPBS *loaded* (solução contendo KPBS e Triton X-100 a 0,3%) por 40 minutos à temperatura ambiente, para inibição das possíveis ligações inespecíficas. Após duas lavagens de 10 minutos cada, os cortes foram então incubados, por 48 horas a 4°C em solução com anticorpo policlonal obtido em coelho para detecção de receptor de andrógeno (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:2000.

Após as 48 horas de incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados duas vezes (10 minutos cada) em KPBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado do kit ABC (PK 6100, Vector Labs, Peterborough, Inglaterra) por 60 minutos à temperatura ambiente na proporção de 1:1000 em KPBS *loaded*. Novas lavagens em KPBS foram realizadas e os cortes

foram incubados por 60 minutos com o complexo avidina-biotina do mesmo kit. Finalizando, novas lavagens com KPBS foram realizadas antes da marcação revelada pela diaminobenzidina (DAB).

Terminada a revelação os cortes foram ordenados em lâminas gelatinizadas e cobertos com lamínulas e DPX (*neutral mounting medium*, Sigma-Aldrich) como meio de montagem.

As imagens foram analisadas pelo programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, New York, NY, Estados Unidos), pela contagem dos núcleos celulares marcados.

Coloração de Nissl

Séries adjacentes de cortes foram ordenadas, montadas em lâminas gelatinizadas e coradas com a técnica de coloração Nissl à base de tionina a 0,25% como referência da citoarquitetura.

3.4.4 Análises Estatísticas

Os resultados numéricos foram submetidos à análise estatística e demonstrados com média $\pm$ desvio padrão. Foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram um valor mínimo de $p \leq 0,01$ para a imunoistoquímica e $p \leq 0,05$ para as demais análises. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Resultados

3.5.1 Variação do peso da próstata frente à aplicação de estrógeno

A dose de E2 utilizada promoveu diminuição do peso da próstata dos animais. A diferença foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao peso das próstatas dos animais controle, tanto nos valores absolutos quanto relativos (**Figura 1**).

3.5.2 Efeito do estrógeno sobre a expressão do AR

Foram verificadas variações no conteúdo da proteína entre os grupos experimentais, pela técnica de *Western blotting*. Para análise completa foi realizada a densitometria das bandas e verificou-se diminuição significativa do conteúdo protéico no grupo tratado com estrógeno em

relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Comparando o grupo tratado com estrógeno e o grupo das fêmeas não foi observada diferença significativa (**Figura 2**).

3.5.3 Níveis de expressão do gene do AR nos grupos experimentais

Após a padronização da quantidade de cDNA, conseguiu-se amplificação do gene do AR nos grupos experimentais. Foi utilizada uma reação para β -actina nas referidas amostras, como controle endógeno.

A análise do produto de reação pela densitometria das bandas obtidas na reação de PCR mostrou intensidade maior do produto de reação para o grupo controle, em relação ao grupo estrogenizado e ao grupo das fêmeas ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos dos animais estrogenizados e o das fêmeas (**Figura 3**).

3.5.4 Variação no padrão de distribuição da imunorreatividade do AR nos núcleos hipotalâmicos

O padrão de distribuição do AR foi analisado por imunoistoquímica nas regiões que têm implicações no comportamento sexual (**Figuras 4 e 5**).

Os animais estrogenizados apresentaram quantidade significativamente menor ($p < 0,01$) de núcleos celulares marcados (AR positivos) na MPO, MPN e VMH, em comparação com os animais controle. Comparando o grupo estrogenizado com o grupo das fêmeas não houve diferença significativa (**Figuras 6, 7 e 8**).

Por outro lado, no PVH de animais do grupo estrogenizado ocorreu aumento significativo ($p < 0,01$) da quantidade de células com núcleos marcados, em comparação com animais do grupo controle. Comparando o grupo estrogenizado com o grupo das fêmeas não houve diferença significativa (**Figura 9**).

3.6 Discussão

O presente estudo foi desenvolvido para a obtenção de informações sobre as alterações na expressão do AR promovidas pela exposição neonatal ao estrógeno.

A administração de altas doses de estrógeno durante o período de diferenciação sexual neonatal resulta em diversos danos no eixo reprodutivo masculino, conforme citado

anteriormente, o que merece a atenção sobre os mecanismos envolvidos nesse evento (Tena-Sempere *et al.*, 2001).

Os pesos das próstatas dos animais controles e tratados permitiram a conclusão de que ocorreu o *imprinting* estrogênico, já que houve inibição do crescimento desta nos animais estrogenizados, conforme os estudos realizados por Putz *et al.* (2001 - a).

As análises por *Western blotting* demonstraram diminuição no conteúdo total de AR no grupo tratado com estrógeno, em relação ao grupo controle, o que indica que o *imprinting* promoveu diminuição na expressão do AR no hipotálamo desses animais. A ausência de diferença significativa entre os grupos de machos tratados e de fêmeas demonstra que a estrogenização dos machos promoveu expressão do AR semelhante à das fêmeas.

A análise por RT-PCR indicou intensidade maior do produto de reação para o grupo controle em comparação ao grupo tratado e ao das fêmeas, demonstrando que houve diminuição na expressão do RNAm do AR, após o *imprinting*. Da mesma forma, comparando-se o grupo de machos estrogenizados com o das fêmeas, não houve diferença estatística, o que condiz com os resultados de *Western blotting*.

Essas duas análises permitem a afirmação de que o estrógeno em doses altas, aplicado durante o período crítico neonatal, promoveu diminuição da expressão do AR no hipotálamo dos ratos machos adultos, demonstrando que de alguma forma ocorreu essa alteração durante o intervalo de tempo entre a estrogenização neonatal até a análise na idade adulta.

De forma geral, os estrógenos têm efeito anti-androgênico sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e, assim, reduzem a produção de T pelos testículos.

A dose alta de E2 atua no eixo hipotálamo-hipófise-testículos possivelmente de duas formas: por ação direta, ou seja, o E2 age sobre os neurônios hipotalâmicos reduzindo a expressão do AR; e/ou por ação indireta pela diminuição da concentração de T circulante, conforme descrito por Putz *et al.* (2001 – a). De acordo com esse trabalho a dose alta de E2 (15mg/kg) também promoveu diminuição da concentração de LH no sangue.

Em roedores as ações do E2 incluem: a masculinização da estruturas cerebrais envolvidas no controle neuroendócrino da função das gônadas e do comportamento reprodutivo; a regulação e liberação do GnRH; o controle direto da secreção hormonal pela hipófise; e a modulação da diferenciação e função das células de Leydig (Tena-Sempere *et al.*, 2001).

De acordo com Kamegai *et al.* (2001) a exposição ou privação de hormônios sexuais durante o período neonatal causa alterações permanentes no perfil de secreção do GH, assim como, a sua responsividade pós-puberdade, sugerindo que hormônios sexuais têm fundamental importância durante este período do desenvolvimento, e, conseqüentemente na vida adulta. Segundo esse trabalho, o E2 influencia o perfil de secreção do GH via ER α .

A análise imunoistoquímica mostrou que o padrão de distribuição do AR modificou-se nos animais estrogenizados. Na MPO e nos VMH e MPN observou-se diminuição na distribuição de AR em relação aos animais controle, e em relação às fêmeas não houve diferença significativa. Já no núcleo PVH observou-se aumento na distribuição do AR em relação aos animais controle, e em relação às fêmeas o padrão foi similar não apresentando diferença significativa.

De acordo com esses experimentos, a estrogenização promoveu alterações na distribuição do AR nas estruturas hipotalâmicas envolvidas na promoção do comportamento sexual, com isso, o perfil de distribuição dos ARs se tornou semelhante ao observado nas fêmeas.

A POA e o núcleo VMH estão diretamente ligados ao comportamento sexual, enquanto o núcleo PVH tem um papel indireto (Roselli *et al.*, 1989; Handa *et al.*, 1987), isso de certa forma pode estar relacionado com a distribuição observada pela reação de imunoistoquímica.

O presente estudo confirma a ação do estrógeno sobre os ARs e conseqüentemente a importância do mesmo no processo de diferenciação sexual cerebral em machos, e sugere que a incompleta masculinização e defeminização do hipotálamo possivelmente ocorreu nos ratos expostos à estrogenização no período neonatal. Os resultados indicam que o *imprinting* estrogênico promoveu alterações a longo prazo na expressão do AR, o que pode ter implicações importantes no comportamento sexual desses animais.

Diante da hipótese de que o estrógeno circulante no organismo não ultrapassa a barreira hemato-encefálica por se ligar a α -fetoproteína, conclui-se que no experimento em questão o estrógeno administrado ultrapassou a barreira hemato-encefálica dos animais recém-nascidos promovendo conseqüentemente alterações na expressão do AR. Essas alterações podem ser explicadas pelo fato de que em neonatos a barreira hemato-encefálica não está completamente formada, ou está mais susceptível a passagem de determinadas substâncias (McGeer *et al.*, 1987), e frente a administração das doses altas nos primeiros cinco dias de vida não houve a seletividade normalmente observada, possivelmente também por acúmulo de moléculas de E2 dificultando a ligação com a α -fetoproteína.

Além disso, conforme os dados discutidos por Baum e Bakker (2008) a α -fetoproteína, no período perinatal, também funciona como transportadora de estrógeno, demonstrando que essa proteína tem importância não somente como neuroprotetora, mas também como carreadora de estrógeno até células alvo cerebrais, o que garante o início da diferenciação feminina. O estrógeno, em pequenas quantidades, se liga a algumas moléculas de α -fetoproteína e ultrapassa a barreira hemato-encefálica promovendo a diferenciação inicial das estruturas cerebrais.

Nos mamíferos de todas as idades, os chamados órgãos circunventriculares estão mais expostos, ou seja, são quimiossensíveis à moléculas presentes no sangue, já que nessas regiões a barreira hemato-encefálica está ausente ou menos desenvolvida. Os órgãos circunventriculares incluem a eminência mediana e o órgão vascular da lâmina terminal (situados no hipotálamo), o órgão subfornicial, o órgão subcomissural, o lobo posterior da hipófise, a glândula pineal e a área postrema (todas essas regiões mantêm conexões com diversos núcleos hipotalâmicos, e a neuro-hipófise possui axônios originados no hipotálamo) (Johnson e Gross, 1993). A POA é contínua com a lâmina terminal sendo também vulnerável a presença de várias moléculas como o estrógeno (McGeer *et al.*, 1987). Portanto, nem todos os órgãos circunventriculares ficam no hipotálamo, mas quase todos mantêm comunicação com ele (Lent, 2004).

Os órgãos circunventriculares são, portanto, afetados por moléculas presentes no sangue que não têm acesso a outras regiões do cérebro, e com isso, são conhecidos como “janelas” através das quais o cérebro pode controlar os órgãos periféricos (Johnson e Gross, 1993).

Há evidências de que neurônios situados em outros núcleos hipotalâmicos possuam características semelhantes aos órgãos circunventriculares em relação à permeabilidade (Lent, 2004).

Os resultados do presente estudo confirmam a importância do estrógeno no processo de diferenciação do SNC de machos, e servem de base para que futuros experimentos sejam desenvolvidos na tentativa de explicar os exatos mecanismos envolvidos nesse processo de diferenciação.

O próximo passo do trabalho é investigar a repercussão do tratamento no comportamento sexual dos animais para a completa análise dos efeitos do *imprinting* estrogênico e a correlação com as alterações observadas nas análises de imunoistoquímica.

3.7 Referências

- Aguilar E, Tejero A, Vaticón MD, Fernandez Galaz C (1984). Dissociation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone control mechanisms in male and female rats by neonatal administration of estradiol benzoate or testosterone propionate. *Hormone Res* 19: 108-116.
- Bakker J, Baum JM (2008). Role for estradiol in female-typical brain and behavior sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29: 1-16.
- Corbier P, Edwards DA, Roffi J (1992). The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochem Biophys* 100: 127-131.
- Csaba G (2000). Hormonal imprinting: its role during the evolution and development of hormones and receptors. *Cell Biol Inter* 24: 407-414.
- Damiani D, Damiani D, Ribeiro TM, Setian N (2005). Brain sex: just beginning to pave the way. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49(1): 37-45.
- Frick J, Chang CC, Kincl FA (1969). Testosterone plasma levels in adult male rats injected neonatally with estradiol benzoate or testosterone propionate. *Steroids* 13: 21-27.
- Handa RJ, Roselli CE, Horton L, Resko JA (1987). The distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain: effects of estrogen treatment. *Endocrinology* 121: 233-240.
- Johnson AK, Gross PM (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7: 678-686.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001). Estrogen receptor ER alpha, but not ER beta, gene is expressed in growth hormone-releasing hormone neurons of the male rat hypothalamus. *Endocrinology* 142: 538- 543.

- Kincl FA, Folch PA, Maqueo M, Herrera Laso L, Oriol A, Dorfman RI (1965). Inhibition of sexual development in male and female rats treated with various steroids at the age of five days. *Acta Endocrinol* 49: 193-206.
- Krause DN, Duckles SP, Pelligrino DA (2006). Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. *J Appl Physiol* 101: 1252- 1261.
- Lent R (2004). Capítulo 13 de Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência, 1ª ed., pp. 486-494. Atheneu, São Paulo, Brasil.
- MacLusky N J, Naftolin F (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1303.
- McCarthy MM, Davis AL, Mong JA (1997). Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Res Bull* 4: 487-495.
- McGeer PL, Eccles SJC, McGeer EG (1987). Capítulo 17 de Molecular neurobiology of the mammalian brain. 2ª ed., pp. 123-127. Plenum Press, New York, USA.
- Pereira OCM, Coneglian-Marise MSP, Gerardin DCC (2003). Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats. *Comp Biochem Physiol A* 134: 545-550.
- Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS (2001 - a). Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod* 65: 1496-1505.
- Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS (2001 – b). Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male reproductive tract. *Biol Reprod* 65: 1506-1517.

- Roselli CE, Handa RJ, Resko JA (1989). Quantitative distribution of nuclear androgen receptors in microdissected areas of the rat brain. *Neuroendocrinology* 49: 449-53.
- Swanson LW (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* 886: 113-164.
- Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, González LC, Huhtaniemi I, Aguilar E (2000). Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor α and β mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 165: 345-357

3.8 Figuras

Figura 1

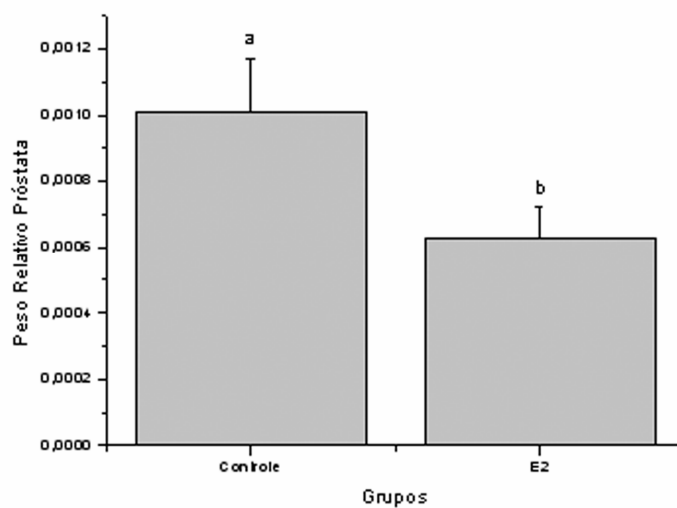


Figura 1 – Variação no peso relativo da próstata ventral de ratos controles e tratados com estrógeno (E2) no período neonatal, em relação ao peso corporal dos animais. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=10$), de um total três testes. A próstata ventral foi utilizada como controle da eficiência do experimento. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA).

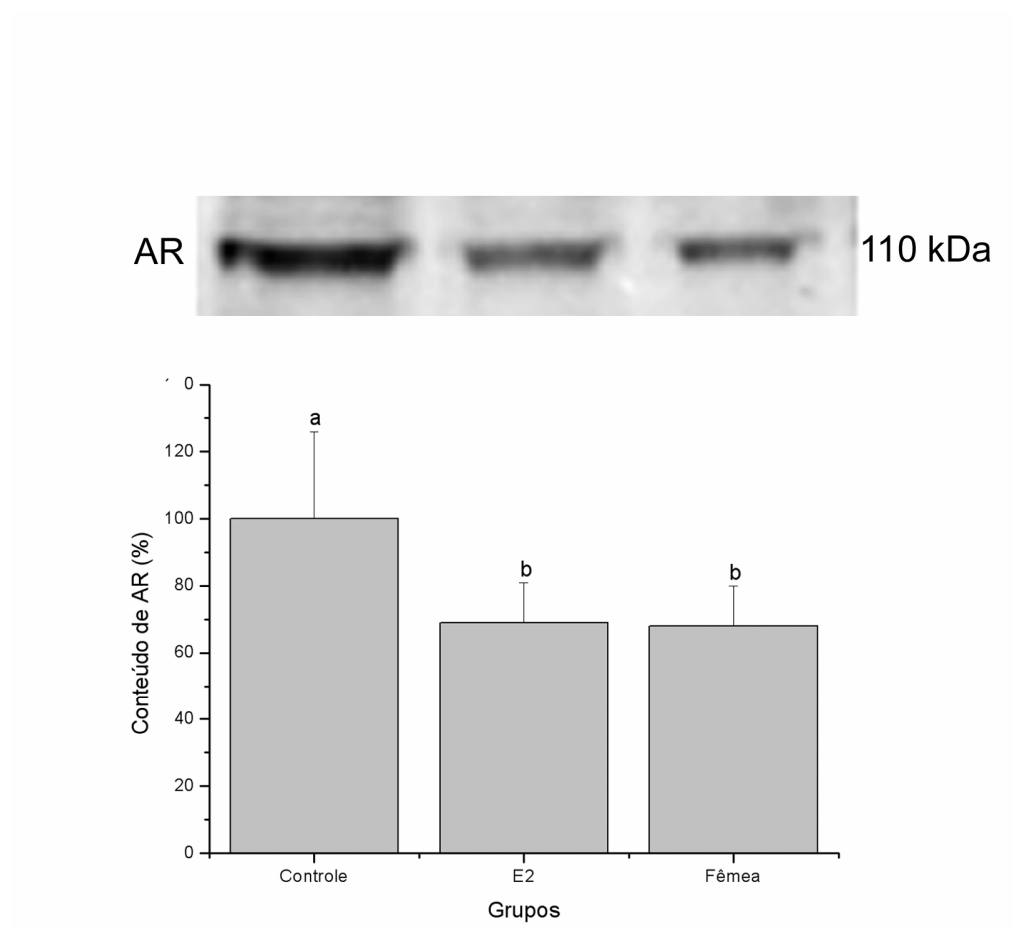
Figura 2

Figura 2 – Variação no conteúdo de AR, conforme determinado por *Western blotting*. Marcação visualizada na altura de 110kDa, indicativo da proteína. Gráfico representando a variação percentual no conteúdo da proteína por densitometria. A condição do grupo controle foi usada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou diminuição em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=8$), de um total de três testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

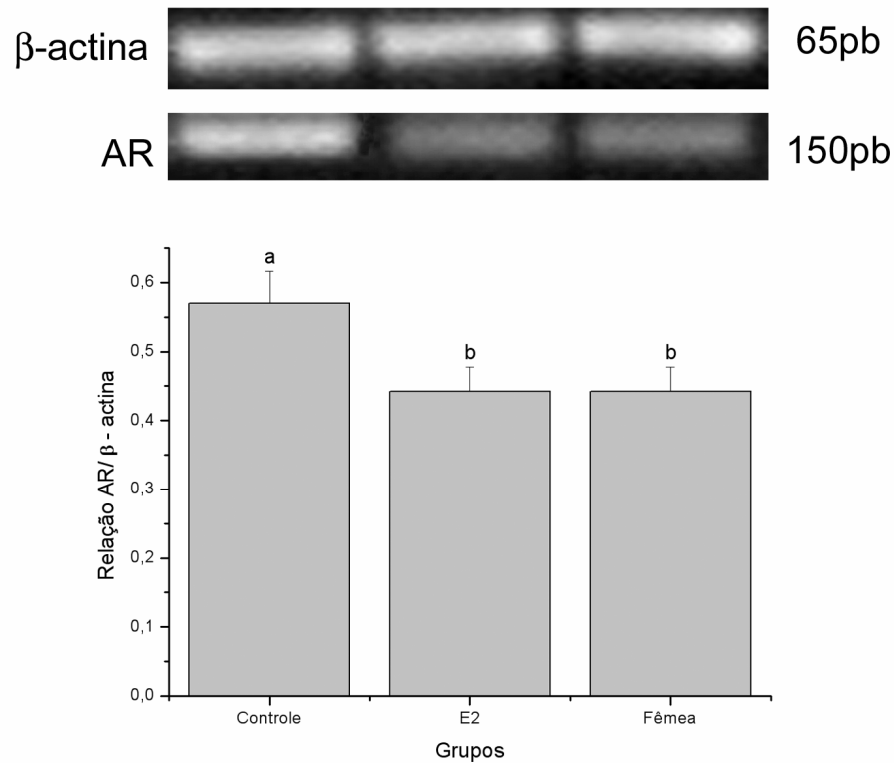
Figura 3

Figura 3 – Níveis de RNAm do AR e β -actina nos diferentes grupos experimentais. Foram utilizados 100 ng de cDNA nas condições de 2mM de $MgCl_2$ e T_m de 62°C e 65°C, respectivamente. Gráfico da intensidade relativa do produto de amplificação do cDNA do AR por PCR em relação ao dados obtidos pela reação com o controle endógeno β -actina. A intensidade do produto de reação para os animais controle foi utilizada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou diminuição em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=8), de um total de três testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

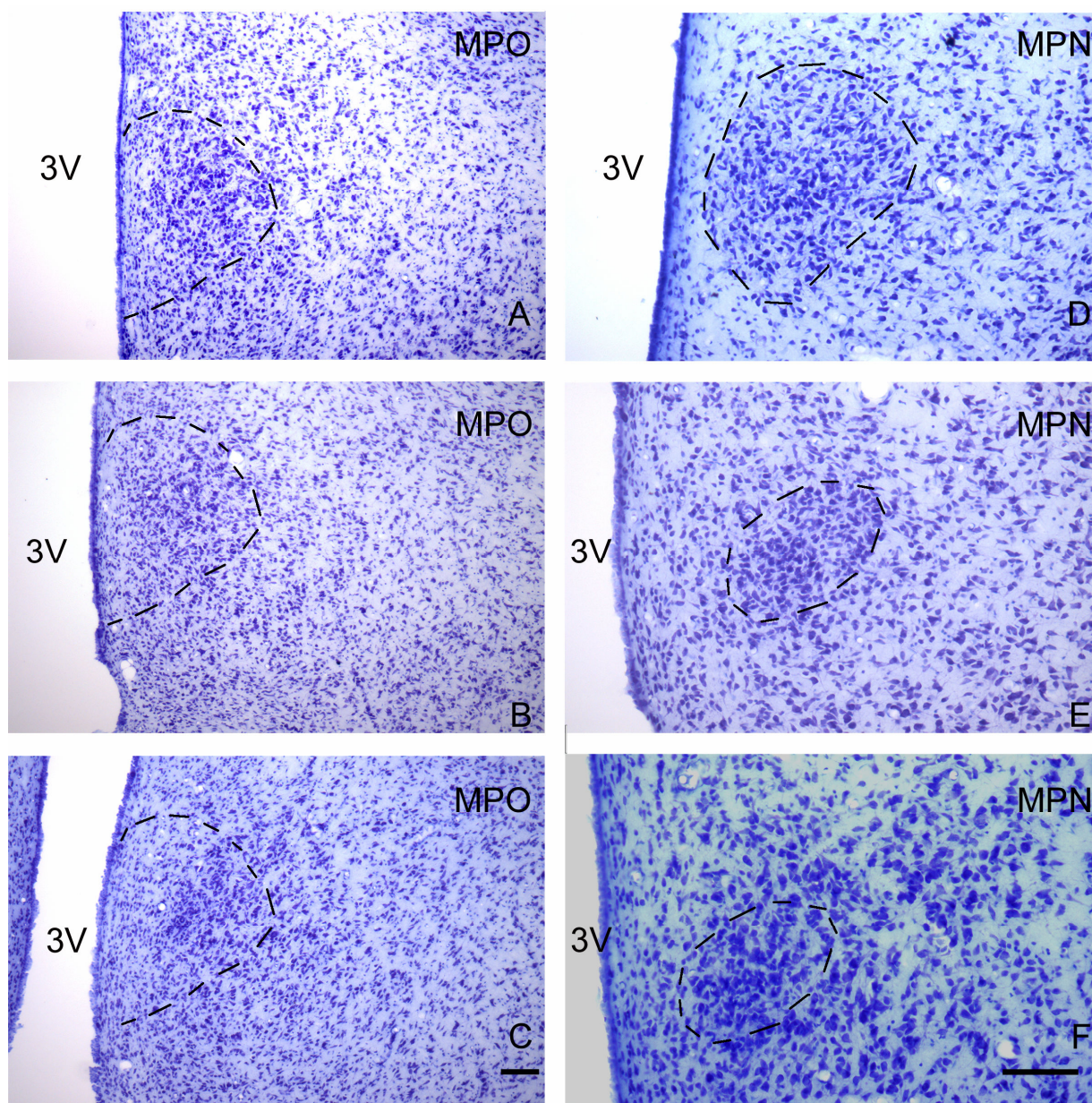
Figura 4

Figura 4 – Coloração de Nissl (ratos adultos com 90 dias de idade). Área pré-óptica medial (MPO) animal grupo controle (A), grupo estrogenizado (B), grupo fêmeas (C). Núcleo pré-óptico medial anterior (MPN) grupo controle (D), grupo estrogenizado (E), grupo fêmeas (F). As respectivas áreas estão delineadas por tracejados, 3V = terceiro ventrículo. As escalas indicam 100 μm.

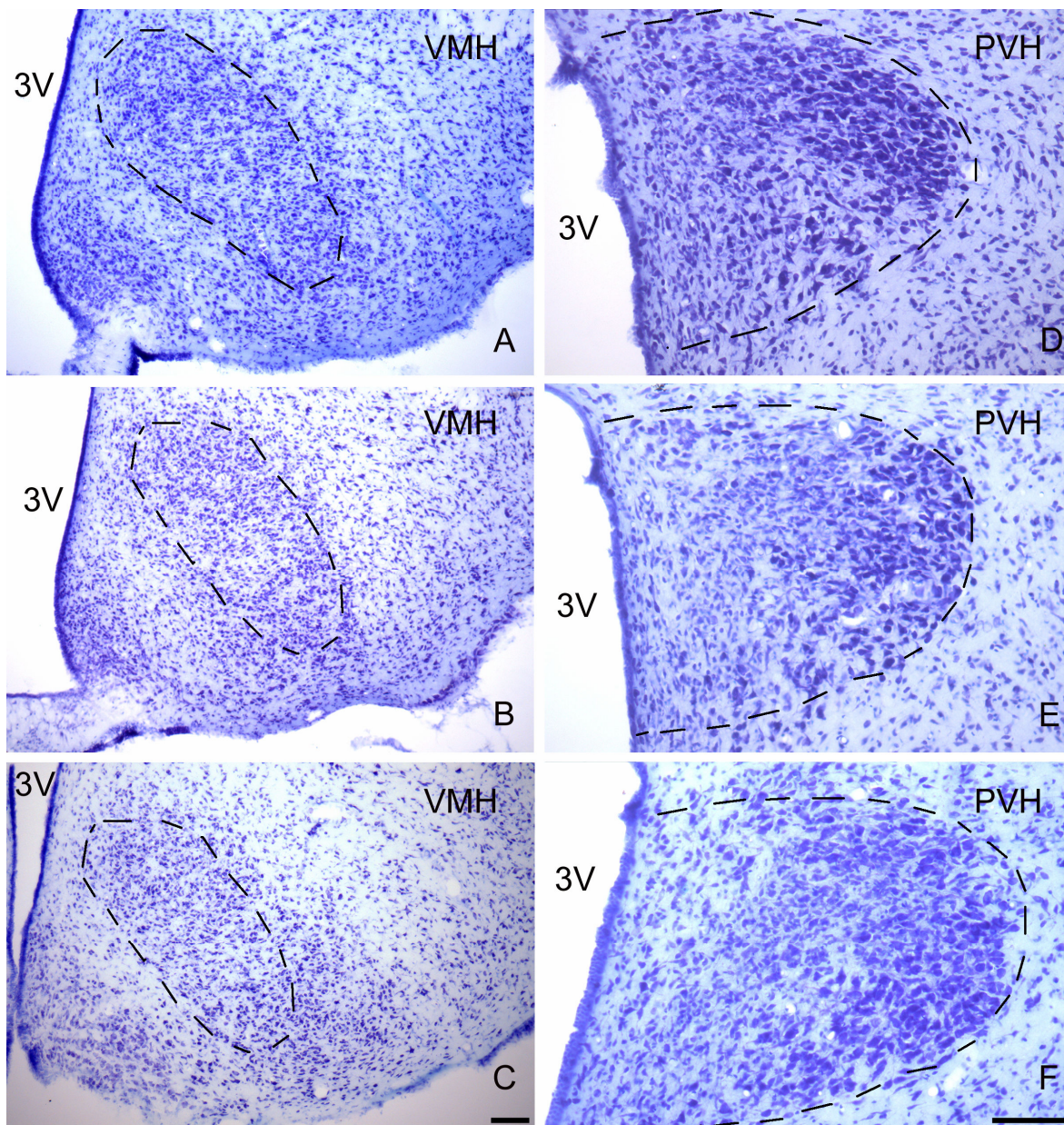
Figura 5

Figura 5 - Coloração de Nissl (ratos adultos com 90 dias de idade). Núcleo ventromedial (VMH) animal grupo controle (A), grupo estrogenizado (B), grupo fêmeas (C). Núcleo paraventricular (PVH) grupo controle (D), grupo estrogenizado (E), grupo fêmeas (F). As respectivas áreas estão delineadas por tracejados, 3V = terceiro ventrículo. As escalas indicam 100 μ m.

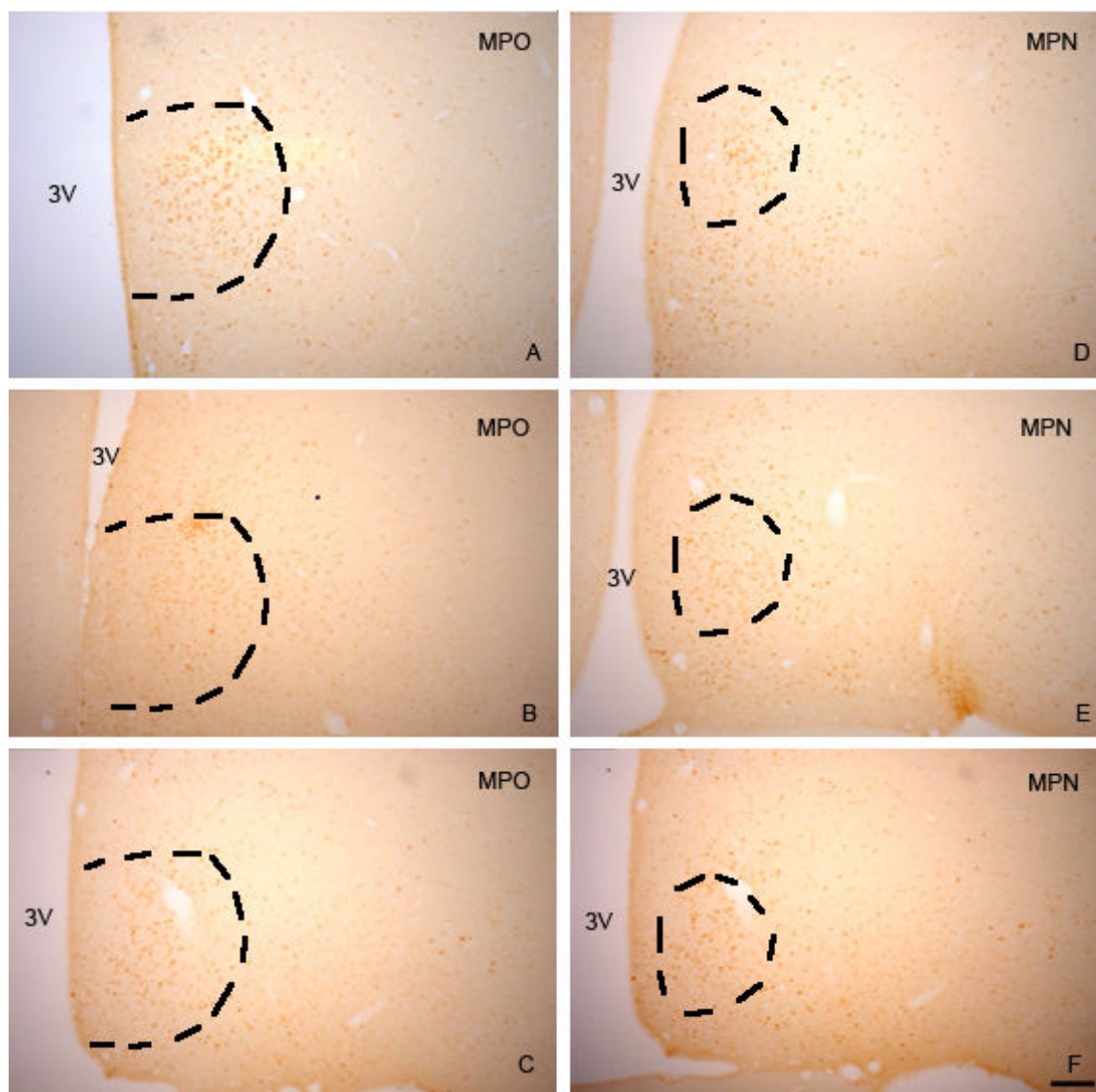
Figura 6

Figura 6 - Marcação imunoistoquímica do AR no hipotálamo de ratos adultos (90 dias de idade). O AR foi localizado no núcleo dos neurônios. O tratamento com E2 diminuiu a quantidade de núcleos marcados na área pré-óptica medial (MPO). Animal grupo controle (A), grupo estrogenizado (B), grupo fêmeas (C). O tratamento com E2 diminuiu a quantidade de núcleos marcados no núcleo pré-óptico medial anterior (MPN). Grupo controle (D), grupo estrogenizado (E), grupo fêmeas (F). As respectivas áreas estão delineadas por tracejados, 3V = terceiro ventrículo. A escala indica 100 μ m.

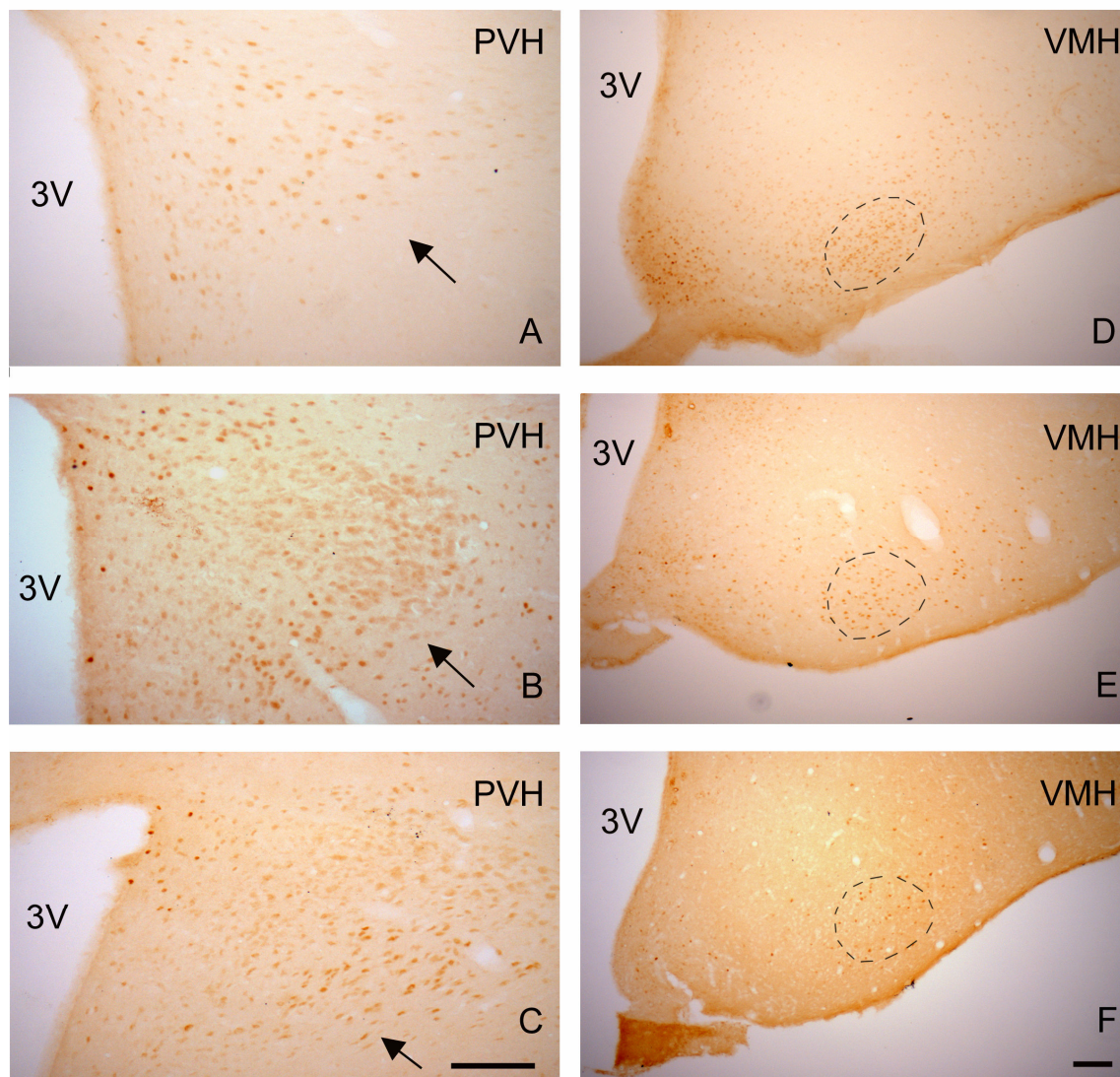
Figura 7

Figura 6 - Marcação imunoistoquímica do AR no hipotálamo de ratos adultos (90 dias de idade). O AR foi localizado no núcleo dos neurônios. O tratamento com E2 aumentou a quantidade de núcleos marcados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Animal grupo controle (A), grupo estrogenizado (B), grupo fêmeas (C). O tratamento com E2 diminuiu a quantidade de núcleos marcados núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH). Grupo controle (D), grupo estrogenizado (E), grupo fêmeas (F). O PVH está indicado por setas e o VMH está delineado por tracejados, 3V = terceiro ventrículo. As escalas indicam 100 μ m.

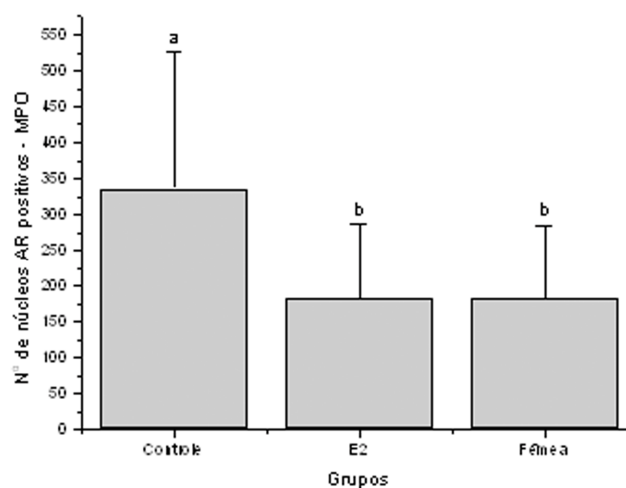
Figura 8

Figura 8 – Gráfico representando a quantificação de núcleos celulares marcados pela reação de imunohistoquímica para AR na área pré-óptica medial (MPO), realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus. A marcação nos animais controles foi utilizada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou menor quantidade de núcleos AR positivos em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=6$), de um total de dois testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p<0,01$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

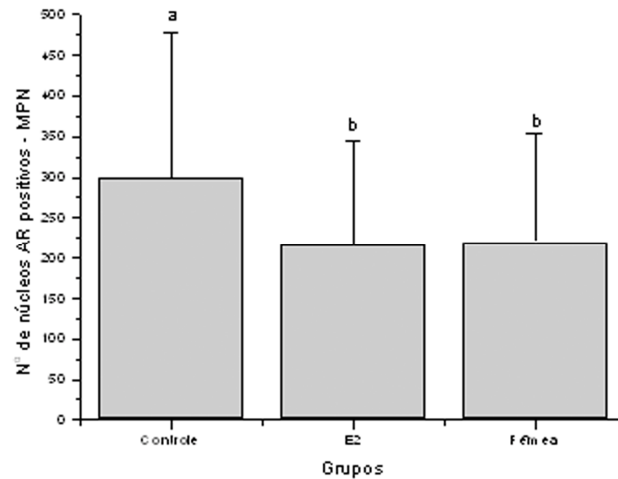
Figura 9

Figura 9 - Gráfico representando a quantificação de núcleos celulares marcados pela reação de imunohistoquímica para AR no núcleo pré-óptico medial anterior (MPN), realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus. A marcação nos animais controles foi utilizada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou menor quantidade de núcleos AR positivos em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=6$), de um total de dois testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p<0,01$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

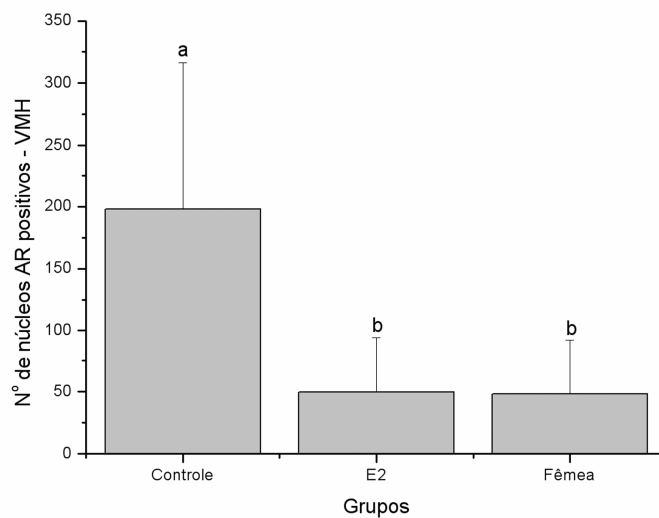
Figura 10

Figura 10 - Gráfico representando a quantificação de núcleos celulares marcados pela reação de imunohistoquímica para AR no núcleo ventromedial (VMH), realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus. A marcação nos animais controles foi utilizada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou menor quantidade de núcleos AR positivos em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=6$), de um total de dois testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p<0,01$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

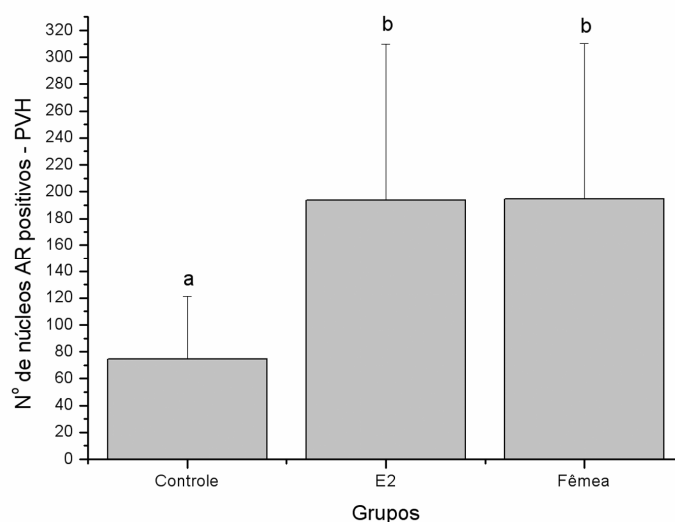
Figura 11

Figura 11 - Gráfico representando a quantificação de núcleos celulares marcados pela reação de imunistoquímica para AR no núcleo paraventricular (PVH), realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus. A marcação nos animais controles foi utilizada como referência. O grupo tratado com estrógeno (E2) apresentou maior quantidade de núcleos AR positivos em relação ao controle e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo das fêmeas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=6), de um total de dois testes. As letras **a** e **b** significam as diferenças estatísticas ($p < 0,01$) entre os grupos. Os valores foram submetidos à análise estatística (ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

4. Conclusões Gerais

O *imprinting* estrogênico promoveu diminuição no conteúdo total de AR e do correspondente RNAm no hipotálamo, diminuição do número de núcleos celulares marcados (AR positivos) na área pré-óptica, nos núcleos ventromedial e pré-óptico medial anterior, e correspondente aumento no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Conclui-se, portanto, que em ratos *Wistar*, a administração pós-natal de estrógeno afeta a expressão localizada do AR no hipotálamo na idade adulta, o que pode ter efeito sobre o comportamento sexual desses animais.

5. Referências

- Aguilar E, Tejero A, Vaticón MD, Fernandez Galaz C (1984). Dissociation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone control mechanisms in male and female rats by neonatal administration of estradiol benzoate or testosterone propionate. *Hormone Res* 19: 108-116.
- Allen LS, Hines M, Shryne JE, Gorski RA (1989). Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J Neurosci* 9: 497-506.
- Arnold AP, Xu J, Grisham W, Chen X, Kim Y, Itoh Y (2004). Minireview: Sex chromosomes and brain sexual differentiation. *Endocrinology* 1057-1062.
- Balthazar J, Baillien M, Cornil CA, Ball GF (2004). Preoptic aromatase modules male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiol Behav* 83: 247-270.
- Bakker J, Baum JM (2008). Role for estradiol in female-typical brain and behavior sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29: 1-16.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2004). Restoration of male sexual behavior by adult exogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behavior* 46 (1): 1-10.
- Bayne EH, Allshire RC (2005). RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 21: 310-373.
- Beato M (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- Bellido C, Gaytán F, Aguilar R, Pinilla L, Aguilar E (1985). Prepuberal reproductive defects in neonatal estrogenized male rats. *Biol Reproduc* 33: 381-387.
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP (2002). Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology* 143: 4922-4933.

- Byne W, Lasco MS, Kemether E, Shinwari A., Edgar MA., Morgello S, Jones LB, Tobet S (2000). The interstitial nuclei of the human anterior hypothalamus: an investigation of sexual variation in volume and cell size, number and density. *Brain Res* 856: 254–258.
- Carreau S, Lambard S, Delaland C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 35.
- Carvalho HF, Line SR (1996). Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20: 809-819.
- Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, Bottero D, Vitale F, Migliaccio A, Auricchio F (2003). Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *J Cell Biol* 161: 547-556.
- Cenni B, Picard D (1999). Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends Endocrinol Metab* 10: 41-46.
- Chang WY, Wilson MJ, Birch L, Prins GS (1999). Neonatal estrogen stimulates proliferation of periductal fibroblasts and alters the extracellular matrix composition in the rat prostate. *Endocrinology* 140: 405-415.
- Choong CS, Wilson EM (1998). Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *J Molec Endocrinol* 21: 235-257.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19: 323–362.
- Corbier P, Edwards DA, Roffi J (1992). The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochem Biophys* 100: 127-131.

- Corradi LS, Goes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004). Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72: 198-208.
- Csaba G (2000). Hormonal imprinting: its role during the evolution and development of hormones and receptors. *Cell Biol Inter* 24: 407-414.
- Culig Z, Bartsch G, Hobisch A (2002). Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol* 197: 231-238.
- Damiani D, Billerbeck AEC, Goldberg ACK, Setian N, Fellous M, Kalil J (1990). Investigation of the ZFY gene in XX true hermaphroditism and Swyer syndrome. *Hum Genet* 85: 85-88.
- Damiani D, Damiani D, Ribeiro TM, Setian N (2005). Brain sex: just beginning to pave the way. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49 (1): 37-45.
- De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang L, Scordalakes EM, Auger CJ, et al (2002). A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neuroscience* 22: 9005-9014.
- Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilian E (2003). Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol Brain Res* 118: 82-90.
- Dohle GR, Smit M, Weber RFA (2003). Androgens and male fertility. *World J Urol* 21: 341-345.
- Dohler KD (1991). The pre and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol* 131: 1-57.
- Folkman J (1998). Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence. *Endocrinology* 139: 441-442.

- Frick J, Chang CC, Kincl FA (1969). Testosterone plasma levels in adult male rats injected neonatally with estradiol benzoate or testosterone propionate. *Steroids* 13: 21-27.
- Fu M, Wang C, Zhang X, Pestell RG (2004). Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 6: 1199-208.
- Gao T, McPhaul MJ (1998). Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 12: 654-663.
- Garcia-Florez M, Carvalho HF (2005). Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res* 38: 487-497.
- Goy RW, McEwen BS (1980). Sexual differentiation of the brain. MIT Press Cambridge, MA.
- Gorski R.A., Harlan RE., Jacobsen CD., Shryne JE, Southam AM (1980). Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 193: 529-539.
- Gorski RA (1999). Development of the cerebral cortex: XV. Sexual differentiation of the central nervous system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 344-346.
- Hååg P, Bektic J, Bartsch G, Klocker H, Eder IE (2005). Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in adrogen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* (Publicado *on line*, antes da impressão).
- Handa RJ, Roselli CE, Horton L, Resko JA (1987). The quantitative distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain: effects of estrogen treatment. *Endocrinology* 121: 233-40.

- Harris RA, Crabb DW (2002). Metabolics inter-relations. Capítulo 20, Parte IV de Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 5^a ed., pp. 790-791. John Wiley and Sons Inc, New York, EUA.
- Heinlein CA, Chang C (2002). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16: 2181-2187.
- Heinlein CA, Chang C (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinol Rev* 2: 276-308.
- Hirawat S, Budman DR, Kreis W (2003). The androgen receptor: structure, mutations, and antiandrogens. *Cancer Invest* 21: 400-417.
- Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S (1998). Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the CYP19 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 445-449.
- Hrabovszky Z, Hutson JM (2002). Androgen imprinting of the brain in animal models and humans with intersex disorders: review and recommendations. *J Urol* 168: 2141-2148.
- Isaacs JT (1994). Role of androgens in prostate cancer. *Vit Horm* 49: 433-502.
- Jacobs MN, Dickins M, Lewis DF (2003). Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84: 117-132.
- Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP (2000). Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology* 141: 3471-3477.

- Jarred RA, McPherson SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP (2002) Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol Metab* 13: 163-168.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001) Estrogen receptor ER alpha, but not ER beta, gene is expressed in growth hormone-releasing hormone neurons of the male rat hypothalamus. *Endocrinology* 142: 538-543.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel MT (1997). Sexo e cérebro. Capítulo 31 de Fundamentos da Neurociência e do Comportamento, 1^a ed, pp. 465-473. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Kerr JF, Searle J (1973). Deletion of cell by apoptosis during castration induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch B Cell Pathol* 13: 87-102.
- Kim J, Jia L, Tilley WD, Coetzee GA (2003). Dynamic methylation of histone H3 at lysine 4 in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Nucleic Acid Res* 31- 6741-6747.
- Kim J, Lombroso PJ (1998). Development of the cerebral cortex: XI. Sexual dimorphism in the brain. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1228-1230.
- Kincl FA, Folch PA, Maqueo M, Herrera Laso L, Oriol A, Dorfman RI (1965). Inhibition of sexual development in male and female rats treated with various steroids at the age of five days. *Acta Endocrinol* 49: 193-206.
- Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Meisner LF, Chang C, Choon A, Reznikoff CR, Bova S, Friedl A, Jarrard DF (2000). Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res.* 60: 3623-3630.
- Kirn J, Lombroso PJ (1998). Development of the cerebral cortex: XV. Sexual differentiation of the central nervous system. *J Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 344-346.

- Kirn JR, de Voogd TJ (1989). Genesis and death of vocal control neurons during sexual differentiation in the zebra finch. *J Neurosci* 9: 3176-3187.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (2000). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79.
- LaFevre-Bernt MA, Ellerby LM (2003). Kennedy's disease. Phosphorylation of the polyglutamine-expanded form of androgen receptor regulates its cleavage by caspase-3 and enhances cell death. *J Biol Chem* 278: 34918-34924.
- Lee HJ, Chang C (2003). Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci* 60(8): 1613-1622.
- Lent R (2004). Capítulo de Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência, 1ª ed., pp. 486-494. Atheneu, São Paulo, Brasil.
- LeVay S (1991). A differentiation in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science* 253: 1034-1031.
- Lindzey J, Grossmann M, Kumar MV, Tindall DJ (1993). Regulation of the 5'-flanking region of the mouse androgen receptor gene by cAMP and androgen. *Mol Endocrinol* 88: 1530-1540.
- Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindal DJ (1994). Molecular mechanisms of androgen action. *Vitamins Hormones* 49: 383-431.
- Losel R, Breiter S, Seyfert M, Wehling M, Falkenstein E (2005). Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* 37: 10-14.
- McCarthy MM, Davis AL, Mong JA (1997). Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Res Bull* 4: 487-495.

- MacLaughlin DT, Donahoe PK (2004). Mechanisms of disease: sex determination and differentiation. *N Engl J Med* 350: 367-378.
- MacLusky N J, Naftolin F (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1303.
- Merry DE, Kobayashi Y, Bailey CK, Taye AA, Fischbeck KH (1998). Cleavage, aggregation and toxicity of the expanded androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7: 693-701.
- Mette MD, Aufsatz W, van der Winden J, Marzke MA, Matzke AJM (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19: 5194-5201.
- Mizokami A, Yeh S-Y, Chang C (1994). Identification of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate response element and other *cis* acting elements in the human androgen receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 8: 77-88.
- Nakayama T, Watanabe M, Suzuki H, Toyota M, Sekita N, Hirokawa Y, Mizokami A, Ito H, Yatani R, Shiraishi T (2000). Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest* 80: 1789-1796.
- Naslund MJ, Coffey DS (1986). The differential effects of neonatal androgen, estrogen and progesterone on adult rat prostate growth. *J Urol* 136: 1136-1140.
- Nelson DL, Cox MM (2004). Regulation of the transcription by steroids hormones. Capítulo 12 de Lehninger – Principles of Biochemistry, 1^a ed., pp. 460-462. WH Freeman and CO, New York and Basingstoke, EUA.
- Nishida T, Yasuda H (2002). PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277: 41311-41317.

- Ogawa S, Lubahn DB, Borach KS, Pfaff DW (1997). Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1476-1481.
- Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12887-12892.
- Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson J (2005). Estrogen receptor α and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci* 102: 1484-1489.
- Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stournaras C (2003). A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol* 17: 870-881.
- Pereira OCM (2003). Endocrine disruptors and hypothalamic sexual differentiation. *Annu Rev Biomed Sci* 5: 87-94.
- Pereira OCM, Carvalho NFS, Carlos CP (1997). Perinatal estrogen exposure: later repercussion on the fertility of rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 118: 241-245.
- Pereira OCM, Coneglian-Marise MSP, Gerardin DCC (2003). Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in males rats. *Comp Biochem Physiol A* 134: 545-550.
- Phornphutkul C, Fausto-Sterling A, Fruppuso PA (2000). Gender self-reassignment in an XY adolescent female born with ambiguous genitalia. *Pediatrics* 106: 135-137.
- Piffer RC, Pereira OC (2004). Reproductive aspects in female rats exposed prenatally to hydrocortisone. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 139: 11-16.
- Prins GS (1992). Neonatal estrone exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology* 130: 3703-3714.

- Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson J-A, Birch L (1998). Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology* 138: 874-883.
- Prins GS (1993) Woodham C, Lepinske M, Birch L (1993). Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology* 132: 2387-2398.
- Prins GS Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C (2001 - a). Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev* 13: 241-252.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS (2001 - b). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 61: 6089-6097.
- Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS (2001). Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod* 65: 1496-1505.
- Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS (2001). Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male reproductive tract. *Biol Reprod* 65: 1506-1517.
- Rajfer J, Coffey DS (1979). Effects of neonatal steroids on male sex tissues. *Invest Urol* 17: 3-8.
- Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, Costabel L, Muñoz-De-Toro M, Luque EH (2003). Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144: 3206-3215.

- Roselli CE, Cross E, Poonyagariyagorn HK, Stadelman HL (2003). Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 44 (2): 146-151.
- Roselli CE, Handa RJ, Resko JA (1989). Quantitative distribution of nuclear androgen receptors in microdissected areas of the rat brain. *Neuroendocrinology* 49: 449-53.
- Rosenzweig MR, Leiman AL, Breedlove AM (2000). Sex: evolutionary, hormonal and neural bases. Capítulo 12 de *Biological Psychology*, 2ª ed., pp. 317-347. Sinauer Associates, Sunderland, EUA.
- Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF (2005). The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Brazil J Med Biol Res* 38: 1449-1560.
- Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R (2003). Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Mol Cell Endocrinol* 202: 201-207.
- Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S, Dahiya R (2002). Methylation and inactivation of estrogen, progesterone and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 384-390.
- Shah N, Pisapia D, Maniatis S, Mendelsohn M, Nemes A, Axel R (2004). Visualizing sexual dimorphism in the brain. *Neuron* 43: 313-319.
- Simpson ER, Davis SR (2000). Another role highlighted for estrogens in the male: sexual behavior. *Proc Natl Acad Sci* 97: 14038-14040.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.

- Sisk CL, Foster DL (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci* 7: 1040-1047.
- Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer MC, Zigmond MJ (2003). The hypothalamus: an overview of regulatory systems. Capítulo 34 de *Fundamental Neuroscience*, 2^a ed., pp. 897-909. Academic Press, San Diego, California, USA
- Swaab DF (2004). Sexual differentiation of the human brain: relevance for gender identity, transsexualism and sexual orientation. *Gynecol Endocrinol* 19: 301-312.
- Takahashi S, Inaguma, Sakakibara M, Cho YM, Suzuki S, Ikeda Y, Cui L, Shirai T (2002). DNA methylation in the androgen receptor gene promoter region in rat prostate cancers. *Prostate* 52: 82-88.
- Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, González LC, Huhtaniemi I, Aguilar E (2000). Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor α and β mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 165: 345-357.
- Tena-Sempere M, González LC, Pinilla L, Huhtaniemi I, Aguilar E (2001). Neonatal imprinting and regulation of the estrogen receptor alpha e beta mRNA expression by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat. *Neuroendocrinology* 73: 12-25.
- Thompson J, Peltola KJ, Koskinen PJ, Janne OA, Palvimo JJ (2003). Attenuation of androgen receptor-dependent transcription by the serine/threonine kinase Pim-1. *Lab Invest* 83: 1301-1309.
- Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C et al (1990). The androgen receptor in LNCaP cells contain a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 665-669.

- Vu TH, Li T, Hoffman AR (2004). Promoter-restricted histone code, not the differentially methylated DNA regions or antisense transcripts, marks the imprinting status of *IGF2R* in human and mouse. *Human Molec Genet* 13: 2233-2245.
- Yamashita S (2004). Ontogenic expression of estrogen receptor coactivators in the reproductive tract of female mice neonatally exposed to diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol* 18: 275-284.
- Weisz J, Ward IL (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. *Endocrinology* 106: 306-316.
- Wilson CM, McPhaul MJ (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 120: 51-57.
- Woodham C, Birch L, Prins GS (2003). Neonatal estrogen down-regulates prostatic androgen receptor through a proteosome-mediated protein degradation pathway. *Endocrinology* 144: 4841-4850.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2237-2242.

6. Anexo

Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação animal

DECLARAÇÃO

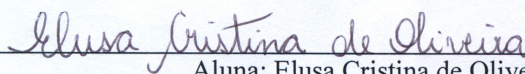
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada *Imprinting estrogênico: efeitos sobre a expressão do receptor de andrógeno no hipotálamo de ratos Wistar*:

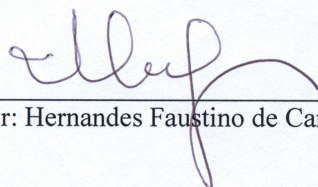
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1248-1).

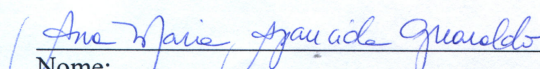
() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluna: Elusa Cristina de Oliveira


Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: Profª. Dra. ANAMARIA A. GUARNALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP