

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

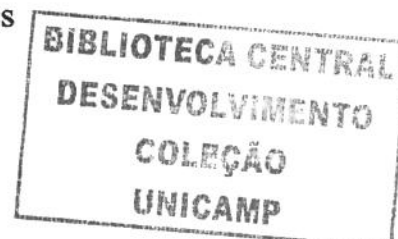
Maria Etelvina Pinto

**INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO E DO ANTI-ESTRÓGENO
TAMOXIFENO SOBRE A DINÂMICA TESTICULAR DE RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARIA ETELVINA PINTO
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.

Orientadora: Profa.Dra. Rejane Maira Góes



UNIDADE	BC
ED. CHAMADA	T/UNICAMP
	P658i
V	EX
TOMBO BC	67873
PROC.	16.123.06
C	☐
D	☒
PREÇO	4,00
DATA	06/09/06

BIB ID: 377210

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

P658i Pinto, Maria Etelvina
Influência do estrógeno e do anti-estrógeno tamoxifeno sobre a dinâmica testicular de ratos / Maria Etelvina Pinto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Rejane Maira Góes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testículos. 2. Estrógenos. 3. Tamoxifeno. 4. Apoptose. 5. Rato. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Influence of estrogen and anti-estrogen tamoxifen on the testicular dynamics of rats.

Palavras-chave em inglês: Testis, Estrogen, Tamoxifen, Apoptosis, Rat.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

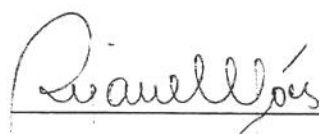
Banca examinadora: Rejane Maira Góes, Karina Carvalho Mancini, Patrícia Simone Leite Vilamaior.

Data da defesa: 15/08/2005.

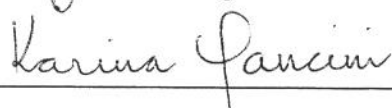
Campinas, 15 de agosto de 2005

Banca Examinadora

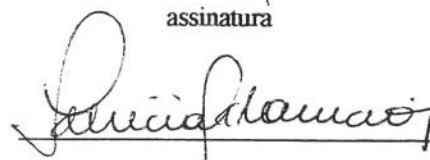
Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)


assinatura

Profa. Dra. Karina Mancini


assinatura

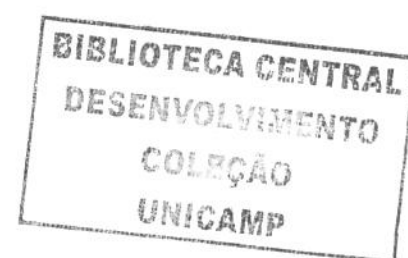
Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior


assinatura

Prof. Dr. Classius de Oliveira

assinatura

200607268



*“É melhor tentar e falhar,
a preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
a sentar-se nada fazendo até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
do que em dias tristes, em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco,
que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

Dedico

A Deus pela vida, por me iluminar e me proporcionar tantas oportunidades.

Aos meus pais José e Edna, que me ensinaram a diferença do bem e do mal e me conduziram sempre pelo caminho do bem. Por terem me proporcionado o estudo, acreditando ser a Educação o maior patrimônio que se pode legar.

À minha irmã Elenice por todo apoio, pelo exemplo de força e coragem e ao meu cunhado José Antônio por todo carinho e dedicação que tem por nossa família.

À minha linda e fofa sobrinha Beatriz que com o seu nascimento nos trouxe muita alegria.

A gatinha da titia...

Agradecimentos

A Deus por toda inspiração concedida, por toda força dada nos momentos difíceis e por tantas bênçãos derramadas que me fizeram acreditar que quando desejamos verdadeiramente a realização de um sonho é possível.

À professora Dra. Rejane Maira Góes, pela indispensável orientação, por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência. Seu apoio foi imprescindível para realização deste trabalho e, sem dúvida, para o meu aprimoramento profissional.

Ao professor Dr. Sebastião Roberto Taboga, por toda ajuda na realização deste trabalho. Pelos conhecimentos compartilhados, disponibilidade, pela atenção e conselhos nos momentos de dúvida.

Aos meus pais pelo exemplo de vida e que muitas vezes mesmo sem me entender me apoiaram. Minha gratidão será eterna.

A minha irmã, meu cunhado e minha sobrinha por todo carinho, atenção e apoio.

Aos professores que compuseram a banca dos Exames de Qualificação e Proficiência: Dr. Edson Rosa Pimentel, Dr. Odair Aguiar Junior e Dra. Iara Maria Silva De Luca, pelas críticas, sugestões e palavras incentivadoras.

Aos professores: Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e Dr. Classius de Oliveira pelo cuidado e atenção na análise prévia de tese e pelas valiosas sugestões.

As professoras: Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e Dra. Karina Carvalho Mancini pela disponibilidade em participar da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior por sua eficiência, amizade, apoio e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos secretários do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP Lílíam Alves Senne Panagio e Sidney Simões, pela eficiência e auxílio principalmente nos momentos de mais correria.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À Silvana pela ajuda na realização da técnica de TUNEL, pelo carinho, atenção e amizade sincera.

À Sabrina pelo coleguismo e amizade demonstrados de forma tão grandiosa na confecção da versão em inglês do artigo, assim como em muitos outros momentos.

À Lara pelo auxílio nas correções do texto em inglês e pelo carinho do dia a dia.

Ao Sergio pela amizade sincera demonstrada através do companheirismo e de tantos auxílios prestados no dia a dia.

À Cris, Dani, Lucilene, Cláudia, e Ana Maria pelas muitas conversas, risadas, desabafos, conselhos, incentivo, torcida e ajuda no trabalho laboratorial.

Aos demais colegas do Laboratório Fernanda, Renato, Wellerson, Fernanda Egydio, Marcela, Ricardo, Manoel, Daniel, Guilherme e Rodrigo pela ajuda, momentos de descontração e apoio.

Aos colegas da turma de Biologia Celular e Histologia pelo companheirismo e muitos momentos de alegrias.

Aos amigos da UNICAMP: Fernanda (Carioca), Tati, Isabella, Marcela, pelos almoços, lanches, risadas e agradável convivência.

À Ana Amélia pelas caronas, carinho, amizade e por ter tornado minha permanência em Campinas bem mais agradável.

Aos meus tios Francisco e Zina e sua família (Sandra, João, Sara e Mirian) por terem sido tão prestativos e por terem me acolhido com tanto carinho. Obrigada.

Aos amigos de longa data Ana Lúcia, Grazielle, Silvinho, Leandro, Ednéia e Meire pelo apoio, torcida, carinho, desabafos, momentos de muitas risadas...

“Cada pessoa que passa em nossa vida é única, sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós”.

SUMÁRIO

I – RESUMO.....	2
II – ABSTRACT.....	3
III – INTRODUÇÃO	
1. Características morfológicas.....	4
2. Regulação Hormonal.....	8
IV – OBJETIVO.....	18
V – ARTIGO.....	19
1. Efeitos testiculares da administração de uma única dose alta de estrógeno e do anti-estrógeno Tamoxifeno em ratos jovens	
VI – CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES GERAIS.....	50
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Embora seja bem conhecido que o estrógeno é essencial para o adequado desenvolvimento embrionário e maturação pós-natal do testículo, seu papel específico para a fisiologia testicular e em especial para a espermatogênese ainda permanece pouco compreendido. O objetivo do presente estudo foi determinar o impacto da administração subcutânea de uma dose única (35 mg/kg de peso corporal) de benzoato de estradiol e do anti-estrógeno Tamoxifeno sobre o testículo de ratos jovens (5 semanas de idade). Os efeitos do desequilíbrio hormonal passageiro foram avaliados uma (curto prazo) e sete semanas (médio prazo) após os referidos tratamentos com o uso de análises de rotina em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, associadas a análises morfométricas e estereológicas e também pelo método de TUNEL para a detecção de células apoptóticas. O estrógeno afetou mais drasticamente a estrutura testicular e a espermatogênese quando comparado com o Tamoxifeno. Em curto prazo, a exposição à alta dose de estrógeno reduziu em 50% o peso testicular, diminuiu o diâmetro dos túbulos seminíferos e a população de células de Sertoli, induziu um aumento na apoptose das espermátides alongadas acarretando seu desaparecimento. Embora o índice gônado-somático tenha se recuperado sete semanas após a injeção de estrógeno, a taxa de apoptose das células germinativas ainda permanece 5 vezes mais alta e o número de espermátides alongadas é muito inferior ao encontrado nos animais controle. Em curto prazo, a exposição ao Tamoxifeno foi menos prejudicial para o testículo de ratos jovens em comparação com o estrógeno, mas, em médio prazo, resultou em alguns efeitos semelhantes tais como redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, incidência elevada de células germinativas apoptóticas, e atrofia de células de Leydig. A partir dos resultados obtidos concluímos, que tanto a exposição passageira ao estrógeno como ao Tamoxifeno interfere negativamente na dinâmica testicular de ratos jovens, levando a danos na espermatogênese que persistem nos animais adultos com uma provável redução da fertilidade.

Although it is a consensus that estrogen is essential for normal embryonic development and postnatal maturation of the testis, its specific role to the testicular physiology and in particular to spermatogenesis, is still little understood. The aim of the present research was to determine the impact of a single high dose (35mg/kg of body weight) of estrogen and anti-estrogen Tamoxifen, administered subcutaneously in 5-week-old rats, on the testis structure and spermatogenesis. The effects of these transient hormonal disruptions were evaluated one (short-term) and seven weeks (medium-term) after treatments by light and transmission electron microscopies, both associated to morphometric and stereological analysis. Moreover, TUNEL's method was employed in order to detect the apoptotic process on germ cells. The estrogen affected more drastically the testicular structure and the spermatogenesis when compared to Tamoxifen. In short term analysis, the exposure to high doses of estrogen caused a 50% reduction in the testis weight, besides a reduction in the diameter of seminiferous tubules and population of Sertoli cells. This treatment also induced an increase in apoptosis and a total destruction of elongated spermatids. Even though the gonad-somatic-index had been recovered within seven weeks after the estrogen injection, apoptotic germ cell rate still remained five times higher and the number of elongated spermatids was lower than that found in the control animal group. In short term, the exposure to Tamoxifen was less harmful to the testis of young rats when compared to the estrogen, but in medium term it resulted in some similar effects such as the reduction of the seminiferous tubule diameter, high occurrence of germ apoptotic cells, and Leydig cell atrophy. Based on these results we conclude that transient exposure to estrogen and Tamoxifen induces alterations in testicular dynamics of young rats with a probable damage to the spermatogenesis of adult animals.

1. Características morfológicas

O testículo é um órgão complexo que desempenha duas funções essenciais: a esteroidogênese - biossíntese dos esteróides gonadais - e a espermatogênese - produção de um número suficiente de espermatozóides para proporcionar a fertilidade. Tais objetivos são realizados, respectivamente, em dois compartimentos teciduais distintos (Fig. 1), o *tecido intersticial* e o *compartimento tubular* (GNESSI *et al.*, 1997; RODRIGUES e FAVARETO, 1999).

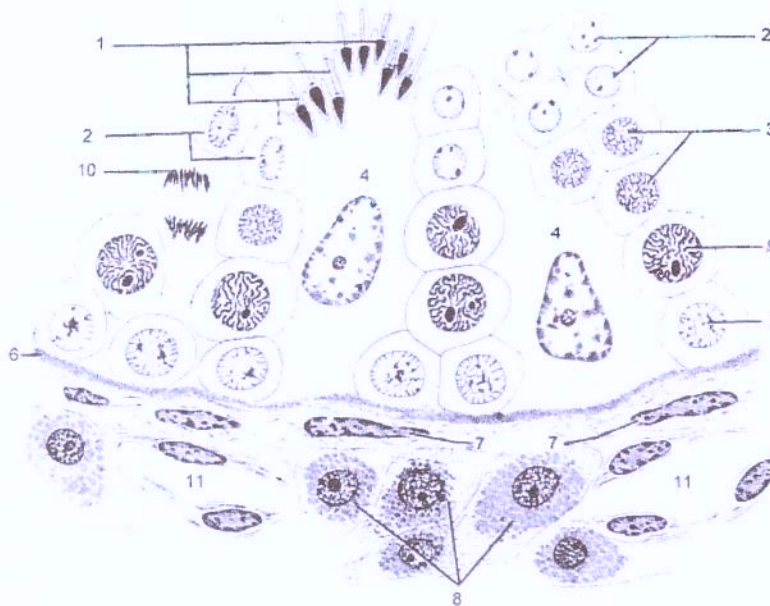


Figura 1 - Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero mostrando os principais tipos celulares encontrados: 1. espermátide alongada; 2. espermátide esférica; 3. espermátide secundária; 4. célula de Sertoli; 5. espermatogônia; 6. lâmina basal; 7. células peritubulares; 8. células intersticiais do testículo (células de Leydig); 9. espermátide primária; 10. célula em divisão; 11. vaso sanguíneo. Extraído de JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004.

Os túbulos seminíferos são delimitados por uma membrana basal, a qual é envolta por uma camada de células mióides (DYM e FAWCETT, 1970). O epitélio que os reveste internamente é composto por células de naturezas diferentes: as células de Sertoli e as células germinativas. As primeiras formam uma camada contínua ao longo de todo o túbulo seminífero, fornecendo o suporte estrutural e metabólico para as células germinativas que se dispõem em várias alturas no epitélio à medida que se diferenciam durante a espermatogênese. Portanto, as células germinativas em desenvolvimento exibem íntima associação com as células de Sertoli, ou seja, várias células germinativas estão em contato com uma única célula de Sertoli. Além disso, as várias gerações de células germinativas não são distribuídas aleatoriamente no testículo, mas são arrançadas em associações celulares que variam ao longo do túbulo, constituindo os estádios do ciclo seminífero típicos para cada espécie (LEBLOND e CLERMONT, 1952a). O número de estádios da espermatogênese varia entre as espécies, por exemplo, em humanos há seis, camundongos 12 e, em ratos, 14 estádios (LEBLOND e CLERMONT, 1952a). No caso do rato estes estádios foram definidos por Leblond e Clermont (1952b) e estão ilustrados na Figura 2.

O ciclo do epitélio seminífero constitui, assim, uma sucessão de eventos nos quais as associações celulares avançam progressivamente até o aparecimento do mesmo tipo de associação celular do ciclo seguinte. Cada fase é composta por um agrupamento celular específico, que representa um grau de maturação celular. A duração do ciclo (o tempo necessário para que a primeira geração de espermatogônias do tipo A se desenvolva e se diferencie em espermátides maduras) varia de acordo com a espécie considerada. No camundongo, a duração é de 34,5 dias; no rato, 48 dias; no *hamster*, 35 dias; no homem, cerca de 64 dias (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

A espermatogênese é um processo altamente complexo e sua manutenção em níveis qualitativos e quantitativos compatíveis com as funções reprodutoras de adultos requer um equilíbrio entre três etapas sequenciais: a proliferação de espermatogônias por divisões mitóticas, o direcionamento de algumas destas células para a meiose e a diferenciação das espermátides em gametas altamente modificados morfológicamente, etapa conhecida como espermiogênese (McLACHLAN *et al.*, 2002).

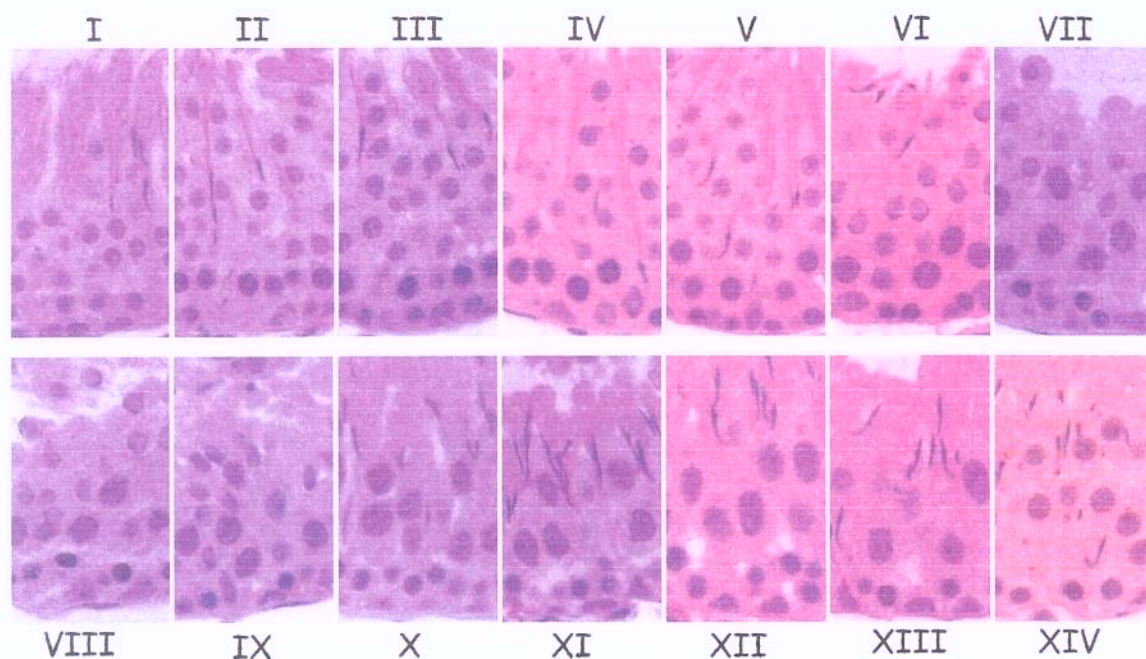


Figura 2- Estádios do ciclo do epitélio seminífero do rato (6 semanas de idade) visualizados a partir de cortes em historesina corados com Hematoxilina-Eosina e identificados com base em LEBLOND e CLERMONT (1952b). Note que os estádios VII e VIII não contêm espermátides alongadas.

As espermatogônias são as células germinativas mais imaturas do testículo e encontram-se próximas à membrana basal, protegidas pela barreira hematotesticular, formada pelas células de Sertoli. Em roedores são diferenciadas em três tipos: espermatogônias do tipo A, espermatogônias do tipo intermediário e espermatogônias do tipo B. Estas últimas são comprometidas com a diferenciação. Subtipos das espermatogônias tipo A são considerados as células tronco da população de células germinativas, embora não possam ser identificados com base na sua morfologia (CLERMONT, 1972). As espermatogônias sofrem numerosas mitoses para produzir um grande número de células germinativas viáveis para entrarem em meiose. Assim, a

proliferação da população espermatogonial promove o surgimento de milhões de espermatozóides que são produzidos por dia (O'DONNELL *et al.*, 2001).

A última mitose das espermatogônias do tipo B origina os espermatócitos primários em pré-leptóteno (O'DONNELL *et al.*, 2001). Essas células replicam seu DNA e iniciam a meiose (CLERMONT, 1972). Durante a prófase da primeira divisão meiótica, as células germinativas sofrem transições morfológicas e podem ser classificadas com base no tamanho e na morfologia nuclear (HESS, 1990). Na fase de zigóteno, ocorre pareamento dos homólogos, e quando as células estão com os cromossomos completamente pareados são chamadas espermatócitos em paquíteno, fase em que ocorre o crossing-over. Ao paquíteno segue-se o diplóteno, período no qual os cromossomos pareados separam-se parcialmente, mantendo-se ligados somente nos locais onde ocorreu o crossing-over (quiasmas), fase conhecida como diacinese. E as células que sofreram a primeira divisão meiótica originam os espermatócitos secundários. Estes, após sofrerem a segunda divisão meiótica, originam as espermátides esféricas haplóides.

O processo de diferenciação das espermátides esféricas em espermátides alongadas é conhecido como espermiogênese. Esse processo envolve formação e desenvolvimento do acrossomo e do flagelo, condensação da cromatina, mudança na forma e alongamento do núcleo e remoção do excesso de citoplasma (LEBLOND e CLERMONT, 1952a). A medida que o alongamento nuclear prossegue, o núcleo torna-se altamente compactado e a transcrição cessa (BRAUN, 1998). A espermição é a etapa final da espermiogênese e envolve a liberação da espermátide alongada da célula de Sertoli para o lúmen do túbulo seminífero (O'DONNELL *et al.*, 2001).

O tecido intersticial é formado por um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, os quais são essenciais para o trânsito de hormônios e nutrientes dentro e fora do testículo. Também são encontrados neste tecido fibroblastos, eventuais macrófagos e células de Leydig, essas últimas implicadas com a síntese de andrógenos, principalmente a testosterona, assim como outros esteróides incluindo o estrógeno (FAWCETT, 1994; GNESSI *et al.*, 1997). Duas populações diferentes são reconhecidas em roedores – as células de Leydig fetais e as adultas (HAIDER, 2004). A linhagem das células de Leydig adultas contém cinco tipos principais de células: as precursoras

mesenquimais, as progenitoras, as recém-formadas, as imaturas e as maduras (MENDIS-HANDAGAMA e ARYARATNE, 2001). Os hormônios secretados por essas células são fundamentais para o controle das funções reprodutoras masculinas nos vertebrados, atuando na diferenciação e no funcionamento dos órgãos reprodutores, induzindo o comportamento reprodutivo característico da espécie e influenciando a produção de espermatozóides (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

2. Regulação Hormonal

De maneira geral, o equilíbrio entre as diferentes etapas da espermatogênese é controlado por hormônios, fatores de crescimento, interações celulares e outras substâncias de ação local. Assim, a coordenação necessária para as funções espermatogênicas é alcançada por uma complexa rede de relações endócrinas, parácrinas e justácrinas, responsáveis pela sintonia metabólica entre células de Leydig, células de Sertoli e células germinativas, num processo conhecido como dinâmica testicular (SPITERIGRESH *et al.*, 1993; GUITTON *et al.*, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2001).

É bem conhecido que as gonadotrofinas, ou seja, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), secretados pela adenohipófise em resposta ao hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH), são os maiores reguladores endócrinos da espermatogênese (McLACHLAN *et al.*, 1996). O LH estimula as células de Leydig a secretar testosterona, a qual age no epitélio seminífero controlando a espermatogênese. O FSH estimula a produção pelas células de Sertoli de numerosos fatores, os quais participam da regulação da espermatogênese, refletindo a capacidade das células de Sertoli em promover mudanças que são necessárias nas células germinativas (O'DONNELL *et al.*, 2001). Por muitos anos presumiu-se que as células de Sertoli eram o maior fator controlador da sincronia no desenvolvimento das células germinativas. Entretanto, em um estudo recente observou-se que o transplante de espermatogônias de rato em camundongos leva à diferenciação destas células segundo a cinética da

espermatogênese do doador, demonstrando certo autocontrole das células germinativas (FRANÇA *et al.*, 1998).

O papel da testosterona e do FSH para a espermatogênese tem sido alvo de numerosos estudos. No entanto, pouco se sabe sobre como esses hormônios agem sobre as células de Sertoli para estimular e manter a espermatogênese (McLACHLAN *et al.*, 1996). Estudos sobre o papel do FSH e da testosterona na supressão e na restauração da espermatogênese em ratos adultos indicam que esses hormônios exercem efeitos independentes e sinérgicos sobre o desenvolvimento das células germinativas (McLACHLAN *et al.*, 2002). Singh e cols. (1995) demonstraram em um experimento com camundongos hipogonadaís, caracterizados pela deficiência congênita em GnRH e consequentemente em LH e FSH, que o andrógeno sozinho estimula todas as fases de desenvolvimento das células germinativas, enfatizando a necessidade de andrógeno para a espermatogênese.

A testosterona é, entre as múltiplas formas moleculares de andrógenos, a mais potente metabolicamente, correspondendo a 95% dos andrógenos totais encontrados na circulação sanguínea. Entre as várias funções da testosterona no testículo a mais importante é a de facilitar a progressão das espermátides esféricas em espermátides alongadas, pois estudos com ratos mostram que altas doses de FSH foram incapazes de completar esse passo vital (McLACHLAN *et al.*, 1996). Receptores de andrógenos têm sido encontrados apenas em células de Sertoli (BREMNER *et al.*, 1994; SUAREZ-QUIAN *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2000) e com base nessas evidências, têm sido postulado que a testosterona não age diretamente sobre as células germinativas, mas o seu alvo primário de ação são as células de Sertoli, as quais, por sua vez, atuam sobre as células germinativas através da secreção de fatores parácrinos (SHARPE, 1997; PARVINEN *et al.*, 1998;).

Análises bioquímicas dos níveis intratesticulares de testosterona em ratos adultos revelaram valores máximos nos estádios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero e valores mais baixos nos estádios de XIII-V (BREMNER *et al.*, 1994; PARVINEN *et al.*, 1998), sugerindo uma ação androgênica preferencial nos estádios VII-XI do ciclo do epitélio seminífero, enquanto os estádios XIII-V são controlados preferencialmente pelo FSH.

O FSH desempenha um papel chave no desenvolvimento de testículos imaturos, particularmente por controlar a proliferação das células de Sertoli. Além disso, atua predominantemente no desenvolvimento e diferenciação espermatogonial, na prevenção da degeneração prematura das espermatogônias e espermatócitos e na divisão meiótica (McLACHLAN *et al.*, 1996). Estudos utilizando camundongos transgênicos com ruptura do gene para o receptor de FSH (KUMAR *et al.*, 1997) ou para o gene da subunidade β do FSH (DIERICH *et al.*, 1998) têm ajudado a entender se o FSH é ou não essencial para a espermatogênese. Os machos de ambos os modelos transgênicos são férteis e exibem todos os estágios de desenvolvimento das células germinativas. O mesmo ocorre como os camundongos hipogonadais tratados com testosterona (SINGH *et al.*, 1995), sugerindo que o FSH não é absolutamente necessário para a fertilidade. Entretanto, em ambos os casos os testículos e a produção de espermatozóides são menores (SINGH *et al.*, 1995; KUMAR *et al.*, 1997; DIERICH *et al.*, 1998), devido à necessidade de FSH para a divisão das células de Sertoli durante o período neonatal (SINGH e HANDELSMAN, 1996 a e b).

Desde 1930 é reconhecido que o estrógeno é sintetizado no macho (ZONDEK, 1934). Entretanto, a descoberta desse hormônio “feminino” no macho foi amplamente ignorada e seu papel foi considerado de pequena importância para o funcionamento do testículo e para a fertilidade masculina. Mais tarde muitos estudos demonstraram que as células testiculares fetais e imaturas de roedores sintetizam estrógeno, pois possuem a enzima aromatase, a qual é responsável pela conversão de testosterona em estrógeno (ROMMERTS *et al.*, 1982; KUROSUMI *et al.*, 1985; TSAI-MORRIS *et al.*, 1985; PAPADOPOULOS *et al.*, 1986; TSAI-MORRIS *et al.*, 1986; WENIGER e ZEIS, 1987; 1988; WENIGER, 1990; 1993) e expressam receptores de estrógeno dos tipos α e β (GRECO *et al.*, 1992; FISHER *et al.*, 1997; SAUNDERS *et al.*, 1998; van PELT *et al.*, 1999; JEFFERSON *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2000; SAR e WELSCH, 2000). A tabela 1 mostra a localização dos receptores de andrógeno, de estrógeno α e β (ER α e ER β) e da aromatase nos principais tipos celulares do testículo, em diferentes fases do desenvolvimento.

Tabela 1- Resumo dos dados publicados até o momento sobre a localização dos receptores de andrógeno (AR) e de estrógeno α e β (ER α e ER β) e da aromatase no trato reprodutor de roedores machos do período fetal até a idade adulta. Modificado de O'DONNELL *et al.*, 2001 E WILLIAMS *et al.*, 2001.

	AR	ER α	ER β	Aromatase
Fetal				
Células de Leydig	–	+	+	+
Células de Sertoli	–	–	+	–
Gonócitos	–	–	+	–
Ductulos associados	+	+	+	–
Neonatal				
Células de Leydig	–	+	+	+
Células de Sertoli	+	–	+	+
Gonócitos/Espermatogônias	–	–	+	–
Espermatócitos	–	–	+	–
Ductulos eferentes	+	+	+	–
Epidídimo	+	–	+	–
Púbere				
Células de Leydig	+	+	+	+
Células de Sertoli	+	–	+	+
Espermatogônias	–	–	+	–
Espermatócitos	–	–	+	–
Espermátides esféricas	–	–	+	–
Espermátides alongadas	–	–	+	–
Ductulos eferentes	+	+	+	–
Epidídimo	+	+	+	–
Adulto				
Células de Leydig	+	+	+	+
Células de Sertoli	+	–	+	+
Espermatogônias	–	–	+	–
Espermatócitos	–	–	+	–
Espermátides esféricas	–	+	+	+
Espermátides alongadas	–	–	+	+
Ductulos eferentes	+	+	+	–
Epidídimo	+	+	+	–

Devido ao fato de haver muitos dados conflitantes na literatura a respeito da exata localização dos receptores de estrógeno tipo α e β e da atividade aromatásica no testículo adulto, muitos estudos sobre este assunto têm sido desenvolvidos com camundongos (COUSE *et al.*, 1997; ROSENFELD *et al.*, 1998), ratos (FISHER *et al.*, 1997; SAUNDERS *et al.*, 1997; 1998; SHUGHRUE *et al.*, 1998; van PELT *et al.*, 1999; PELLETIER *et al.*, 2000), primatas (WEST e BRENNER, 1990; FISHER *et al.*, 1997; PELLETIER *et al.*, 1999) e humanos (ENMARK *et al.*, 1997; PELLETIER e EL-ALFY, 2000; PENTIKÄINEN *et al.*, 2000 e SAUNDERS *et al.*, 2001). A localização dos ER α e ER β e da aromatase no testículo adulto está resumida na Figura 3, a qual foi feita com base nos relatos já descritos (O'DONNELL *et al.*, 2001).

Os estudos citados sugerem que o testículo é capaz de sintetizar e responder ao estrógeno durante todos os estágios de desenvolvimento. A presença de ER α e ER β e da aromatase demonstra que a ação do estrógeno é importante para o desenvolvimento e funcionamento das células de Leydig, células de Sertoli e células germinativas, assim como para o desenvolvimento e funcionamento dos ductulos eferentes e epidídimo. Em particular, as células germinativas são capazes de sintetizar estrógeno local e responder a ele, via ER β , sugerindo que a ação parácrina e intácrina do estrógeno possa ser importante no seu desenvolvimento (O'DONNELL *et al.*, 2001). Não tem sido descrito que o estrógeno regule algum estágio particular da espermatogênese, mas promove proliferação espermatogonial (KULA, 1988; MIURA *et al.*, 1999) e maturação dos espermatozóides no epidídimo (HESS *et al.*, 1997).

Os dados disponíveis até o momento em roedores mostram que o estrógeno é importante para manter a função reprodutiva no macho (CARREAU *et al.*, 1999, 2001; HESS *et al.*, 2001; O'DONNELL *et al.*, 2001; CARREAU, 2003; CHO *et al.*, 2003; GANCARCZYK *et al.*, 2004). No entanto, o seu efeito direto ainda não é completamente entendido.

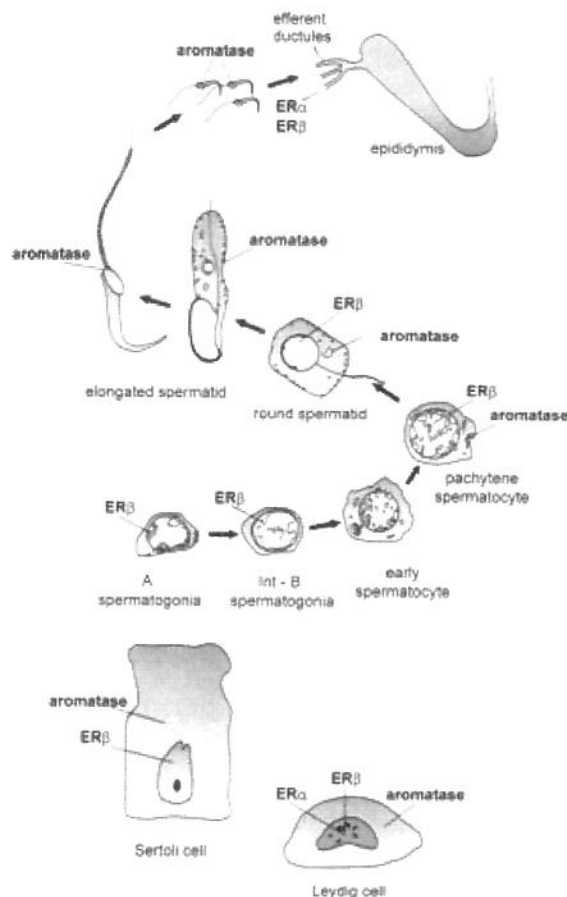


Figura 3- Resumo da localização dos receptores de estrógeno α e β e da aromatase no testículo adulto (O'DONNELL *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo a suplementação de estrógeno têm contribuído para uma melhor interpretação do seu papel no desenvolvimento testicular. Os fitoestrógenos, como a genesteína, são componentes estrogênicos não esteroidais fracos, produzidos pelas plantas e conhecidos por se ligarem aos ER α e ER β . A exposição neonatal a altas doses de genesteína induz mudanças estruturais no complexo uretroprostático em ratos (STRAUSS *et al.*, 1998) e inibe o crescimento e proliferação de células testiculares (DIAKA *et al.*, 1998), além de reduzir a expressão de ER α e AR, demonstrando seu efeito em nível molecular sobre os órgãos reprodutores (SHIBAYAMA *et al.*, 2001). Em um estudo

realizado com camundongos “knockout” para o gene *cyp 19* da aromatase (ArKO) submetidos a uma dieta rica em fitoestrógenos foi observado um efeito agonista ao estrógeno, devido à ausência de estrógeno endógeno. No entanto, nos camundongos normais submetidos à mesma dieta, o fitoestrógeno provocou efeito antagonista, devido a sua combinação com o estrógeno endógeno. Portanto, os fitoestrógenos podem simular a ação do estrógeno endógeno dentro do epitélio seminífero (ROBERTSON *et al.*, 2002).

O Zearalenone (ZEA) é uma substância estrogênica natural produzida pelo fungo *Fusarium* (MIRICHA *et al.*, 1968). O ZEA causa alterações no trato reprodutor de animais de laboratório e domésticos (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1987). Kim e cols. (2003) demonstraram em seus estudos com ratos que uma dose única (5 mg/kg) de ZEA induz apoptose nas células germinativas, principalmente em espermatogônias e espermatócitos primários nos estádios de I-VI do ciclo seminífero. No entanto, seu efeito citotóxico ocorre somente por um período curto, imediatamente após a administração.

O Dietilestilbestrol (DES) é um estrógeno sintético não esteroidal que causa atrofia dos testículos (OHTA *et al.*, 1995), redução dos níveis de testosterona (ATANASSOVA *et al.*, 1999) e carcinoma testicular (McLACHLAN *et al.*, 1998). Em humanos também causa câncer testicular além de hipospadias, criptorquidismo, redução dos espermatozóides e diminuição da fertilidade. A exposição neonatal de camundongos a altas doses de DES causa esterilidade, resultando em anormalidades do sistema reprodutor, tais como expansão dos ductos Müllarianos, criptorquidismo, hipotrofia dos testículos e epidídimo, cistos epididimais, causando tumores na rede testis e no tecido intersticial (McLACHLAN *et al.*, 1975; McLACHLAN, 1977; VORHERR *et al.*, 1979; NEWBOLD *et al.*, 1985; 1987a; 1987b; VISSER *et al.*, 1998; EMMEN *et al.*, 2000; GUPTA, 2000; NEF *et al.*, 2000). A exposição de camundongos durante os períodos gestacional e de lactação a doses diárias de 10 µg/kg de DES causou alterações irreversíveis quanto ao crescimento testicular, função dos espermatozóides, expressão de genes envolvidos na esteroidogênese, função lisossomal e desenvolvimento testicular (FIELDEN *et al.*, 2002).

A exposição de roedores no período neonatal ao estrógeno ou a componentes estrogênicos promove mudanças na secreção de gonadotrofinas durante o desenvolvimento púbere (ATANASSOVA *et al.*, 2000; TENA-SEMPERE *et al.*, 2000) e pode de fato alterar

a organização do eixo hipotalâmico-hipofisário, e assim essas mudanças persistem no adulto (ATANASSOVA *et al.*, 1999). Uma dose alta única de benzoato de estradiol em ratos machos com um dia de idade causa uma redução tanto na secreção de GnRH como na resposta pituitária para a GnRH (PINILLA *et al.*, 1992), assim como uma profunda supressão na circulação FSH, LH e conseqüentemente nos níveis de testosterona (TENASEMPERE *et al.*, 2000). Esta diminuição também é observada em ratos machos adultos que receberam doses de estradiol durante 10 dias (De JONG *et al.*, 1975).

Para elucidar o papel do estrógeno em machos têm sido utilizados também tratamentos com anti-estrógenos (GILL-SHARMA *et al.*, 1993; GOPALKRISHNAN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000; PADMALATHA RAI e VIJAYALAXMI, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001, 2002; HESS, 2003; GANCARCZYK *et al.*, 2004) e com inibidores de aromatase (STEELE *et al.*, 1987; JUNIEWICZ *et al.*, 1988; TURNER *et al.*, 2000). De acordo com Lee e cols. (2000), o tratamento com o anti-estrógeno ICI 182,780 provocou alterações no sistema reprodutor do macho que são similares às aquelas encontradas em camundongos “knockout” para o receptor de estrógeno tipo α (ER α KO). Oliveira e cols. (2001) comprovaram que o tratamento em longo prazo com esse mesmo anti-estrógeno resulta em prejuízos na estrutura e na função do sistema reprodutivo masculino. Em uma série de experimentos usando anti-estrógeno ICI 182,780 para bloquear os efeitos dos estrógenos endógenos via ER α e ER β , Hess (2003) confirmou a hipótese de que o estradiol é um hormônio essencial para a função reprodutiva masculina, quando encontrado em níveis de circulação normal. Altas concentrações de estrógeno podem exercer efeitos negativos sobre o desenvolvimento testicular enquanto baixas concentrações podem ter efeitos estimulatórios (ATANASSOVA *et al.*, 2000; EBLING *et al.*, 2000).

O Tamoxifeno é um anti-estrógeno não esteroidal amplamente usado no tratamento do câncer de mama. Ele bloqueia competitivamente os receptores de estrógeno e seus efeitos variam de um completo antagonismo ao estrógeno até o puro agonismo, dependendo da concentração e do tecido alvo (PARTE *et al.*, 2000; CORRADA *et al.*, 2004). Em humanos e ratos ele é preferencialmente anti-estrogênico com uma atividade estrogênica residual (FURR e JORDAN, 1984). O tratamento com esse anti-estrógeno promove o aumento de FSH e diminui os níveis de LH e testosterona, alterando a espermatogênese e a morfologia

testicular (GOPALKRISHNAN et al., 1998). Seu potencial genotóxico para os machos é conhecido com base nas anormalidades induzidas nos espermatozóides (PADMALATHA RAI e VIJAYALAXMI, 2001), na diminuição da fecundidade, da fertilidade e da potência (GILL-SHARMA et al, 1993). Considerando que a concentração apropriada de LH e FSH, assim como o início da secreção durante os períodos neonatal e puberal é fundamental para o procedimento normal da espermatogênese (RUSSEL et al., 1987; 1998), a exposição ao estrógeno e ao Tamoxifeno pode ter importantes efeitos a longo prazo sobre o eixo hipotalâmico- hipofisário e assim, sobre a espermatogênese.

Enquanto a administração de estrógeno ou de seus inibidores causa diminuição nos níveis circulantes de gonadotrofinas, a administração de inibidores de aromatase aumenta os níveis de LH e testosterona em cachorros adultos (JUNIEWICZ et al., 1988). Adicionalmente, Turner e cols., (2000) demonstraram que em ratos tratados com inibidores de aromatase a concentração de gonadotrofinas e testosterona também aumentam.

A investigação do papel do estrógeno no controle do eixo hipotálamo-hipófise-testículos tem sido facilitada pelos modelos experimentais transgênicos, como é o caso dos camundongos ArKo e ERKo (EDDY et al., 1996; FISHER et al., 1998; KREGGE et al., 1998; LINDZEY et al., 1998; COUSE e KORACH, 1999; ROBERTSON et al., 1999; HESS et al., 2001; MAHATO et al., 2001; TODA et al., 2001). Os camundongos ER α Ko são inférteis, seus testículos parecem normais até a puberdade, no entanto começam a se degenerar com a ruptura da espermatogênese (EDDY et al., 1996). O fenótipo testicular desses camundongos é caracterizado pela atrofia dos túbulos seminíferos e várias anormalidades morfológicas no espermatozóide. Recentemente Mahato e cols. (2001) mostraram em camundongos ER α Ko que as células germinativas sem receptores de estrógeno do tipo α não se desenvolvem normalmente e que as células somáticas do sistema reprodutivo masculino requerem esses receptores para sustentar a produção de espermatozóides férteis. Adicionalmente, Hess e cols. (2001) demonstraram que a infertilidade do ER α Ko é resultado da deficiência na reabsorção do fluido nos ductulos eferentes, resultando em esperma diluído e aumento da pressão nos túbulos seminíferos. Devido a uma série de experimentos realizados por Lindzey e cols (1998), foi constatado que o estrógeno facilita o “feedback” negativo da testosterona sobre o eixo hipotálamo-

hipófise-testículos de camundongos. Posteriormente, foi demonstrado que os animais ER α Ko têm um aumento nos níveis de andrógenos, o que leva a concluir que ocorre uma alteração na organização do eixo hipotálamo-hipófise-testículos. O perfil endócrino dos camundongos “knockout” para o receptor de estrógeno tipo β (ER β KO) ainda não foi detalhado, contudo, o fato de serem férteis sugere que não há ruptura endócrina.

Assim como observado em ratos tratados com inibidores de aromatase, em camundongos ArKO ocorre também um aumento nos níveis de LH e testosterona, no entanto a concentração de FSH permanece normal (FISHER et al., 1998; ROBERTSON et al., 1999). Nesses animais, a inibição da biossíntese do estrógeno resulta em uma espermatogênese anormal. Inicialmente esses camundongos são férteis, por volta da 18ª semana de idade, são notados defeitos pós-meióticos nas células germinativas, coincidindo com aumento de apoptose e conseqüentemente redução da fertilidade (ROBERTSON et al., 1999). Em humanos a deficiência da aromatase bem como a falta de expressão do ER α devido a mutações ocorridas naturalmente leva a infertilidade e diminuição da viabilidade dos espermatozóides (FAUSTINI-FUSTINI et al., 1999).

Sabe-se que a administração de estrógeno em animais durante o período neonatal ou adulto prejudica o funcionamento do sistema reprodutor masculino, bem como a fertilidade. No entanto, não são do nosso conhecimento relatos sobre o efeito da administração transitória de altas doses de estrógeno e Tamoxifeno em ratos jovens. Considerando que os estudos relativos ao efeito das alterações nos níveis hormonais sobre o testículo, acima citados, não enfatizam sua influência específica sobre a espermatogênese e considerando, ainda a escassez de informações a respeito das alterações morfológicas causadas nas diferentes populações celulares envolvidas, acreditamos que as análises realizadas irão ampliar as informações a respeito dos fatores reguladores da espermatogênese e as bases celulares da resposta testicular frente a distúrbios passageiros na concentração de hormônios esteróides ou de seus inibidores.

IV - OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar comparativamente as conseqüências, em curto e médio prazo, do tratamento transitório com estrógeno e com o anti-estrógeno Tamoxifeno, sobre a estrutura testicular e a espermatogênese de ratos jovens. Assim, foram examinadas as alterações morfológicas e quantitativas no testículo e nas suas principais populações celulares, uma e sete semanas após a administração dessas substâncias.

EFEITOS TESTICULARES DA ADMINISTRAÇÃO DE UMA ÚNICA DOSE ALTA DE ESTRÓGENO E DO ANTI-ESTRÓGENO TAMOXIFENO EM RATOS JOVENS

Maria Etelvina Pinto¹, Rejane Maira Góes^{2*}

¹Departamento de Biologia Celular, IB/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Título resumido: Efeito do Estrógeno e do anti-estrógeno na estrutura testicular

Palavras-chaves: testículo, estrógeno, Tamoxifeno, apoptose, rato jovem

***Endereço para correspondência:**

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São Jose do Rio Preto, SP, Brasil

CEP: 15054-000.

Email: remagoes@ibilce.unesp.br

Telefone: 17 3221-2386

Fax: 17 3221-2390

Resumo

Embora seja bem conhecido que o estrógeno é essencial para o adequado desenvolvimento embrionário e maturação pós-natal do testículo, seu papel específico para a fisiologia testicular e em especial para a espermatogênese ainda permanece pouco compreendido. O objetivo do presente estudo foi determinar o impacto da administração subcutânea de uma dose única (35 mg/kg de peso corporal) de benzoato de estradiol e do anti-estrógeno Tamoxifeno sobre o testículo de ratos jovens (5 semanas de idade). Os efeitos do desequilíbrio hormonal passageiro foram avaliados uma (curto prazo) e sete semanas (médio prazo) após os referidos tratamentos com o uso de análises de rotina em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, associadas a análises morfométricas e estereológicas e também pelo método de TUNEL para a detecção de células apoptóticas. O estrógeno afetou mais drasticamente a estrutura testicular e a espermatogênese quando comparado com o Tamoxifeno. Em curto prazo, a exposição à alta dose de estrógeno reduziu em 50% o peso testicular, diminuiu o diâmetro dos túbulos seminíferos e a população de células de Sertoli, induziu um aumento na apoptose das espermatídes alongadas acarretando seu desaparecimento. Embora o índice gônado-somático tenha se recuperado sete semanas após a injeção de estrógeno, a taxa de apoptose das células germinativas ainda permanece 5 vezes mais alta e o número de espermatídes alongadas é muito inferior ao encontrado nos animais controle. Em curto prazo, a exposição ao Tamoxifeno foi menos prejudicial para o testículo de ratos jovens em comparação com o estrógeno, mas, em médio prazo, resultou em alguns efeitos semelhantes tais como redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, incidência elevada de células germinativas apoptóticas, e atrofia de células de Leydig. A partir dos resultados obtidos concluímos, que tanto a exposição passageira ao estrógeno como ao Tamoxifeno interfere negativamente na dinâmica testicular de ratos jovens, levando a danos na espermatogênese que persistem nos animais adultos com uma provável redução da fertilidade.

Introdução

A espermatogênese é um complexo processo pelo qual as células germinativas indiferenciadas sofrem proliferação, meiose e diferenciação para dar origem aos espermatozóides. Sabe-se que as gonadotrofinas são os principais hormônios reguladores da espermatogênese [1]. Além disso, estudos em camundongos hipogonadaís (hpg), os quais sofrem de uma deficiência congênita de gonadotrofinas, mostram que todas as fases da espermatogênese podem ser estimuladas pela administração exógena de testosterona mesmo na ausência de LH e FSH [2]. Se por um lado, o papel da testosterona e das gonadotrofinas no testículo tem sido extensivamente estudado [para revisão ver referência 3], uma maior ênfase na elucidação do papel do estrógeno para o desenvolvimento e função testiculares tem sido dada apenas na última década [1,4,5].

Vários estudos têm indicado que um aumento na exposição fetal ou neonatal de indivíduos machos ao estrógeno pode afetar o desenvolvimento do sistema genital e comprometer seu funcionamento na idade adulta [6-8]. A exposição de fetos humanos ao potente estrógeno dietilelbestrol, via administração materna, aumenta a incidência na prole de desordens do sistema genital tais como criptorquidismo, hipospadia e baixa contagem de espermatozóides [7]. A administração desse estrógeno não esteroideal a ratos no período neonatal (2-12 dias após o nascimento), seja em baixas (<4ug/Kg) ou em altas (>100ug/Kg) doses tem um efeito negativo sobre o desenvolvimento testicular, diminuindo o número de células de Leydig e de Sertoli [9]. Por outro lado, os efeitos da exposição estrogênica sobre as células germinativas de roedores são dose-dependentes, uma vez que em altas doses nota-se uma diminuição dessas populações celulares, enquanto em baixas doses elas aumentam, acelerando o início normal da espermatogênese [8,10]. A comparação de experimentos de administração de estrógeno com experimentos de supressão da produção de testosterona (tratamento com antagonista de GnRH) e de bloqueio da ação do andrógeno, via administração neonatal do anti-andrógeno flutamida, têm indicado que a ocorrência de anormalidades no trato reprodutor masculino requer simultaneamente uma alta ação de estrógenos e uma baixa ação de andrógenos [8,11].

Evidências diretas para o papel fisiológico do estrógeno nos órgãos reprodutores masculinos têm sido fornecidas pelas investigações com camundongos “knockout” para os receptores de estrógeno tipos α (ER α KO) e β (ER β KO) e para o gene *cyp 19* da aromatase (ArKO) [12-15]. Os testículos de camundongos ER α KO parecem normais até a puberdade, mas, então, começam a degenerar, com a interrupção da espermatogênese e progressiva atrofia dos túbulos seminíferos e conseqüente infertilidade [12]. A infertilidade dos camundongos ER α KO tem sido atribuída à deficiência na reabsorção de fluido testicular pelos ductos eferentes, resultando em esperma diluídos, aumento da pressão nos túbulos seminíferos e conseqüente atrofia do epitélio germinativo [16]. Os camundongos ArKO, contudo, também apresentam uma falha progressiva na espermatogênese e infertilidade, mas não foram encontradas evidências da deficiência na absorção de fluido pelos túbulos eferentes, indicando que outros mecanismos estão envolvidos na indução da infertilidade [15]. Além disso, análises detalhadas da espermatogênese em camundongos ER α KO indicam que as células germinativas sem ER α não se desenvolvem normalmente e que as células somáticas do sistema reprodutor masculino requerem esses receptores para sustentar a produção de espermatozoides [17].

Embora várias linhas de evidência indiquem que tanto a superexposição como a falta da ação de estrógeno interferem negativamente na espermatogênese, sugerindo-lhe uma participação direta neste processo, o seu papel específico ainda não é claro. No presente estudo, analisamos as conseqüências, em curto e médio prazo, da exposição transitória a uma dose alta de estrógeno sobre a estrutura testicular e espermatogênese de ratos jovens, comparando com o tratamento semelhante com o anti-estrógeno Tamoxifeno.

Material e métodos

Ratos Wistar machos, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brasil), foram mantidos no Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Unesp (São José do Rio Preto, SP, Brasil), em condições padrões de temperatura (25°C), umidade do ar 40%-70% e luminosidade (12h de luz: 12h

de escuro), sendo alimentados com ração animal Labina (Purina, Paulínia, Brasil) e água filtrada “*ad libitum*”. Após a pesagem, os animais com 5 semanas de idade foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 10$). Naqueles do grupo controle foram injetados subcutaneamente apenas com 0,5ml de óleo de girassol, enquanto nos demais foram injetados com uma dose única desse solvente contendo 35mg/Kg de peso corporal de 3-benzoato de β estradiol (Sigma, St. Louis, MO) ou contendo 35mg/Kg de peso corporal de Tamoxifeno (Sigma, St. Louis, MO). Metade dos animais de cada grupo foram sacrificados 1 semana após o tratamento e a outra metade 7 semanas após o tratamento, utilizando-se inalação profunda com CO₂, seguida de decapitação.

Preparação do testículo para microscopia de luz e eletrônica de transmissão

Após a remoção do epidídimo, ambos os testículos foram pesados. Os testículos direitos foram imediatamente imersos em Bouin. Após 15 min no fixador de Bouin, foram feitas pequenas incisões na túnica albugínea e após 1h de fixação os testículos foram seccionados transversalmente em fatias de 2-3mm de espessura. Esses fragmentos permaneceram por mais 18h em Bouin, sendo processados para inclusão em historesina (Leica-historesin embedding kit, Nussloch, Alemanha).

Fragmentos dos testículos esquerdos foram fixados, durante 24h, em formaldeído a 4% recém preparado em tampão fosfato 0,1M e processados para inclusão em Paraplast (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes histológicos em historesina (3 μ m de espessura) foram corados com Hematoxilina-Eosina [18] e pela técnica de Reticulina de Gömöri [18], tendo sido empregados nas análises histológicas e morfométricas. Os cortes histológicos em parafina (5 μ m de espessura) foram submetidos à técnica de TUNEL (Oncogene Research Products, Boston, EUA).

Parte dos fragmentos dos testículos esquerdos foram fixados em solução de glutaraldeído 3% e ácido tânico 0,25% em tampão Milloning, pH 7,3, por 2 horas, à 4°C. Depois da pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão Milloning, por 1 hora, as amostras foram desidratadas e incluídas em araldite (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de

uranila [19] e citrato de chumbo [20] e examinados no Microscópio Eletrônico de Transmissão, LEO 906 (Zeiss).

Análises quantitativas

Foram determinados o peso corporal dos animais, o peso fresco do testículo e o Índice Gônado-Somático [IGS = (Peso testicular /Peso corporal) x 100].

As análises morfológicas e quantitativas foram efetuadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenamed (Jena, Alemanha) acoplado com Sistema Digitalizador e Analisador de Imagens Image-Pro Plus ©Media Cybernetics versão 4.5 for Windows software (Maryland, USA). Todas as análises abaixo descritas foram realizadas em cortes histológicos em historesina provenientes de pelo menos três fragmentos testiculares diferentes por cada animal:

1. Diâmetro dos túbulos seminíferos: foi determinado em cortes corados pela técnica de Reticulina de Gömöri [18], que evidencia as fibras contendo colágeno do tecido peritubular, facilitando a delimitação dos túbulos seminíferos. Foram medidos 20 túbulos em corte transversal por animal utilizando-se o aumento de 200x.

2. Frequência das diferentes populações de células do epitélio seminífero: foi avaliada de acordo com os procedimentos de Chandolia e cols. [21], com uma pequena adequação visto que utilizamos os túbulos seminíferos nos estádios I ao VIII do ciclo do epitélio germinativo. Esses estádios, reconhecidos com base nas descrições de Leblond e Clermont [22] e Hess [23], foram escolhidos por conterem os representantes das principais fases de diferenciação espermatogênica, inclusive as espermatídes esféricas que não são observadas nos demais estádios. As células de Sertoli e as células germinativas, subdivididas em quatro categorias (espermatogônias e espermatócitos em pré-leptóteno, espermatócitos em paquíteno, espermatídes esféricas e espermatídes alongadas), foram quantificadas com base nos perfis nucleares visualizados em cortes transversais dos túbulos seminíferos. Um total de 20 túbulos seminíferos por animal foi empregado.

3. Freqüência dos túbulos seminíferos segundo a quantidade de espermátides alongadas: com o objetivo de averiguar as conseqüências dos tratamentos sobre a fase final da maturação espermática, os túbulos seminíferos foram classificados quanto à quantidade de espermátides alongadas em: (1) túbulos sem espermátides, (2) com menos de 25, (3) de 25-100, ou (4) com mais de 100 espermátides alongadas. A freqüência relativa de cada uma dessas categorias de túbulos foi determinada.

4. Células germinativas apoptóticas: foram identificadas pelo método de TUNEL e seu número determinado em cortes transversais de túbulos seminíferos (n = 50 por animal).

5. Volume relativo ocupado pelas células de Leydig: foi estimado em cortes histológicos em historesina, com base no método de contagem de pontos [24], fazendo uso de retículo M 132 e de imagens contíguas digitalizadas com a objetiva de 10x.

6. Medidas de área nuclear e citoplasmática das células de Leydig: foram efetuadas a partir de cortes aproximadamente centrais desses tipos celulares, no aumento de 100x em um total de 20 perfis citoplasmáticos por animal.

Os dados quantitativos foram avaliados pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey para comparações múltiplas usando o Programa Statistica 6.0 (Copyright© StatSoft, Inc. 1996). Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

A Figura 1 mostra as variações do peso corporal, peso testicular e IGS observadas uma (Fig. 1A) e sete semanas (Fig. 1B) após a injeção de dose única de benzoato de estradiol e de Tamoxifeno. No caso do Tamoxifeno não houve alterações significativas estatisticamente para estes parâmetros, nos dois tempos analisados. Ao contrário, uma semana após a administração de estrógeno, o peso testicular diminuiu cerca de 50% e sete semanas após a aplicação ainda continuou em média 22% menor que o do grupo controle. Entretanto, embora o IGS tenha sido reduzido em 60% uma semana após a injeção de estrógeno, houve uma recuperação deste índice após sete semanas, visto que

tanto o peso testicular como o peso corporal permaneceram abaixo do encontrado nos animais controle (Fig. 1).

Os ratos do grupo controle com seis semanas de idade possuíam testículos imaturos. Assim, na maioria dos túbulos seminíferos foram encontradas as associações celulares do ciclo seminífero com todas as fases da diferenciação espermática previamente descritas [22,23]; contudo, os estádios VII e VIII freqüentemente estavam incompletos não exibindo as fases finais de maturação (espermátides alongadas fase 19) [Fig. 2 da introdução da tese]. Já os animais do grupo controle com 12 semanas de idade exibiram espermatogênese completa (Fig. 2G).

Os testículos dos animais expostos uma semana antes à dose alta de estrógeno apresentaram menor diâmetro tubular (Figs. 2B e 3A) e aparente diminuição do volume ocupado pelas células de Leydig. A análise histológica revelou que todos os animais submetidos à exposição estrogênica apresentaram leves alterações no epitélio seminífero, como vacuolização citoplasmática, descolamento prematuro de células germinativas e aumento de células apoptóticas. Embora essas alterações tenham sido observadas com maior freqüência uma semana após o tratamento, elas persistiram após sete semanas, porém em menor grau (Fig. 2H e K).

A injeção de uma dose alta de Tamoxifeno não casou alterações histológicas significativas no testículo, seja em curto ou médio prazo (Figs. 2C e 2I), mas provocou uma discreta diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos após sete semanas (Fig. 3A).

As conseqüências da administração do estrógeno e do anti-estrógeno sobre as populações celulares do epitélio seminífero são mostradas na Figura 3. Em curto prazo, ambos levaram a uma diminuição no número de perfis nucleares de células de Sertoli por corte transversal do túbulo seminífero (Fig. 3B). Entretanto, sete semanas após a exposição estrogênica houve um aumento no número dos perfis nucleares deste tipo celular por corte transversal do túbulo (Fig. 3B). Uma semana após a injeção de Tamoxifeno foi verificado um aumento do número de espermátócitos em paquíteno (Fig. 3D) e após sete semanas detectou-se uma diminuição no número de espermátides esféricas (Fig. 3E). Em curto prazo, a administração de estrógeno provocou o desaparecimento das espermátides

alongadas, as quais ainda foram encontradas em quantidade bem mais baixa do que no controle nos testículos de animais tratados sete semanas antes com o estrógeno (Fig. 3F).

Em média 25% dos túbulos seminíferos presentes nos testículos dos animais controle com 6 semanas de idade não possuíam espermátides alongadas. Uma semana após a injeção de estrógeno essa porcentagem passou para 85% (Fig. 4A). Os testículos dos animais com 12 semanas de idade apresentaram a maior parte dos túbulos seminíferos com mais de 25 espermátides alongadas, sendo que, em média, 40% dos túbulos continham mais de 100 espermátides (Fig. 4B). A incidência de túbulos contendo entre 25 e 100 espermátides alongadas e daqueles com mais de 100 espermátides alongadas foi muito inferior nos testículos de animais tratados sete semanas antes com 35mg de estrógeno.

A comparação do epitélio seminífero seja nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina como naqueles submetidos à técnica de TUNEL (Fig. 5) indicou um aumento do número de células apoptóticas, em particular nos animais tratados uma semana antes com o estrógeno (Figs. 2E, K; 5B, E, G-K). Os testículos dos animais controle com 6 semanas de idade apresentaram em média $0,39 \pm 0,07$ células apoptóticas/corte transversal de túbulo seminífero. Uma semana após a exposição ao estrógeno este número duplicou ($0,82 \pm 0,11$; $p \leq 0,05$), permanecendo inalterado no caso do Tamoxifeno ($0,34 \pm 0,05$). Nos testículos de animais controle com 12 semanas de idade foram detectadas $0,03 \pm 0,01$ células apoptóticas/corte transversal de túbulo seminífero. Um número bem mais elevado de células apoptóticas também foi constatado para os animais submetidos sete semanas antes à dose alta de estrógeno ($0,15 \pm 0,03$; $p \leq 0,05$) ou de Tamoxifeno ($0,13 \pm 0,03$; $p \leq 0,05$).

Embora a análise em microscopia de luz indicasse que as células germinativas em apoptose verificadas após os tratamentos correspondiam a espermatócitos primários, a análise ultra-estrutural surpreendentemente revelou que a vasta maioria dessas células eram espermátides alongadas em fase adiantada de morte celular. Tais células geralmente eram encontradas em grupos e exibiam vários sinais morfológicos típicos de células em apoptose, tais como condensação da cromatina, degeneração de organelas citoplasmáticas e nas fases finais, dispersão do envoltório nuclear. Nesse caso, muito freqüentemente elas se encontravam em regiões basais do citoplasma das células de Sertoli (Figs. 6A-D).

A análise ultra-estrutural convencional não permitiu constatar outros danos específicos dos tratamentos aqui empregados sobre as demais células germinativas como espermatogônias e espermátides esféricas ou mesmo sobre as células de Sertoli. Este último tipo celular aparentemente manteve suas características ultra-estruturais normais após ambos os tratamentos, seja em curto ou em médio prazo, à exceção de um aumento no número de inclusões citoplasmáticas com um aspecto semelhante às vesículas de mielina (não mostrado) no caso dos animais tratados sete dias antes com o estrógeno.

O volume testicular relativo das células de Leydig diminuiu mais da metade uma semana após a administração do estrógeno (Tab. 1). Uma acentuada diminuição no volume relativo dessas células também foi observada após sete semanas, ocorrendo, neste tempo, também nos animais tratados com Tamoxifeno (Tab. 1). Contudo, como esse volume variou muito entre os animais sujeitos à exposição aos agentes estrogênicos sete semanas antes, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (Tab. 1). A análise da área citoplasmática das células de Leydig nos cortes em historesina revelou que elas sofreram uma atrofia uma semana após a administração do estrógeno e do Tamoxifeno (Tab. 1). Ocorreu uma recuperação da área citoplasmática dessas células sete semanas após a exposição estrogênica, mas o nível de atrofia persistiu, no caso do Tamoxifeno (Tab. 1).

A comparação dos animais dos dois grupos controle mostrou que, em ambas as idades, as células de Leydig exibem o citoplasma com as características ultra-estruturais muito semelhantes entre si e típicas para este tipo celular, ou seja, grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático liso (REL) e abundantes mitocôndrias com cristas túbulo-vesiculares (Fig. 7A). A análise ultra-estrutural do testículo dos animais tratados uma semana antes com o benzoato de estradiol, além de confirmar a atrofia citoplasmática dessas células, também revelou uma dilatação das cisternas do Golgi e uma drástica redução no número de cisternas de REL e no seu lúmen (Fig. 7C). Tal redução no REL ainda persiste 50 dias após a exposição estrogênica, quando não foram encontradas evidências de aumento do complexo de Golgi (Fig. 7E). Quanto ao efeito em curto prazo do Tamoxifeno sobre a estrutura das células de Leydig, parece haver uma resposta variável para este tipo celular, visto que algumas exibiram uma nítida atrofia e diminuição dos

elementos do REL (Fig. 7B), enquanto outras mostraram o citoplasma repleto de vesículas dilatadas de REL e mitocôndrias, sugerindo intensa atividade esteroidogênica (Fig. 7D). Sete semanas após à exposição ao anti-estrógeno não esteroideal foi encontrada uma grande quantidade de células de Leydig com nítidos sinais de degeneração (Fig. 7F).

Discussão

O papel do estrógeno no desenvolvimento testicular tem sido um tema controverso durante anos. Entretanto, inúmeros estudos realizados na última década com abordagens experimentais bastante diversificadas têm comprovado que o estrógeno é essencial não apenas para o adequado desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino, mas também para a espermatogênese e fertilidade masculina [12,15,16,25-30]. Existem evidências abundantes na literatura indicando que a exposição uterina ou neonatal de roedores ou do homem a estrógenos exógenos causa variadas falhas no desenvolvimento testicular [7-10,31]. Assim, uma única dose de estrógeno, administrada a ratos com 5 dias de idade, causa severos danos testiculares, levando a infertilidade e a ausência de células de Leydig maduras no testículo adulto [31]. Também é bem conhecido que os estrógenos, quando administrados em doses farmacológicas a roedores adultos, inibem a espermatogênese e a esteroidogênese [1].

Apesar do amplo conhecimento a respeito dos efeitos deletérios de altas doses de estrógeno para a fisiologia testicular, não são do nosso conhecimento estudos que focalizem as conseqüências da exposição transitória a alta dose desse hormônio na fase de transição da puberdade para a idade adulta. Este período nos parece interessante, pois, se por um lado vários processos da maturação testicular como a proliferação das células de Sertoli, origem e diferenciação das células de Leydig adultas e o início da espermatogênese já ocorreram [1,3], os testículos ainda podem ser considerados imaturos, no caso do rato, e os níveis hormonais destes animais encontram-se numa fase de transição, pois com 5 semanas apresentam 0,75 ng/ml de testosterona, e este valor duplica no animal com 6

semanas de idade (1,5 ng/ml) e aumenta 4 vezes mais quando o animal torna-se adulto (3,5 ng/ml) [32].

Este estudo demonstrou que uma única dose de 35mg de benzoato de estradiol, quando administrada a ratos jovens, leva, após uma semana, a uma drástica redução do tamanho testicular e a um grande prejuízo para a espermatogênese relacionado principalmente com um drástico aumento da apoptose de células germinativas, em especial das espermátides alongadas. Este tratamento também resulta na atrofia das células de Leydig acompanhada da redução das organelas envolvidas com a síntese de esteróides o que indica efeito inibitório sobre a esteroidogênese. Embora sete semanas após o tratamento estrogênico, já se observe uma recuperação parcial do peso testicular e o diâmetro dos túbulos seminíferos tenha retornado ao normal, o número de células germinativas apoptóticas ainda é 5 vezes mais alto do que nos animais controle e a frequência de espermátides alongadas é um terço do esperado. Além disso, a deficiência em organelas esteroidogênicas nas células de Leydig ainda persiste. Assim, em comparação com os achados prévios referentes à exposição estrogênica durante o período neonatal, podemos concluir que, embora em doses mais altas do que as relatadas na literatura [33-36], a exposição a uma única dose de estrógeno no período pós-púbere ocasiona efeitos mais brandos para a histologia testicular, não resultando em alterações morfológicas evidentes. Entretanto, mesmo que a histologia testicular não tenha sido alterada drasticamente, nossos dados revelam um severo dano para a função testicular com prejuízos relacionados à perda de espermátides finais e provável deficiência da atividade esteroidogênica que ainda persistem 50 dias após o tratamento.

Sabe-se que o testículo é ao mesmo tempo o sítio de síntese e de ação de estrógenos [5,16]. Na última década houve uma crescente expansão do conhecimento a respeito dos tipos celulares envolvidos com esses processos [5,16,37]. Em ratos, o sítio principal de aromatização de testosterona em estrógeno é dependente da idade, pois em animais jovens, entre 20 e 28 dias de idade, esse processo ocorre nas células de Sertoli e é direcionado pelo FSH [38], enquanto, em adultos ele é estimulado pelo LH e ocorre preferencialmente nas células de Leydig [39]. Recentemente também foi detectada a atividade da aromatase citocromo P450 nas espermátides e nos espermatozóides, sendo que

neste último caso ela diminui quando da passagem destes pelo corpo e cauda do epidídimo [40]. No caso do rato, parece existir uma distribuição diferencial das duas isoformas de receptores de estrógeno no testículo, com as células de fora dos túbulos seminíferos expressando preferencialmente os receptores tipo α e as do epitélio germinativo o tipo β [1,16,41,42]. Tendo estas considerações em mente é razoável supor que a exposição passageira a dose alta do estrógeno ou do anti-estrógeno não esteroide Tamoxifeno deve ser interpretada como tendo efeitos diretos decorrentes da super-estimulação das células que expressam esses receptores. É o que parece ter ocorrido no presente estudo visto que as células germinativas mais afetadas foram as espermátides finais que sabidamente contém ambos os receptores de estrógenos e também a atividade aromatásica. As nossas análises demonstraram que a quantidade de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos dos ratos tratados com estrógeno diminuiu drasticamente, e que, pelo menos em parte, isso foi devido à apoptose das células nesta fase final de diferenciação. Blanco-Rodriguez e Martinez-Garcia [43] sugeriram que o estrógeno possa ser pro-apoptótico para as células germinativas, pois a administração de estradiol (50mg/dia) em ratos machos provocou apoptose dessas células, atribuída à diminuição dos níveis de gonadotrofinas e de testosterona. Nossos dados a cerca do número de células germinativas apoptóticas [44] e seu drástico aumento sete dias após a exposição estrogênica confirmam seu papel indutor de apoptose.

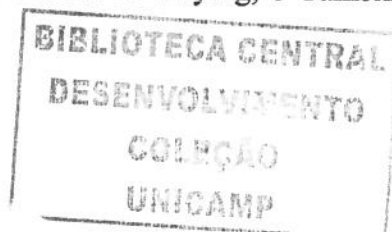
Várias investigações têm indicado que a exposição a altas doses de estrógeno leva a uma ruptura no eixo hipotálamo-hipofisário, bloqueando a secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, inibindo a produção de testosterona [33-36]. Uma dose alta única de benzoato de estradiol em ratos machos com um dia de idade causa uma redução tanto na secreção de GnRH como na resposta pituitária para a GnRH [35], assim como uma profunda supressão na circulação FSH, LH e conseqüentemente nos níveis de testosterona [36]. Essa diminuição também é observada em ratos machos adultos que receberam doses de estradiol durante 10 dias [33]. Assim, com base nesses relatos anteriores pode-se sugerir que o tratamento com o benzoato de estradiol aqui empregado tenha acarretado um bloqueio da síntese de FSH e LH e também de testosterona, induzindo uma ruptura endócrina nos animais pós-púberes.

Embora seja difícil discriminar os efeitos diretos e os indiretos da exposição estrogênica dos animais pós-púberes para a fisiologia testicular, a partir dos métodos utilizados no presente estudo, a comparação dos efeitos causados pelo anti-estrógeno Tamoxifeno pode auxiliar nesta interpretação. O Tamoxifeno é um anti-estrógeno não esteroide amplamente usado no tratamento do câncer de mama. Ele bloqueia competitivamente os receptores de estrógeno e seus efeitos variam de um completo antagonismo ao estrógeno até o puro agonismo, dependendo da concentração e do tecido alvo [45,46]. Em humanos e ratos ele é preferencialmente anti-estrogênico com uma atividade estrogênica residual [47]. Tratamentos prolongados (acima de 30 dias) de ratos adultos com o Tamoxifeno reduzem os níveis séricos de LH e testosterona [48], levam a anormalidades nos espermatozoides [49], à diminuição da fecundidade, da fertilidade e da potência [48]. Também tem sido relatada uma desorganização do epitélio seminífero em tratamentos de 90 dias, de tal modo que a classificação em estádios não é possível [48,50]. Por outro lado, tem sido constatado que uma única dose de 50mg desse anti-estrógeno não causa alterações, seja em curto ou em longo termo, nos níveis de gonadotrofinas e dos hormônios esteróides sexuais de ratos adultos [51]. Portanto, com base nos dados de Fauser e cols. [51] nós sugerimos que as alterações induzidas no presente estudo pela administração de uma única dose de Tamoxifeno foram causadas pelo bloqueio da ação do estrógeno nas células alvo.

A análise ultra-estrutural não permitiu notar efeitos lesivos evidentes nas células de Sertoli que exibiram uma organização aparentemente normal no que se refere à quantidade e disposição de organelas, elementos do citoesqueleto e junções celulares. Foi observado um aparente acúmulo de estruturas semelhantes a vesículas de mielina no seu citoplasma (não mostrado) após ambos os tratamentos, o que merece uma investigação mais detalhada. Apesar do aspecto aparentemente normal, constatou-se uma diminuição no número de perfis nucleares desta célula por corte transversal de túbulo seminífero no testículo dos animais tratados uma semana antes com estrógeno ou com o anti-estrógeno. Não é possível afirmar que esta variação é consequência de uma diminuição no número total de células de Sertoli, mas é muito provável que isto tenha ocorrido, ainda mais se for considerado que a diminuição aqui constatada pode ter sido subestimada, pois o diâmetro

tubular diminui após os tratamentos. De qualquer modo, essa diminuição foi observada para ambos os tratamentos podendo ser interpretada como um efeito direto do estrógeno ou do seu agonista sobre esse tipo celular. Sabe-se que a exposição temporária aos estrógenos, seja na fase gestacional ou no período pós-natal, reduz o número de células de Sertoli no testículo adulto com drásticas implicações para a produção de espermatozóides [52]. Sabe-se, também, que o estrógeno em concentrações normais tem um efeito estimulatório sobre a divisão das células de Sertoli, durante o desenvolvimento pós-natal do testículo de roedores, exibindo um efeito negativo sobre a diferenciação desse tipo celular [4]. Com bases nessas informações e considerando que as essas células são altamente resistentes, não ciclantes, e que não foram encontrados sinais de morte ou degeneração é possível sugerir que a diminuição do número de perfis nucleares observada logo após os tratamentos seja consequência de um aumento no volume citoplasmático ou hipertrofia, ou seja, consequência da ação estimulatória do estrógeno que, por sua vez, pode ter levado ao aumento na sua atividade metabólica. Esta hipótese, entretanto, requer confirmação. Também não se pode deixar de mencionar que muitas das alterações que persistem em médio prazo, tais como a redução do diâmetro tubular e o aumento das taxas de apoptose das células germinativas, possam ser consequência de um comprometimento funcional das células de Sertoli em longo prazo.

Várias evidências comprovam a função inibitória do estrógeno sobre o desenvolvimento e a função das células de Leydig [5]. A esteroidogênese das células de Leydig é diretamente inibida pelo estradiol [53]. Tem sido relatado que uma única dose de estrógeno a ratos no 5º. dia de idade leva a infertilidade e ausência de células de Leydig maduras no testículo de animais adultos [31]. Nossos dados mostram que, em curto prazo, ambos os tratamentos levam a atrofia das células de Leydig, mas que esta atrofia persiste apenas no caso do tratamento com o Tamoxifeno onde foram encontradas células com sinais de degeneração. Em adição, a análise ultra-estrutural revelou que esta atrofia é acompanhada pela diminuição das organelas envolvidas com a esteroidogênese para ambos os tratamentos em curto prazo e isso persiste apenas no caso do tratamento com o estrógeno. Assim, é possível sugerir que, para as células de Leydig, o Tamoxifeno atuou



como um agonista do estrógeno e confirmar os efeitos inibitórios da ação estrogênica sobre a atividade esteroideogênica, previamente descritos [5,53].

Em resumo, concluímos que tanto a exposição passageira ao estrógeno como ao Tamoxifeno interfere negativamente na dinâmica testicular de ratos jovens, levando a danos na espermatogênese que persistem nos animais adultos com uma provável redução da fertilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem Luiz Roberto Falleiros Jr. (Centro de Microscopia - IBILCE), Rosana Silistino de Souza, M.Sc. (Laboratório de Morfologia -IBILCE), pela assistência técnica, à Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro. Agradecemos também a Sabrina Santos Rochel e a Lara Silvia Corradi pela imprescindível ajuda na confecção final deste artigo.

Referências Bibliográficas

- [1] O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001;22:289-318.
- [2] Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 1995;136:5311-5321.
- [3] McLachlan RI, O'Donnell LO, Meachem SJ, Stanton PG, Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, e man. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:149-179.
- [4] Sharpe RM, Atanassova N, Mckinnell C, Parte P, Turner KJ, Fisher JS, Kerr JB, Groome NP, Macpherson S, Millar MR, Saunders PT. Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biol Reprod* 1998;59:1084-1094.

- [5] Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* 1999;64:610-617.
- [6] Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the reproductive tract? *Lancet* 1993;341:125-126.
- [7] Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:741-803.
- [8] Williams K, Mckinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update* 2001;7:236-47.
- [9] Atanassova N, Mckinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 1999;140:5364-73.
- [10] Atanassova N, Mckinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000;141:3898-907.
- [11] Mckinnell C, Atanassova N, Williams K, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders TK, Sharpe RM. Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl* 2001;22:323-338.
- [12] Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996;137:4796-4805.
- [13] Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15677-82.
- [14] Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20:358-417.

- [15] Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7986-91.
- [16] Hess RA, Bunick D, Bahr J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:29-38.
- [17] Mahato D, Goulding EH, Korach KS, Eddy EM. Estrogen receptor-alpha is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:57-63.
- [18] Behmer OA, Tolosa EMC, Neto AGF. Manual de práticas para histologia normal e patológica. EDART-EDUSP, SP. 1976. 329p.
- [19] Watson ML. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958;4:475-478.
- [20] Venable JH, Coggeshall R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965;25:407-408.
- [21] Chandolia RK, Weinbauer GF, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat. *Acta Endocrinol* 1991;125: 547-55.
- [22] Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1952;55:548-573.
- [23] Hess R. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod*; 1990;43:525-542.
- [24] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest* 1963;12:131-155.
- [25] Carreau S, Genissel C, Bilińska B, Levallet J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 1999;22:211-23.
- [26] Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilińska B, Benahmed M, Levallet J. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2001;79:203-208.
- [27] Carreau S. Estrogens – male hormones? *Folia Histochem Cytobiol* 2003;41:107-11.

- [28] Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2057-67.
- [29] Cho HW, Nie R, Carnes K, Zhou Q, Sharief N, Hess RA. The antiestrogen ICI 182,780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1: 57-65.
- [30] Gancarczyk M, Paziewska-Hejmej A, Carreau S, Tabarowski Z, Bilińska B. Dose- and photoperiod –dependent effects of 17 β -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoexpression in immature bank voles. *Acta Histochemica* 2004;106:269-278.
- [31] Dhar JD, Setty BS. Epididymal response to exogenous testosterone in rats sterilized neonatally by estrogen. *Endokrinologie* 1976;68:14-21.
- [32] Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Alternating proliferative and secretory activities contribute to the post-natal growth of the rat ventral prostate. *Anat Record* 2005;*in press*.
- [33] De Jong FH, Uilenbroek TJ, van Der Molen HJ. Oestradiol-17 β , testosterone and gonadotrophins in oestradiol-17 β -treated intact adult male rats. *J Endocrinol* 1975;65:281-282.
- [34] Grocock CA, Charton HM, Pike MC. Role of fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 1988;83:295-300.
- [35] Pinilla L, Garnelo P, Gaytan F, Aguilar E. Hypothalamic-pituitary function in neonatally oestrogen-treated male rats. *J Endocrinol* 1992;134:279-286.
- [36] Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Aguilar E. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor α and β mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 2000;165:345-357.
- [37] Sharpe R.M. The roles of estrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9:371-377.
- [38] Pomerantz DK. Developmental changes in the ability of FSH to stimulate estrogen synthesis in vivo by the testis of the rat. *Biol Reprod* 1980;23:948-954.
- [39] De Jong FH, Hey AH, van Der Molen HJ. Effect of gonadotropins on the secretion of estradiol-17 β and testosterone by the rat testis. *J Endocrinol* 1973;57:277-284.

- [40] Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997;390:509-511.
- [41] Shybayama T, Fukata H, Sakurai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T, Mori C. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocr J* 2001;48:655-63.
- [42] Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PTK, Katzeneenbogen BS, Hess RA. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002;23:870-881.
- [43] Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *Int J Androl* 1996;19:237-47.
- [44] Barqawi A, Caruso A, Meacham RB. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *The Journal of Urology* 2004;171:501-503.
- [45] Parte PP, Balasinor N, Gill-Sharma MK, Juneja HS. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone implants on the fertility of male rats treated with tamoxifen. *J Androl* 2000;21:625-33.
- [46] Corrada Y, Arias D, Rodriguez R, Spaini E, Fava F, Gobello C. Effect of tamoxifen citrate on reproductive parameters of male dogs. *Theriogenology* 2004;61:1327-41.
- [47] Furr BJA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of Tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984;25:127-205.
- [48] Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasinor N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. Effects of Tamoxifen on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 1993;99:395-402.
- [49] Padmalatha Rai S, Vijayalaxmi KK. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the vivo mouse. *Mutat Res* 2001;492:1-6.
- [50] Gopalkrishnan K, Gill-Sharma MK, Balasinor N, Padwal V, D'Souza S, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. Tamoxifen-induced light and electron microscopic changes in the rat testicular morphology and serum hormonal profile of reproductive hormones. *Contraception* 1998;57:261-269.
- [51] Fauser BC, Dony JM, Doesburg WH, Thomas CM, Rolland R. Short- and long-term hormonal effects of a single dose of 50 mg tamoxifen administered to normal males. *Andrologia* 1984;16:465-70.

[52] Fielden MR, Halgren RG, Fong CJ, Staub C, Johnson L, Chou K, Zacharewski TR. Gestational and lactational exposure of male mice to diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability in vitro, and testicular gene expression. *Endocrinology* 2002;143:3044-59.

[53] Kalla NR, Nisula BC, Minard R, Loriaux DL. The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. *Endocrinology* 1980;106:35-9.

Tabela 1 – Volume ocupado pelas células de Leydig no testículo (%), área citoplasmática e área nuclear (μm^2) das células de Leydig de ratos, 1 (A, 6 semanas de idade) e 7 semanas (B, 12 semanas de idade) após o tratamento com veículo farmacológico (Controle), 35mg/Kg de peso corporal de 3-benzoato de β estradiol e 35mg/Kg de peso corporal de Tamoxifeno. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão referentes a 5 animais. * - $p \leq 0,05$.

	Volume Relativo		Área citoplasmática		Área nuclear	
	A	B	A	B	A	B
Controle	7,8 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,4	191,2 $\pm$ 10,9	197 $\pm$ 13,8	42,3 $\pm$ 1,3	49 $\pm$ 2,7
Estrógeno	3,5 $\pm$ 0,2*	3 $\pm$ 0,3	151,35 $\pm$ 7,6*	188,3 $\pm$ 8,9	41,8 $\pm$ 1,3	44,6 $\pm$ 1,6
Tamoxifeno	6,4 $\pm$ 1,9	2,6 $\pm$ 0,2	135,4 $\pm$ 9,1*	143,9 $\pm$ 6*	39,1 $\pm$ 0,9	41,8 $\pm$ 1,6*

Legenda das Figuras

Figura 1 – Variações no peso corporal, peso testicular e Índice testículo-somático (TSI) de ratos, 1 (A) e 7 semanas (B) após a administração do veículo farmacológico (Cont), de benzoato de estradiol (Est) e de Tamoxifeno (Tam). * - $p \leq 0,05$.

Figura 2 – Cortes histológicos em historesina corados com Reticulina de Gömöri de testículo de ratos tratados uma semana (A-F) ou sete semanas (G-L) antes com o veículo farmacológico (A, D, G, J), benzoato de estradiol (B, E, H, K) e Tamoxifeno (C, F, I, L), mostrando os túbulos seminíferos (A, B, C, G, H, I) ou detalhe do epitélio seminífero no estágio VII. A espermatogênese completa não ocorre em todos os túbulos seminíferos nos animais controle de seis semanas de idade (A), mas apenas em alguns (D). O diâmetro tubular é menor (B) e as espermatídes alongadas estão ausentes no epitélio seminífero nos animais tratados sete dias antes com o estrógeno (B, E), onde é observada a presença de células apoptóticas (setas). O testículo (C) e o epitélio seminífero (F) de rato jovem tratado com Tamoxifeno aparecem histologicamente normais. No animal controle de 12 semanas de idade a espermatogênese é completa (G, J). O diâmetro dos túbulos seminíferos permanece menor nos animais tratados sete semanas antes com estrógeno (H) e as células apoptóticas (setas) ainda são observadas no epitélio seminífero (K). Os túbulos seminíferos dos animais tratados com Tamoxifeno sete semanas antes também apresentam menor diâmetro (I) mas não foram encontradas lesões no epitélio seminífero (L). Legenda: S- Célula de Sertoli; G- Espermatônia; P- Espermatócito primário em Paquíteno; St7- Espermatíde esférica na fase 7 de diferenciação; St19- Espermatíde alongada na fase 19 de diferenciação. A-C, G-I = 100x. D-F, J-L = 400x.

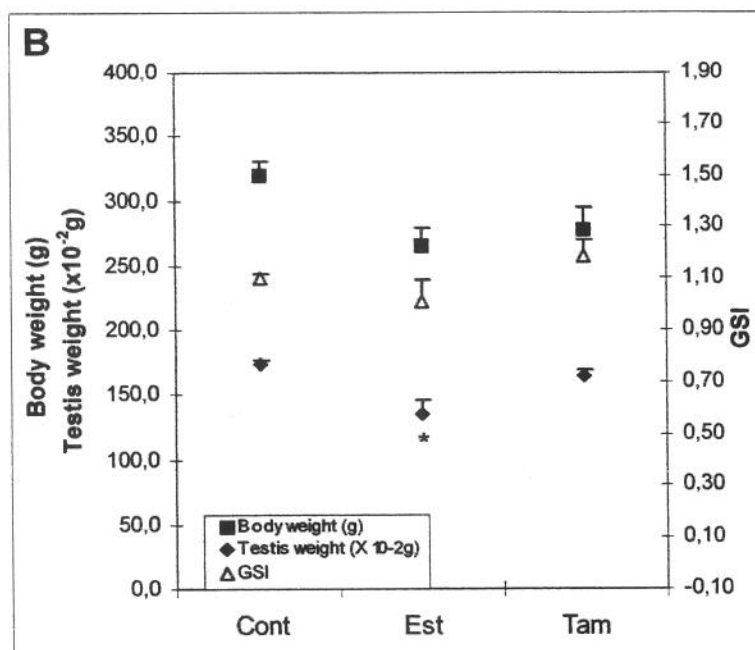
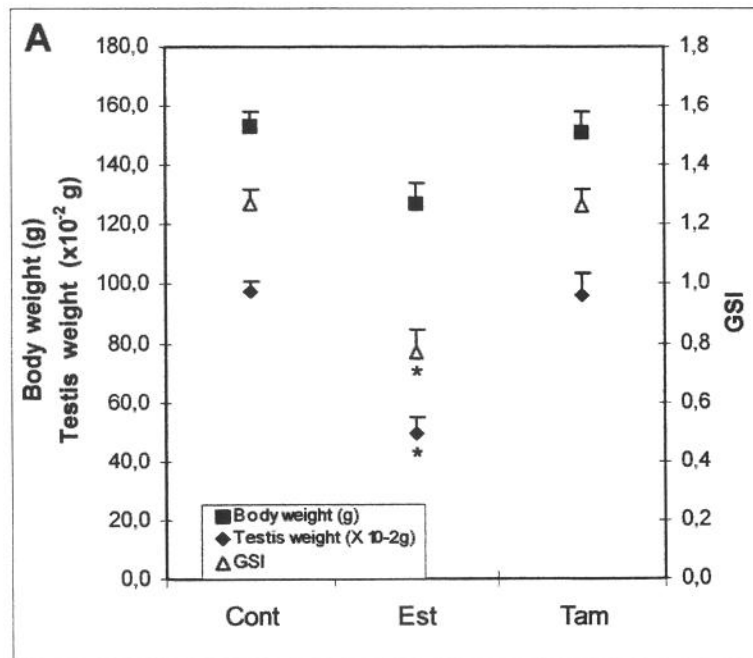
Figura 3 - Variação no (A) diâmetro dos túbulos seminíferos e na frequência dos tipos celulares do epitélio germinativo (B-F) detectadas após uma (barras preenchidas) e sete semanas (barras vazias) nos ratos tratados com uma dose única do veículo farmacológico (Cont), benzoato de estradiol (Est) e Tamoxifeno (Tam). * - $p \leq 0,05$.

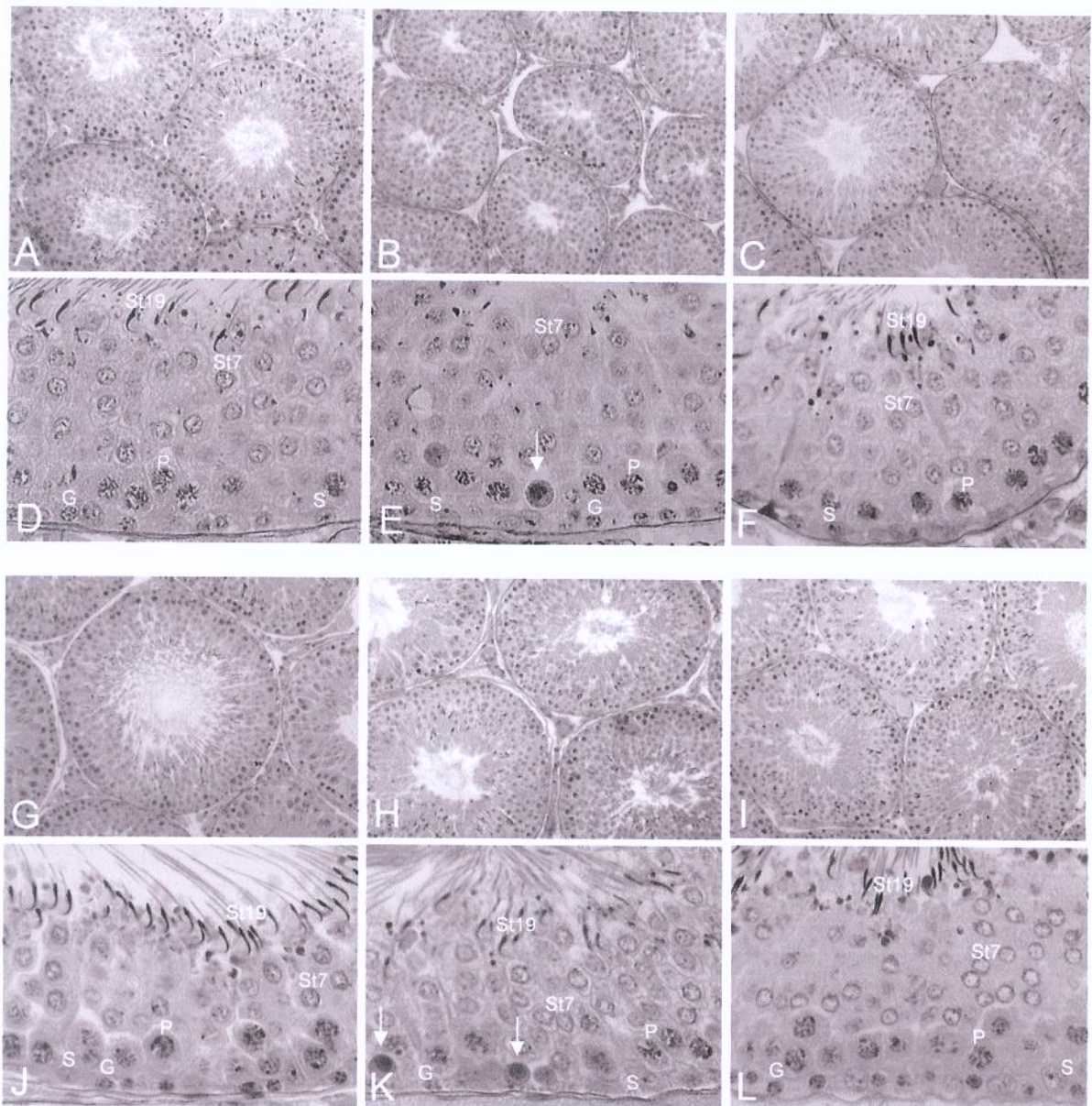
Figura 4 – Frequência de túbulos seminíferos nos testículos de ratos tratados uma (A) ou sete (B) semanas antes com uma dose única do veículo farmacológico (Cont), benzoato de estradiol (Est) e Tamoxifeno (Tam), segundo a quantidade de espermátides alongadas (0, menos de 25, entre 25 e 100, 100 ou mais). * - $p \leq 0,05$.

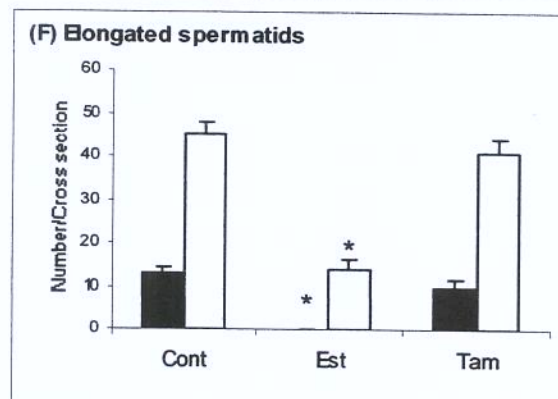
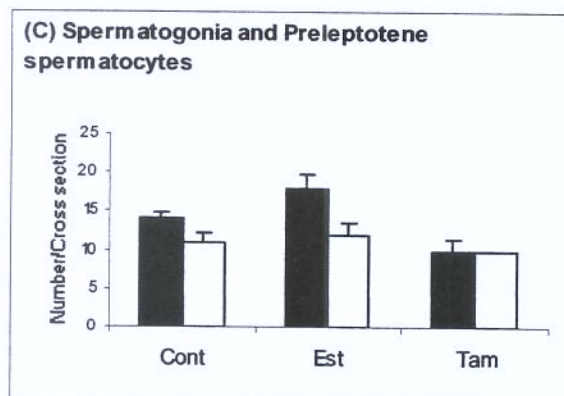
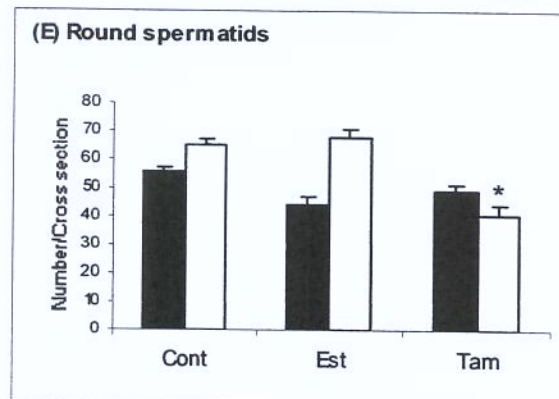
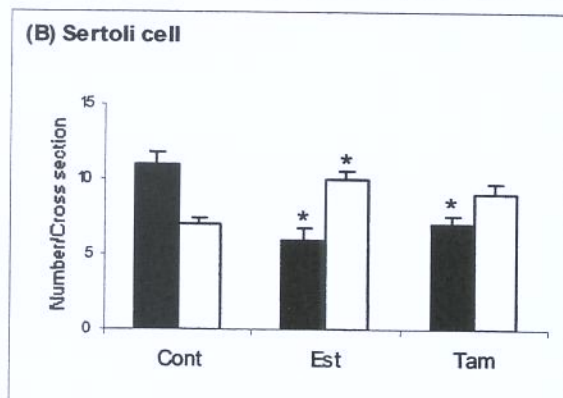
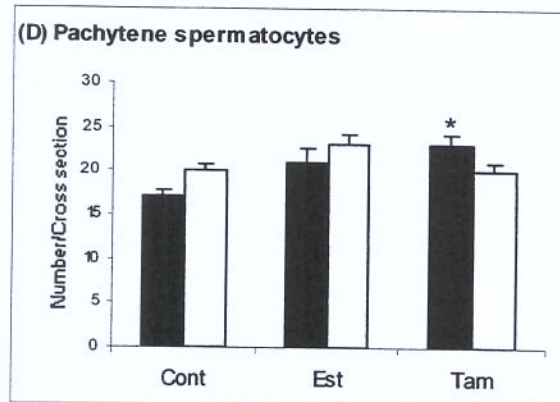
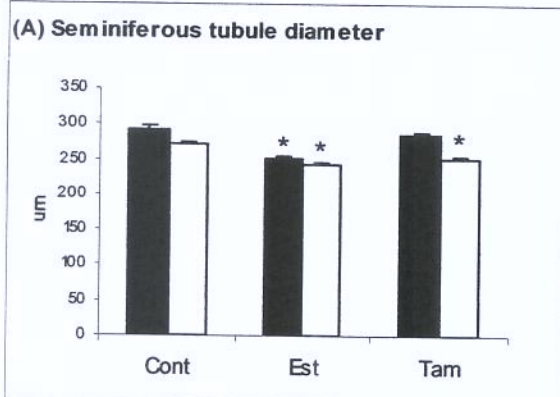
Figura 5 – Cortes histológicos de testículo de ratos com 6 (A, B, C, G-K) e 12 (D,E,F) semanas de idade contra-corados com hematoxilina, mostrando a presença de células germinativas TUNEL-positivas em animais submetidos a administração de veículo farmacológico (A, D), benzoato de estradiol (B, E, G-K) e Tamoxifeno (C, F). A-F = 200x. G,H = 400x. I-K = 1000x.

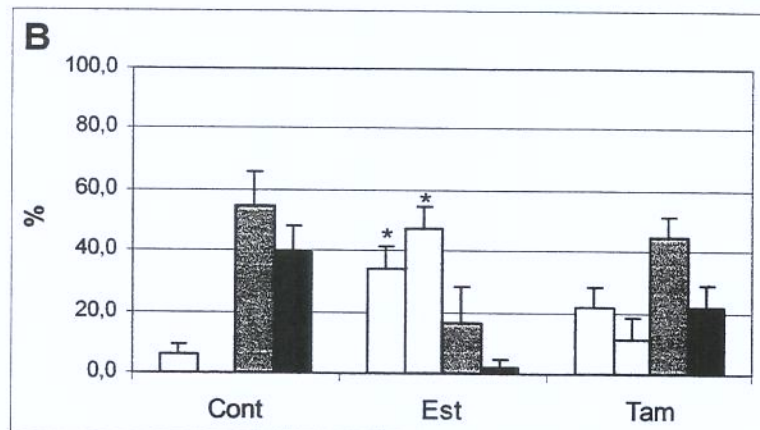
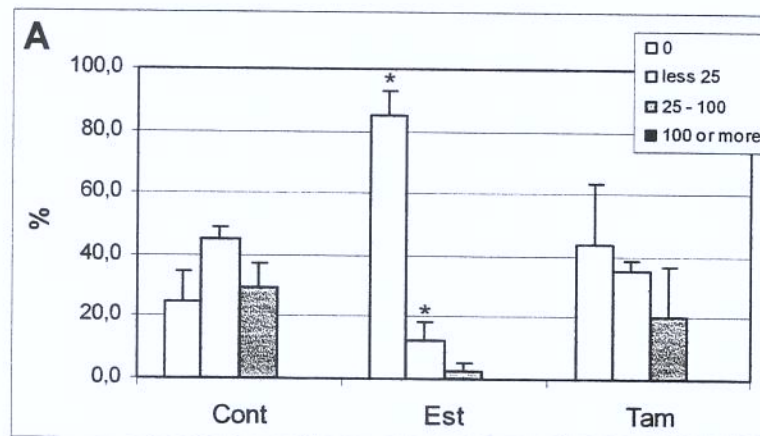
Figura 6 – Cortes ultrafinos de testículo de rato jovem uma semana após a administração de uma dose única de estrógeno, mostrando o citoplasma de células de Sertoli contendo espermátides em apoptose. As setas indicam os flagelos das espermátides. Barras: A = 1,5 μm ; B = 0,93 μm ; C = 3,36 μm ; D = 2,0 μm .

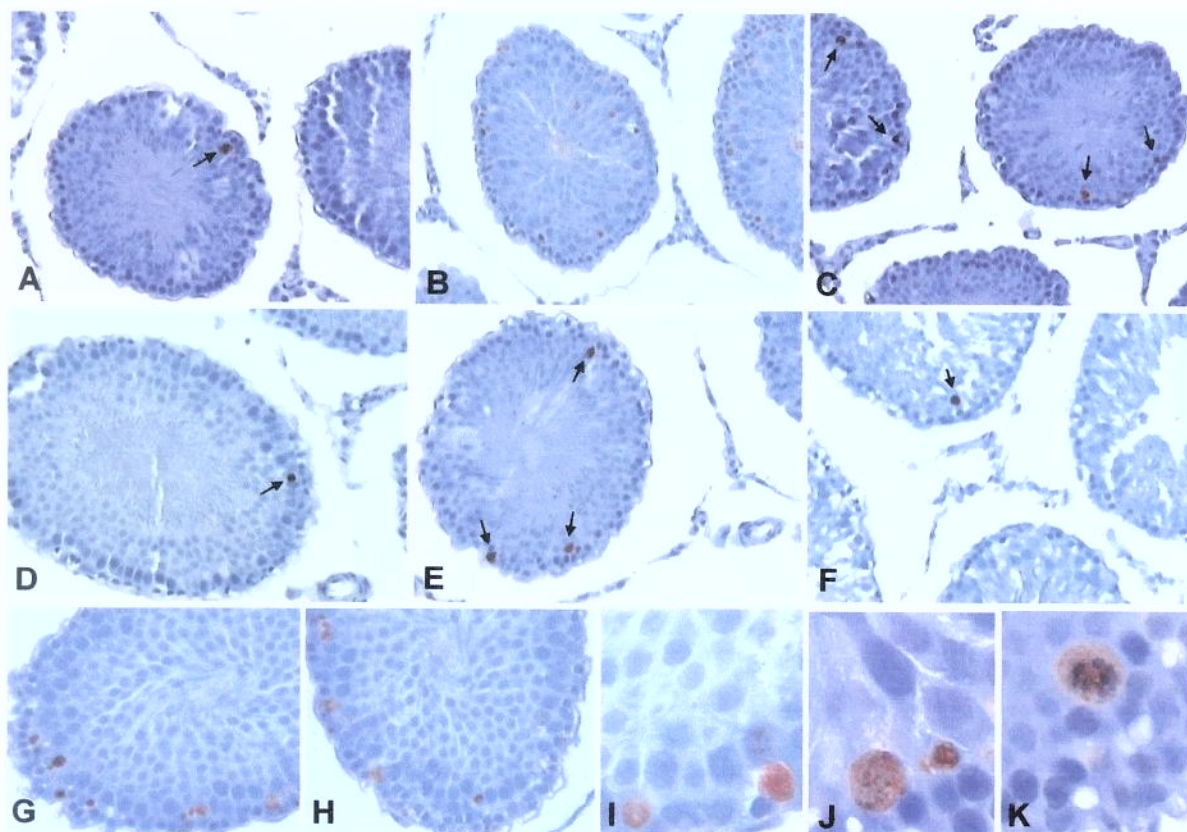
Figura 7 – Aspectos ultra-estruturais das células de Leydig de ratos com 6 (A, B, C, D) e 12 semanas de idade (E, F) que foram tratados uma (A, B, C,D) e sete (E,F) semanas antes com veículo farmacológico (A), benzoato de estradiol (C, E) e Tamoxifeno (B, D, F). Legenda: N – Núcleo; SER – Retículo Endoplasmático Liso; GC – Complexo de Golgi; M – Mitocôndrias; Barras: A = 1,5 μm ; B = 2,0 μm ; C = 1,2 μm ; D = 1,0 μm ; E = 0,71 μm ; F = 2,6 μm .

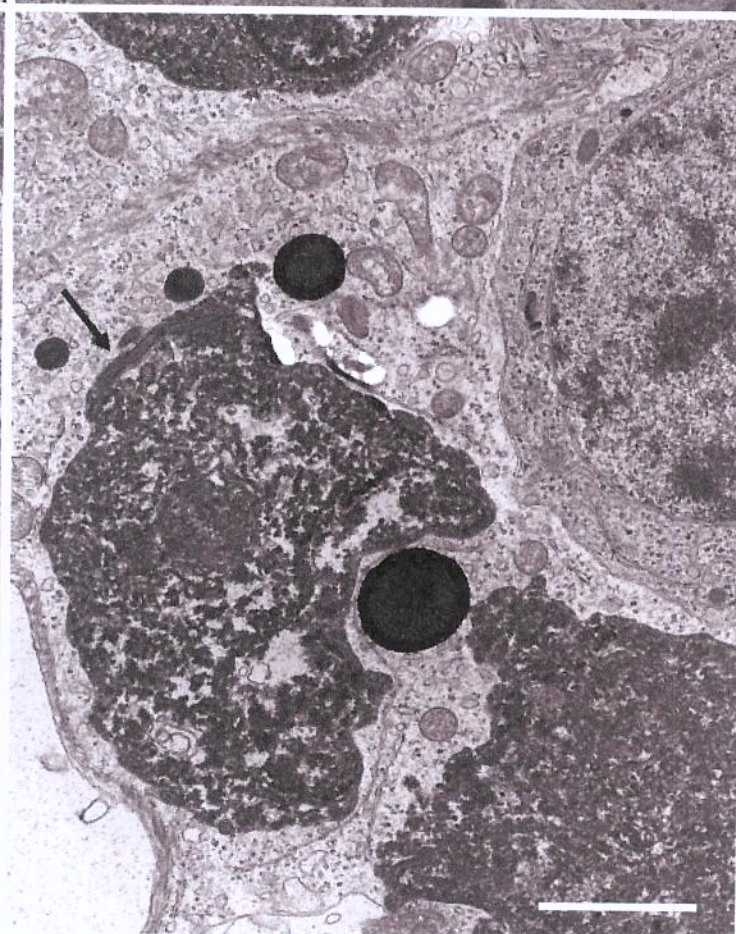
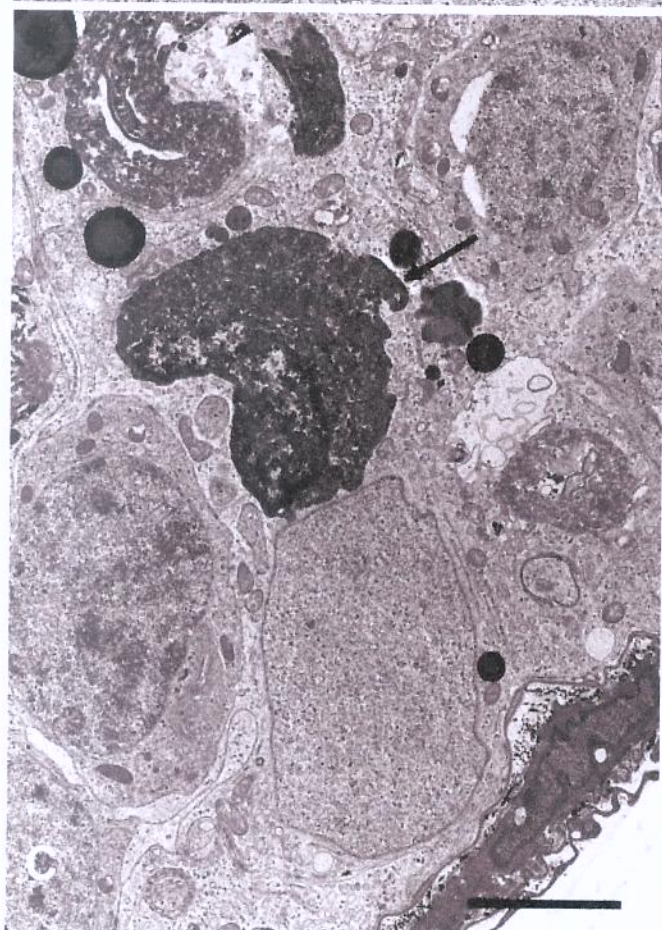
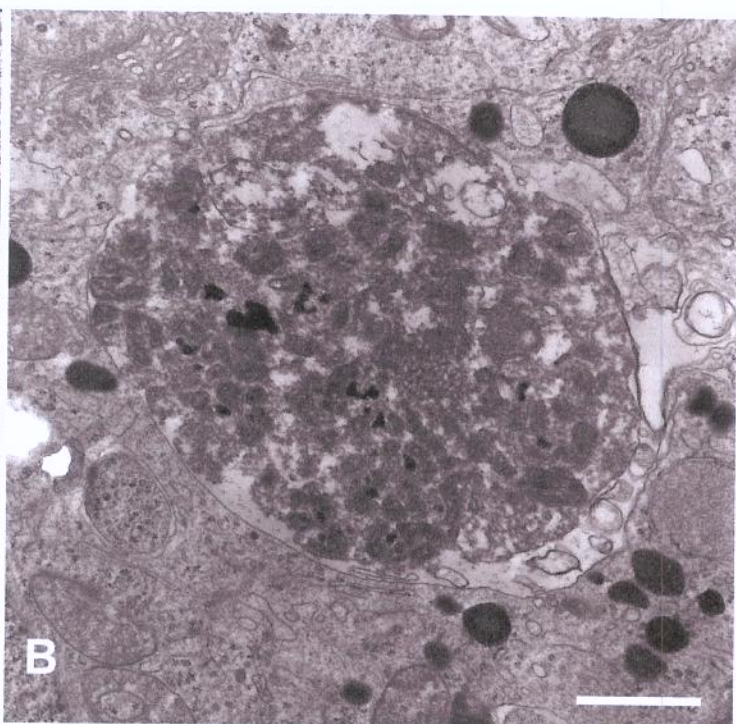
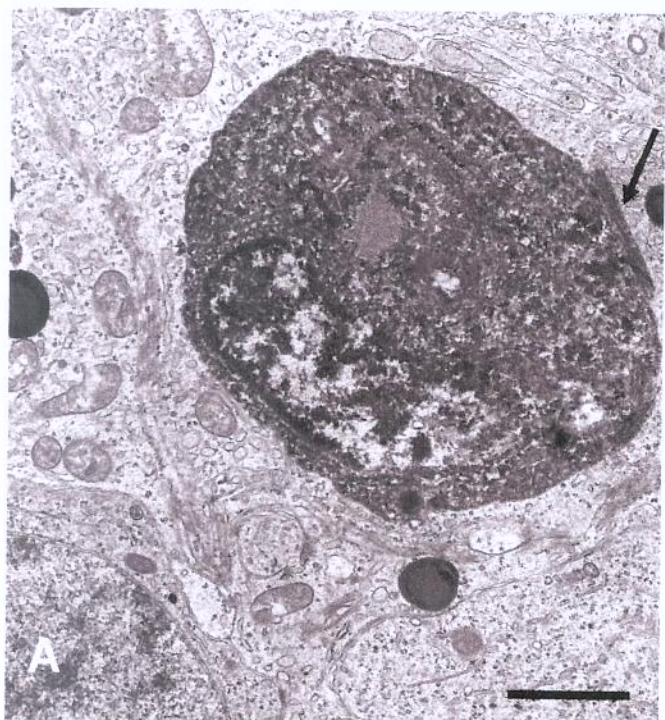


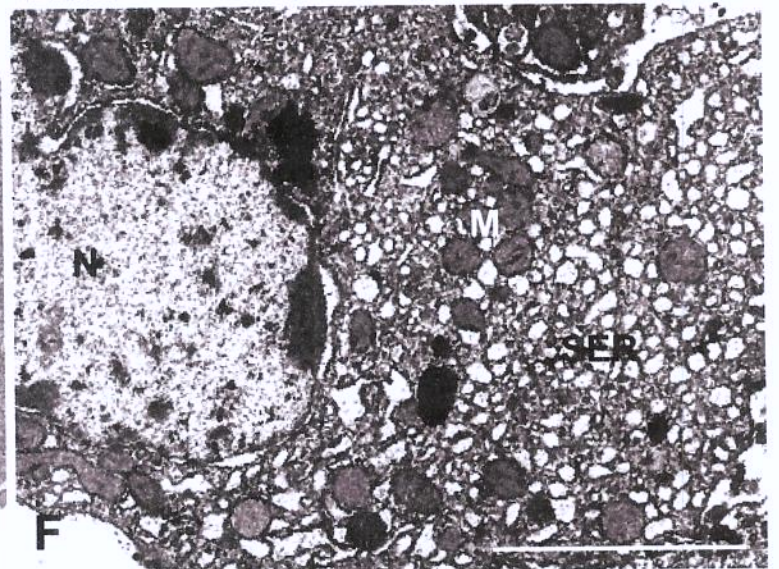
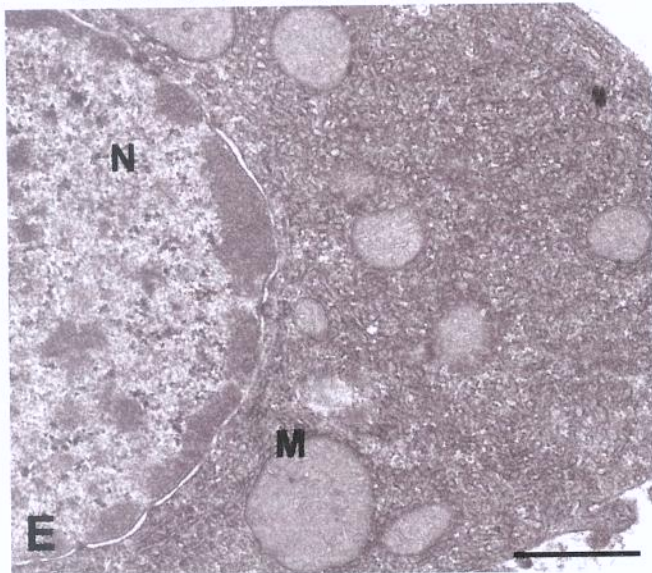
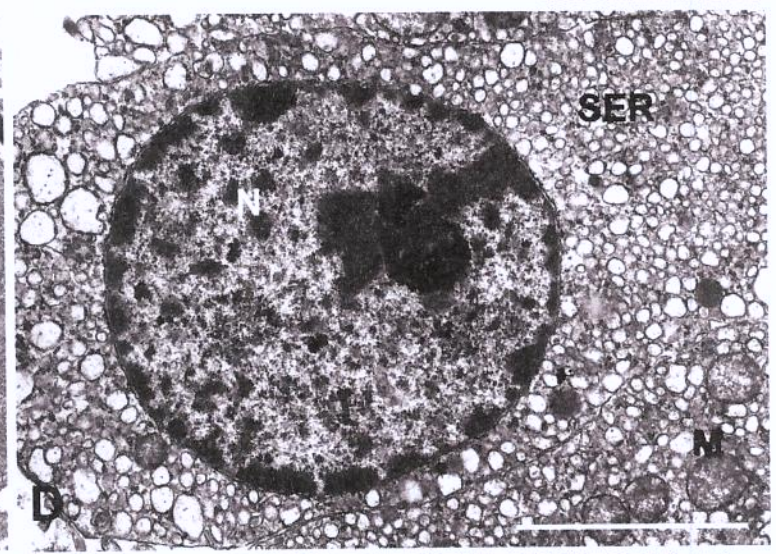
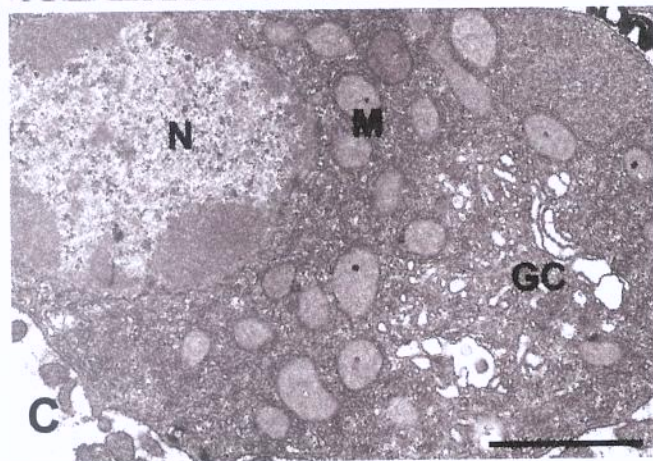
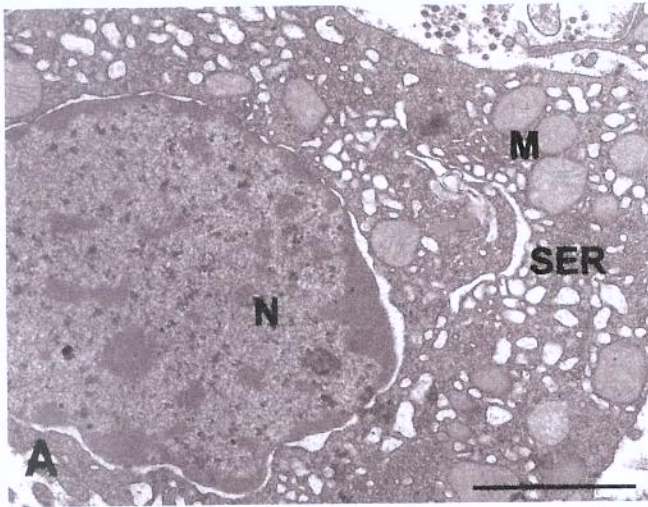












VI – CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES GERAIS

A partir de análises histológicas e ultra-estruturais, assim como das avaliações morfológicas e esteriológicas constatou-se que administração de uma dose alta de benzoato de estradiol a ratos jovens causa uma drástica atrofia testicular acompanhada de redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e destruição, por apoptose, de espermatídes na fase final de diferenciação, além de induzir atrofia das células de Leydig e diminuir sua capacidade esteroidogênica. Embora sete semanas após a exposição estrogênica o Índice Gônado Somático tenha retornado ao normal, o prejuízo para a fisiologia testicular ainda é evidente. Assim, concluiu-se que mesmo quando administrado no período pós-púbere, quando o testículo já se encontra na fase final de maturação, o estrógeno tem um grande efeito genotóxico, relacionado à destruição de espermatídes alongadas e bloqueio da atividade esteroidogênica das células de Leydig.

Em curto prazo, o bloqueio agudo da atividade do estrógeno em ratos jovens, pela aplicação de alta dose do anti-estrógeno Tamoxifeno, causa discretas alterações no testículo em comparação com a aplicação direta do estrógeno. Entretanto, em médio prazo, ele leva a uma discreta redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, atrofia das células de Leydig, diminuição do número de espermatídes esféricas e um aumento do número de células apoptóticas para níveis semelhantes aos da exposição estrogênica. Portanto, concluímos que seus efeitos danosos ocorrem preferencialmente em médio prazo.

Em resumo, concluímos que tanto a exposição passageira ao estrógeno como ao Tamoxifeno interfere negativamente na dinâmica testicular de ratos jovens, levando a danos na espermatogênese que persistem nos animais adultos com uma provável redução da fertilidade.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATANASSOVA N, MCKINNELL C, WALKER M, TURNER KJ, FISHER JS, MORLEY M, MILLAR MR, GROOME NP, SHARPE RM. 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140: 5364-73.
- ATANASSOVA N, MCKINNELL C, TURNER KJ, WALKER M, FISHER JS, MORLEY M, MILLAR MR, GROOME NP, SHARPE RM. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-907.
- BRAUN RE. 1998. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9:483-489.
- BREMNER WJ, MILLAR MR, SHARPE RM, SAUNDERS PR. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135:1227-1234.
- CARREAU S, GENISSEL C, BILIŃSKA B, LEVALLET J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 22:211-23.
- CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, GENISSEL C, BILIŃSKA B, BENAHMED M, LEVALLET J. 2001. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 79:203-208.
- CARREAU S. 2003. Estrogens – male hormones? *Folia Histochem Cytobiol* 41:107-11.
- CHO HW, NIE R, CARNES K, ZHOU Q, SHARIEF N, HESS RA. 2003. The antiestrogen ICI 182, 780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod Biol Endocrinol* 1:57-65.
- CLERMONT Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:98-236.
- CORRADA Y, ARIAS D, RODRIGUEZ R, SPAINI E, FAVA F, GOBELLO C. 2004. Effect of tamoxifen citrate on reproductive parameters of male dogs. *Theriogenology* 61: 1327-41.
- COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON JA, KORACH KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621.

- COUSE JF, KORACH KS. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417.
- DE JONG FH, UILENBROEK TJ, van der MOLEN HJ. 1975. Oestradiol-17 β , testosterone and gonadotrophins in oestradiol-17 β -treated intact adult male rats. *J Endocrinol* 65: 281-282.
- DIKA JK, RODRIGUEZ R, GOUDAZE G. 1998. Influence of genistein (4', 5', 7' - trihydroxy-isoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol Cell* 90: 349-354.
- DIERICH A, SAIRAM MR, MONACO L, FIMIA GM, GANSMULLER A, LEMEURE M, SASSONE-CORSI P. 1998. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13612-13617.
- DYM M, FAWCETT DW. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326.
- EBLING FJP, BROOKS NA, CRONIN AS, FORD H, KERR JB. 2000. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* 141:2861-9.
- EDDY EM, WASHBURN TF, BUNCH DO, GOULDING EH, GLADEN BC, LUBAHN DB, KORACH KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137:4796-4805.
- EMMEN JM, MCLUSKEY A, ADHAM IM, ENGEL W, VERHOEF-POST M, THEMEN AP, GROOTEGOED JA, BRINKMANN AO. 2000. Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 141:846-849.
- ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, LAGERCRANTZ J, FRIED G, NORDENSKJOLD M, GUSTAFSSON JA. 1997. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265.
- FAUSTINI-FUSTINI M, ROCHIRRA V, CARANI C. 1999. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur J Endocrinol* 140:111-229.
- FAWCETT, DW. 1994. Male reproductive system. In: BLOOM W, FAWCETT DW. *A textbook of histology*. Chapman and Hall, New York, pp. 768-815.
- FIELDEN MR, HALGREN RG, FONG CJ, STAUB C, JOHNSON L, CHOU K, ZACHAREWSKI TR. 2002. Gestational and lactational exposure of male mice to

- diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability in vitro, and testicular gene expression. *Endocrinology* 143:3044-59.
- FISHER JS, MILLAR MR, MAJDIC G, SAUNDERS PT, FRASER HM, SHARPE RM. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- α within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 153:485-495.
- FISHER CR, GRAVES KH, PARLOW AF, SIMPSON ER. 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6965-6970.
- FRANÇA LR, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59:1371-1377.
- FURR BJA, JORDAN VC. 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifeno. *Pharmacol Ther* 25:127-205.
- GANCARCZYK M, PAZIEWSKA-HEJMEJ A, CARREAU S, TABAROWSKI Z, BILIŃSKA B. 2004. Dose- and photoperiod -dependent effects of 17 β -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoexpression in immature bank voles. *Acta Histochemica* 106:269-278.
- GILL-SHARMA MK, GOPALKRISHNAN K, BALASINOR N, PARTE P, JAYRAMAN S, JUNEJA HS. 1993. Effects of tamoxifeno on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 99:395-402.
- GNESSI L, FABBRI A, SPERA G. 1997. Gonadal peptides as mediator of development and functional control of the testis: an integrate system with hormones and local environment. *Endocrine reviews* 18:541-590.
- GOPALKRISHNAN K, GILL-SHARMA MK, BALASINOR N, PADWAL V, D'SOUZA S, PARTE P, JAYARAMAN S, JUNEJA HS. 1998. Tamoxifen-induced light and electron microscopic changes in the rat testicular morphology and serum hormonal profile of reproductive hormones. *Contraception* 57:261-269.
- GRECO TL, FURLOW JD, DUELLO TM, GORSKI J. 1992. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology* 130:421-429.
- GUITTON N, TOUZALIN AM, SHARPE RM, CHENG CY, PINON-LATAILLADE G, MERITTE H, CHENAL C, JEGOU B. 2000. Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. *J Androl* 23: 332-339.

- GUPTA C. 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 224:61–68.
- HAIDER SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology* 233:181–224.
- HESS R. 1990. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod*; 43:525–542.
- HESS RA, BUNICK D, LEE KH, BAHR J, TAYLOR JA, KORACH KS, LUBAHN DB. 1997. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature* 390:509–511.
- HESS RA, BUNICK D, BAHR J. 2001. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Mol Cell Endocrinol* 178:29–38.
- HESS RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52–6.
- JEFFERSON WN, COUSE JF, BANKS EP, KORACH KS, NEWBOLD RR. 2000. Expression of estrogen receptor β is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod* 62:310–317.
- JUNIEWICZ PE, OESTERLING JE, WALTERS JR, STEELE RE, NISWENDER GD, COFFEY DS, EWING LL. 1988. Aromatase inhibition in the dog. I. Effect on serum LH, serum testosterone concentrations, testicular secretions and spermatogenesis. *J Urol* 139:827–831.
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. 2004. *Histologia Básica – Texto e Atlas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- KIM IH, SON HY, CHO SW, HA CS, KANG BH. 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Letters* 138:185–192.
- KREGE JH, HODGIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON JA, SMITHIES O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15677–82.
- KUIPER-GOODMAN T, SCOTT PM, WATANABLE H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 7:253–306.
- KULA K. 1988. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotrophin and inhibition by simultaneous administration of gonadotrophins and testosterone. *Endocrinology* 122:34–9.

- KUMAR TR, WANG Y, LU N, MATZUK MM. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15:201–204.
- KUROSUMI M, ISHIMURA K, FUJITA H, OSAWA Y. 1985. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry* 83:401–404.
- LEBLOND CP, CLERMONT Y. 1952a. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat* 90:167–206.
- LEBLOND CP, CLERMONT Y. 1952b. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55:548–573.
- LEE KH, HESS RA, BAHR J, LUBAHN DB, TAYLOR J, BUNICK D. 2000. Estrogen receptor α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod* 63:1873–80.
- LINDZEY J, WILLIAM WC, COUSE JF, STOKER T, COOPER R, KORACH KS. 1998. Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor α -knockout mice. *Endocrinology* 139:4092–4101.
- MAHATO D, GOULDING EH, KORACH KS, EDDY EM. 2001. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development or function. *Endocrinology* 141:1273–6.
- McLACHLAN JA, NEWBOLD RR, BULLOCK B. 1975. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science* 190:991–992.
- McLACHLAN JA. 1977. Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice: toxicological studies. *J Toxicol Environ Health* 2:527–537.
- McLACHLAN, WREFORD NG, O'DONNELL L, KRETZER DM, ROBERTSON DM. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148:1–9.
- McLACHLAN RI, NEWBOLD RR, LI S, NEGISHI M. 1998. Are estrogens carcinogenic during development of testes? *APMIS* 106:240–244.
- McLACHLAN RI, O'DONNELL LO, MEACHEM SJ, STANTON PG, KRETZER DM, PRATIS K, ROBERTSON DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57:149–179.
- MENDIS-HANDAGAMA SMLC, ARIYARATNE H.B.S. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660–671.

- MIRICHA CJ, CHRISTENSEN CM, NELSON GH. 1968. Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotechnol Bioengng* 10:469-482.
- MIURA T, MIURA C, OHTA T, NADER MR, TODO T, YAMAUCHI K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:230-234.
- NEF S, SHIPMAN T, PARADA LF. 2000. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol* 224:354-361.
- NEWBOLD RR, BULLOCK BC, McLACHLAN JA. 1985. Lesions of the rete testis in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res* 45:5145-5150.
- NEWBOLD RR, BULLOCK BC, McLACHLAN JA. 1987a. Mullerian remnants of male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Teratog Carcinog Mutagen* 7:377-389.
- NEWBOLD RR, BULLOCK BC, MCLACHLAN JA. 1987b. Testicular tumors in mice exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Urol* 138:1446-1450.
- NIELSEN M, BJORNSDOTTIR S, HOYER PE, BYSKOV AG. 2000. Ontogeny of oestrogen receptor in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *J Reprod Fertil* 118:195-204.
- OHTA Y, UESUGI Y, IGUCHI T. 1995. Steroid synthesis in testicular and ovarian homogenates from adult mice treated neonatally with diethylstilbestrol. *Med Sci Res* 23: 763-764.
- OLIVEIRA CA, CARNES K, FRANCA LR, HESS RA. 2001. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod* 65:913-20.
- OLIVEIRA CA, ZHOU Q, CARNES K, NIE R, KUEHL DE, JACKSON GL, FRANCA LR, NAKAI M, HESS RA. 2002. ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI 162,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. *Endocrinology* 143:2399-409.
- O'DONNELL L, ROBERTSON KM, JONES ME, SIMPSON ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22:289-318.
- PADMALATHA RAI S, VIJAYALAXMI KK. 2001. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the vivo mouse. *Mutat Res* 492:1-6.
- PAPADOPOULOS V, CARREAU S, SZERMAN-JOLY E, DROSDOWSKY MA, DEHENNIN L, SCHOLLER R. 1986. Rat testis 17 β -estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *J Steroid Biochem* 24:1211-1216.

- PARVINEN M, VIHKO KK, TOPPARI J. 1988. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytol* 104:115-151.
- PARTE PP, BALASINOR N, GILL-SHARMA MK, JUNEJA HS. 2000. Effect of 5 α -dihydrotestosterone implants on the fertility of male rats treated with tamoxifen. *J Androl* 21:625-33.
- PELLETIER G, LUU-THE V, CHARBONNEAU A, LABRIE F. 1999. Cellular localization of estrogen receptor β messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs. *Biol Reprod* 61:1249-1255.
- PELLETIER G, EL-ALFY M. 2000. Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4835-4840.
- PELLETIER G, LABRIE C, LABRIE F. 2000. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165:359-370.
- PENTIKÄINEN V, ERKKILÄ K, SUOMALAINEN L, PARVINEN M, DUNKEL L. 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2057-67.
- PINILLA L, GARNELO P, GAYTAN F, AGUILAR E. 1992. Hypothalamic-pituitary function in neonatally oestrogen-treated male rats. *J Endocrinol* 134:279-286.
- ROBERTSON KM, O'DONNELL L, JONES ME, MEACHEM SJ, BOON WC, FISHER CR, GRAVES KH, MCLACHLAN RI, SIMPSON ER. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7986-91.
- ROBERTSON KM, O'DONNELL L, SIMPSON ER, JONES ME. 2002. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveal dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology* 143:2913-21.
- RODRIGUES JA, FAVARETTO ALV. 1999. Sistema Reprodutor. Cap. 73, 868-891pp. In: *Fisiologia*. Aires, MM. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ROMMERTS FF, de JONG FH, BRINKMANN AO, van der MOLEN HJ. 1982. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 65:281-288.
- ROSENFELD CS, GANJAM VK, TAYLOR JA, YUAN X, STIEHR JR, HARDY MP, LUBAHN DB. 1998. Transcription and translation of estrogen receptor- β in the male

- reproductive tract of estrogen receptor- knock-out and wild-type mice. *Endocrinology* 139:2982–2987.
- RUSSELL LD, ALGER LE, NEQUIM LG. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology* 120:1615–1632.
- RUSSELL LD, KERSHAW M., BORG K.E., EL SHENNAWY A., RULLI S.S., GATES R.J., CALANDRA R.S. 1998. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *J Androl* 19:308–319.
- SAR M, WELSCH F. 2000. Oestrogen receptor α and β in rat prostate and epididymis. *Andrologia* 32:295–301.
- SAUNDERS PT, MAGUIRE SM, GAUGHAN J, MILLAR MR. 1997. Expression of oestrogen receptor β (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 154:R13–16.
- SAUNDERS PT, FISHER JS, SHARPE RM, MILLAR MR. 1998. Expression of oestrogen receptor β (ER β) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156:R13–17.
- SAUNDERS PT, SHARPE RM, WILLIAMS K, MACPHERSON S, URQUART H, IRVINE DS, MILLAR MR. 2001. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 7:227–236.
- SHARPE RM. 1997. Do males rely on female hormones? *Nature* 390: 447–448.
- SHIBAYAMA T, FUKATA H, SAKURAI K, ADACHI T, KOMIYAMA M, IGUCHI T, MORI C. 2001. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor α and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocr J* 48:655–63.
- SHUGHRUE PJ, LANE MV, SCRIMO PJ, MERCHENTHALER I. 1998. Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63:498–5.
- SINGH J, O'NEILL C, HANDELSMAN DJ. 1995. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136:5311–5321.
- SINGH J, HANDELSMAN DJ. 1996a. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 17:382–393.

- SINGH J, HANDELSMAN DJ. 1996b. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 151:37-48.
- SPITERIGRECH J, WEINBAUER GF, BOLZE P, CHANDOLIA RK, BARTLETT JMS, NIESCHLAG E. 1993. Effects of FSH and testosterone on intratesticular insulin-germ-like growth factor-I and specific-germ-cell populations in rats treated with gonadotropin-releasing-hormone antagonist. *J Endocrinol* 137:81.
- STEELE RE, MELLOR LB, SAWYER WK, WASVERY JM, BROWNE LJ. 1987. In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroids* 50:147-61.
- STRAUSS L, MAKELA S, HUHTANIEMI I, SANTTI R. 1998. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 144:83-93.
- SUAREZ-QUIAN CA, MARTINEZ-GARCIA F, NISTAL M, REGADERA J. 1999. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:350-358.
- TENA-SEMPERE M, NAVARRO J, PINILLA L, GONZALEZ 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.
- TODA K, OKADA T, TAKEDA K, AKIRA S, SAIBARA T, SHIRAISHI M, ONISHI S, SHIZUTA Y. 2001. Oestrogen at the neonatal stages is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 β -estradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 168:455-63.
- TSAI-MORRIS CH, AQUILANO DR, DUFAU ML. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 116:38-46.
- TSAI-MORRIS CH, KNOX G, LUNA S, DUFAU ML. 1986. Acquisition of estradiol-mediated regulatory mechanism of steroidogenesis in cultured fetal rat Leydig cells. *J Biol Chem* 261:3471-3474.
- TURNER KJ, MORLEY M, ATANASSOVA N, SWANSTON ID, SHARPE RM. 2000. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J Endocrinol* 164:225-238.
- van PELT MM, DE ROOIJ DG, van der BURG B, van der SAAG PT, GUSTAFSSON JA, KUIPER GJM. 1999. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140:478-483.

- VISSER JA, MCLUSKEY A, VERHOEF-POST M, KRAMER P, GROOTEGOED JA, THEMME AP. 1998. Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Mullerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology* 139:4244–4251.
- VORHERR H, MESSER RH, VORHERR UF, JORDAN SW, KORNFELD M. 1979. Teratogenesis and carcinogenesis in rat offspring after transplacental and transmammary exposure to diethylstilbestrol. *Biochem Pharmacol* 28:1865–1877.
- WENIGER JP, ZEIS A. 1987. Oestrogen synthesis by the foetal rat testis in organ culture. *J Steroid Biochem* 28:307–310.
- WENIGER JP, ZEIS A. 1988. Stimulation of aromatase activity in the fetal rat testis by cyclic AMP and FSH. *J Endocrinol* 118:485–489.
- WENIGER JP. 1990. Aromatase activity in fetal gonads of mammals. *J Dev Physiol* 14:303–306.
- WENIGER JP. 1993. Estrogen production by fetal rat gonads. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:459–462.
- WEST NB, BRENNER RM. 1990. Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis, and testis of rhesus and cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 42:533–538.
- WILLIAMS K, MCKINNELL C, SAUNDERS PT, WALKER M FISHER JS, TURNER KJ, ATANASSOVA N, SHARPE M. 2001. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update* 7: 236-47.
- ZHU L, HARDY MP, INIGO IV, HUHTANIEMI I, BARDIN CW, MOO-YOUNG AJ. 2000. Effects of androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 63:368-376.
- ZONDEK B. 1934. Mass excretion of estrogenic hormone in the urine of the stallion. *Nature* 33:209–210.