

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu

Aspectos reprodutivos de ratos machos submetidos ao
bloqueio androgênico perinatal por flutamida

Carina Leonelli

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Farmacologia.

Botucatu - SP

Novembro – 2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Newton e Vera: pela dimensão da persistência e da recompensa. Às minhas queridas irmãs Carolina, Camila e Cacília: pela cumplicidade nas batalhas e exemplos de competência.

Ofereço este trabalho, com carinho, a Felipe Curcelli: companheiro incansável, de apoio incondicional a cada escolha, dia a dia.

Agradeço

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira: educador invejável, orientador dedicado, companheiro de trabalho agradabilíssimo e, talvez o mais importante, pessoa de conduta admirável. Tenho muito orgulho de ter me iniciado como pesquisadora em “nosso laboratório”.

Ao Prof. Sérgio Luis Felisbino e sua equipe: em especial ao Justulin, Flávia, Alexandre, Carol e Elaine. Agradeço a cada um pela amizade e disposição em me ajudar.

À Profa. Wilma de G. Kempinas e sua equipe pela colaboração.

Às colegas de laboratório Renata, Paty Garcia, Patrícia R.. *Aos amigos e companheiros de trabalho,* Leandro, Alexandre, Michele e Luiz Ricardo. Obrigada pelas muitas ajudas e risadas.

Ao Luiz Ricardo, amigo assíduo em nosso laboratório e companheiro de trabalho solícito. Suas ajudas, colocações inteligentes e nossas discussões muito contribuíram para meu crescimento.

Aos funcionários do Depto. de Farmacologia. Ao Paulão, pela força no trabalho, risadas e, principalmente pela amizade. Ao Luiz, Cris, Flávia, Janete e Lula, pela prontidão em ajudar, pelo sorriso de cada dia e pela competência.

À toda minha família, aos idos e aos ainda próximos. De alguma forma conspiramos para que cada um de nós esteja onde e como está. Eu estou muito feliz.

À XXXIX turma de Biologia: sempre farão parte do que frutificar daquela semente que plantamos juntos. *Às amigas de sempre,* Elisa, Raquel, Perê, Vanessa, Priscilinha, Gabi, Bruna, Mônica (Lichia): sempre perto do coração.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Processo 07/57521-1). *Ao IBB e ao Depto de Farmacologia,* por possibilitarem a execução deste trabalho.

A Deus, pela possibilidade de evoluir a cada momento.

O que faço nunca me interessa se não comporta alegria.

(W. Maiakovski)

ÍNDICE

Resumo.....	01
Abstract.....	03
Introdução	04
Objetivos.....	10
Material e Métodos	11
1. Animais e Drogas	11
3. Acasalamento e Diagnóstico de Prenhez.....	12
4. Grupos Experimentais	12
5. Peso Corporal e Distância Anogenital	14
6. Descida Testicular e Instalação da Puberdade.....	14
7. Peso Úmido de Órgãos e da Secreção da Vesícula Seminal.....	14
8. Avaliação da Preferência Sexual.....	15
9. Estudo da Fertilidade.....	16
10. Avaliação do Comportamento Sexual Masculino.....	18
11. Avaliação do Comportamento Sexual Feminino.....	19
12. Dosagem de Testosterona Plasmática Total.....	20
13. Espermograma.....	21
14. Contagem Espermática.....	22
15. Análise Morfométrica e Imunocitoquímica da Próstata Ventral.....	24
16. Análise Estatística.....	26
Resultados	27
1. Peso Corporal, Distância Anogenital, Descida Testicular e Instalação da Puberdade.....	27
2. Pesos Úmidos dos Órgãos e da Secreção da Vesícula Seminal.....	29
3. Avaliação da Preferência Sexual.....	30
4. Estudo da Fertilidade.....	34
5. Avaliação do Comportamento Sexual Masculino.....	36
6. Avaliação do Comportamento Sexual Feminino.....	38
7. Dosagem de Testosterona Plasmática Total.....	39
8. Espermograma.....	40
9. Contagem Espermática.....	41
10. Análise Morfométrica e imunocitoquímica da Próstata Ventral.....	43
Discussão	44
Conclusões	58
Referências Bibliográficas	60
Anexos.....	68
1. Artigo Científico Submetido à Revista Reproductive Toxicology.....	69
2. Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	91

RESUMO

A aromatização da testosterona a estradiol é essencial para a diferenciação sexual do cérebro, o qual está organizado intrinsecamente no tipo feminino, organizando-o então no tipo masculino. Trabalhos em nosso laboratório, no entanto, apontam para existência de vias metabólicas adicionais para os androgênios neste processo, sugerindo a atuação do hormônio masculino *per se*. Dessa forma, no presente estudo investigou-se o papel da testosterona, durante a fase crítica de diferenciação sexual hipotalâmica, em ratos machos. Para isso, ratas Wistar prenhes receberam 15mg/kg/dia do anti-androgênico flutamida (grupo Flutamida) ou óleo de amendoim (grupo Controle), s.c., no 19º e no 22º dias de gestação, bem como durante os cinco primeiros dias após o parto. Foram avaliados efeitos imediatos e, principalmente, tardios do bloqueio androgênico sobre parâmetros reprodutivos, sexuais e de desenvolvimento físico da prole masculina. Assim, a exposição perinatal a flutamida levou à redução do peso corporal ao desmame, aumento do peso corporal ao atingir a puberdade, redução da distância anogenital (DAG) ao nascimento, retardo para a instalação da puberdade, diminuição dos pesos úmidos dos testículos e da próstata ventral, aumento do peso úmido do epidídimo e menor índice gônado-somático na vida adulta. Fêmeas não tratadas acasaladas com os machos do grupo Flutamida apresentaram reduzidas taxas de implantação, maiores taxas de perdas pré-implantação e baixa taxa de fertilidade, resultando em reduzido número de descendentes. Frente a uma fêmea receptiva normal, os animais do grupo Flutamida apresentaram maior latência para o início da cópula, realizaram maior número de montas sem intromissão peniana, maior número de intromissões até a 1ª ejaculação, com maior latência para a 1ª ejaculação, além de não ejacularem ou ejacularem uma única vez. Após castração seguida de estrogenização, 45,5% destes machos aceitaram montas de um macho não experimental. O bloqueio androgênico

levou ainda à redução na concentração de espermatozóides e aumento na porcentagem de espermatozóides anormais, associados a um comprometimento na produção diária de espermatozóides. A altura do epitélio da próstata ventral não foi alterada pelo tratamento, apesar de ter ocorrido uma redução de 10% na contagem de núcleos prostáticos epiteliais marcados positivamente para receptor de andrógeno (AR) e uma redução de 60% na concentração plasmática de testosterona durante a vida adulta. A partir destes resultados, sugerimos que o prejuízo no padrão do comportamento sexual observado nos animais do grupo Flutamida provavelmente se deveram a prejuízos nos processos de defeminização e masculinização cerebrais. A redução no nível plasmático de testosterona na vida adulta apontou para um prejuízo permanente à função do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e somado ao atraso para o descolamento do prepúcio, indicou também um reduzido teor de testosterona durante a puberdade. Desta forma, sugere-se um imperfeito processo de ativação das estruturas andrógeno-dependentes. A redução na expressão de AR encontrada na próstata ventral, apesar da ausência do agente perturbador, apontou para interferência do tratamento perinatal sobre a expressão gênica na vida adulta. A partir destes resultados, concluímos que o tratamento comprometeu o processo de diferenciação sexual do cérebro, bem como alterou permanentemente estruturas periféricas andrógeno-dependentes. Devido às alterações em parâmetros essenciais à reprodução, o bloqueio androgênico perinatal comprometeu grandemente a capacidade dos animais tratados deixarem descendentes.

Palavras-Chave: Comportamento sexual; Fertilidade; Flutamida perinatal; Ratos machos; Reprodução.

ABSTRACT

Studies in our laboratory indicate the existence of additional pathways for androgens in THE process of sexual differentiation, suggesting the importance of the male hormone *per se*. Thus, the present study investigated the role of testosterone during the critical phase of sexual differentiation of hypothalamus in male rats. Therefore, pregnant Wistar rats received 15mg/kg/day of flutamide (Flutamide group) or peanut oil (Control group), s.c. at day 19 of pregnancy and for the first five postnatal days. The perinatal exposure to flutamide led to a reduction in body weight at weaning, aN augmentation in body weight at puberty, reduction in anogenital distance at birth, delay in the puberty installation, decrease in wet weight of testes and ventral prostate, increase in wet weight of epididymis and decrease in gonadosomatic index. Normal females mated with treated males presented more pre-implantation losses, reduced implantation rates, and consequently reduced offspring size. Flutamide group showed increases in latency to copulatory behavior, number of mounts without penis intromission, number of intromissions until ejaculation, latency to ejaculation, and reduced number of ejaculations. after Castration followed by estrogenization, 45.5% of the animals took lying down the mounts of a non-experimental male. Flutamide treated rats presented reductions in percentage of normal spermatozoa, spermatozoa concentration, and daily testicular sperm production. The height of the epithelium of the ventral prostate was not altered by treatment, although there was a 10% reduction in cell nuclei prostatic epithelial marked positively for androgen receptor (AR) and a 60% reduction in plasma testosterone during the adulthood. Thus, the present results indicated that perinatal androgen blockage damaged differentiation process of the brain and peripheral reproductive structures. Thus, the binding of testosterone to androgen receptors during perinatal life really is an essential event in the sexual differentiation process.

INTRODUÇÃO

Estudos têm documentado a importância da presença de hormônio testicular, na vida perinatal, para a estabilização fisiológica e comportamental, bem como para diferenças neuroanatômicas entre os sexos (LAUBER et al., 1997; NAGHDI et al., 2001). Análises auto-radiográficas e bioquímicas têm demonstrado que receptores androgênicos se concentram em certas áreas do cérebro, sendo a área pré-óptica medial (APOM) do hipotálamo uma delas (McGINNIS et al., 1995; RHEES et al., 1999; LUND et al., 2000). Demonstrou-se também que a diferenciação sexual é influenciada por hormônios esteróides na fase perinatal (WARD & WEISZ, 1980; CORBIER et al., 1992).

A aquisição de um fenótipo sexualmente dimórfico é um evento crítico no desenvolvimento de mamíferos. Embora a maturação da função sexual e reprodutiva ocorra após o nascimento, é durante a embriogênese que ocorrem os processos de determinação sexual (estabelecimento do sexo genético) e diferenciação sexual do cérebro (PARKER et al., 1999). O sexo genético e os hormônios gonadais determinam, conjuntamente, o fenótipo sexual do animal e influenciam o desenvolvimento de vários sistemas, incluindo o sistema nervoso (PRINCE et al., 1998). A partir do estabelecimento do genoma (XX ou XY), que ocorre durante a fertilização, é desencadeada uma série de eventos, que levará à diferenciação das gônadas que, uma vez completa, estabelecerá o padrão sexual do sistema nervoso central (PARKER et al., 1999; HIORT & HÖTERHUS, 2000). A etapa de diferenciação sexual é mediada por hormônios gonadais e ocorre durante um período restrito do desenvolvimento perinatal, resultando em diferenças fisiológicas, morfológicas, comportamentais e neuroanatômicas entre machos e fêmeas (McCARTHY et al., 1997).

O período em que ocorre a diferenciação sexual via ação de hormônios gonadais sobre o sistema nervoso central (SNC), pode estar associado ao estágio de maturação neuronal. Esse período pode variar de acordo com a espécie e é denominado período crítico de diferenciação (LEE et al., 1975; CORBIER et al., 1978; GOGAN et al., 1981). No rato, este processo inicia-se no último terço de vida fetal e continua através da primeira semana de vida do animal (MACLUSKY & NAFTOLIN, 1981; MONTANO et al., 1995) e é dependente de picos de testosterona. Estes picos ocorrem entre o 18º e 19º dias da gestação (WARD & WEISZ, 1980) e entre 0 hora *in utero* e 2 horas após o nascimento (CORBIER et al., 1992), momentos nos quais ocorre um rápido aumento nos níveis séricos e hipotalâmicos deste hormônio. Corbier et al. (1992), em estudo comparativo, demonstraram que semelhante elevação nos níveis de testosterona após as primeiras horas do nascimento ocorre, também, em outros mamíferos machos, como camundongos, cavalos e humanos. Estes dados corroboram a importância dos andrógenos na diferenciação sexual do SNC desta classe de vertebrados. Após o nascimento, este aumento é de origem presumidamente testicular, já que não está presente em fêmeas e nem em machos castrados ao nascer. O pico intra-uterino de testosterona, no entanto, pode não ter a mesma origem, já que um aumento da concentração do hormônio ocorre antes da ativação da produção de testosterona nos testículos fetais, que se dá entre os dias 19,5 e 20,5 da gestação em ratos (PAKARINEN et al., 1994).

Antes do período crítico de diferenciação, o hipotálamo dos mamíferos está organizado intrinsecamente como “feminino”, o que determina o comportamento sexual típico de fêmea (lordose e aceitação da monta) e um padrão de secreção cíclico de gonadotrofinas, na vida adulta. Assim, o hipotálamo precisa ser “masculinizado” para que se estabeleça o padrão de comportamento sexual tipicamente masculino (realização

da monta) e o padrão tônico de secreção de gonadotrofinas (MACLUSKY & NAFTOLIN, 1981). Dois processos distintos determinam a diferenciação do SNC em machos: a “defeminização” e a “masculinização”. A defeminização compreende a indução de esterilidade anovulatória e a redução da capacidade de apresentar lordose, enquanto a masculinização resulta na capacidade de apresentar comportamento de monta (McEWEN, 1978). A masculinização do hipotálamo é dependente de testosterona que, por ação da enzima citocromo P450 aromatase, no sistema nervoso central, é metabolizada a estrógeno (RHODA et al., 1984; ERSKINE et al., 1988; GERARDIN & PEREIRA, 2002). A conversão de testosterona a estrógeno é fator determinante na diferenciação sexual da área pré-óptica do hipotálamo, que possui os núcleo do dimorfismo sexual, cujo volume é caracteristicamente de três a cinco vezes maior em machos, se comparado ao de fêmeas. Evidências indicam que esta conversão compreende um mecanismo pelo qual a testosterona regula muitos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo a ativação do comportamento sexual masculino, diferenciação sexual hipotalâmica e efeitos na retroalimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas (BALTHAZART & BALL, 1998). Neste sentido, Gerardin e Pereira (2002) observaram alterações reprodutivas tardias em ratos machos expostos perinatalmente a um inibidor da enzima citocromo P450 aromatase. Demonstraram, assim, que a aromatização da testosterona a estradiol é um evento necessário para a diferenciação e masculinização do hipotálamo masculino, e que o estrógeno, atuando em receptores próprios, é capaz de ativar a transcrição de genes e a síntese de proteínas, induzindo às diferenças sexuais no cérebro. No entanto, desreguladores endócrinos químicos são capazes de interferir na atuação do estrógeno, levando a uma incompleta diferenciação sexual, resultando em alterações tardias comportamentais e de fertilidade (PEREIRA, 2003). Todavia, Ribeiro e Pereira (2005)

observaram que outro caminho metabólico de atuação da testosterona sobre a diferenciação sexual do cérebro é possível. Nesta via, a metabolização da testosterona a diidrotestosterona, pela ação da enzima 5-alfa-redutase2, desempenha um importante papel sobre o processo de defeminização do cérebro de machos. Nos testículos e tecidos alvo, como a pele e a próstata, a testosterona é em grande parte metabolizada a dihidrotestosterona (DHT), sugerindo que esta seja provavelmente a forma mais ativa do hormônio nestes órgãos (SELMANOFF et al., 1977). Tanto a testosterona quanto a DHT, entretanto, são capazes de modificar a transcrição gênica através da ligação com os receptores androgênicos nucleares, resultando em aumento da RNA polimerase, síntese de RNA e proteínas específicas. Ribeiro e Pereira (2005) sugeriram que a enzima 5 α -redutase produz metabólitos que atuam junto ao estradiol na diferenciação sexual do cérebro, além de proteger o cérebro de efeitos danosos do excesso de estradiol. Em fêmeas, a ausência de andrógenos (McCARTHY et al., 1997) e/ou a exposição a pequenos níveis de estrógenos (DOHLER, 1991) no final da gestação, garante a organização do cérebro no padrão feminino, independente da presença do ovário (KELCE & WILSON, 1997).

Efeitos mediados por receptores androgênicos sobre a atividade da enzima P450 aromatase hipotalâmica em machos e fêmeas foram mostrados também em um estudo *in vitro* (BEYER et al. 1994). Os autores sugeriram que os androgênios influenciam no desenvolvimento do sistema aromatase do hipotálamo, aumentando a atividade desta enzima, bem como a porcentagem de neurônios do hipotálamo que a expressam. Foram também observados efeitos sinérgicos da testosterona e do estradiol sobre a proliferação de células hipotalâmicas de frangos machos em cultura (CAO & ZHANG, 2007). Tais resultados apontam para uma atuação dos androgênios de forma independente de sua conversão a estradiol no processo de diferenciação sexual hipotalâmica.

Assim, a hipótese de que os andrógenos contribuem de forma direta na diferenciação sexual de estruturas centrais e periféricas durante a vida perinatal foi, no presente estudo, apropriadamente estudada por meio da manipulação hormonal com flutamida. A flutamida é um poderoso e específico anti-androgênico largamente utilizado, entre outras aplicações, no combate ao câncer de próstata (BOCCON-GIBOD et al., 1997). Trata-se de uma droga não esteroidal que inibe a translocação do receptor de andrógeno do citoplasma para o núcleo das células alvo, mecanismo pelo qual exerce efeito antiproliferativo (CHABNER et al., 2001). Assim, a administração de flutamida durante a vida perinatal levou a diminuição no peso úmido de órgãos andrógeno-dependentes e anormalidades irreversíveis em ratos machos (MIYATA et al., 2003). Em nível celular, foram observadas alterações na maturação e função das células de Sertoli em ratos tratados pré-natalmente com flutamida (BENBRAHIM-TALLAA et al., 2008). Durante a vida intra-uterina, a testosterona também atua na organização de respostas comportamentais diversas. Assim, ratos machos submetidos ao bloqueio androgênico prolongado durante a fase de desenvolvimento intra-uterino e pós-natal reagiram de forma alterada a situações estressantes na vida adulta, liberando corticosteróides em maior quantidade e frequência (SEALE et al., 2005). Em ratos adultos, o tratamento com flutamida levou a alterações em aspectos ultra-estruturais das células de Sertoli, associados com a espermatogênese (ANAHARA et al., 2006).

É fato que o estudo dos efeitos do bloqueio androgênico em diferentes estágios do desenvolvimento contribui para o esclarecimento do papel da testosterona na homeostase do organismo. Porém, tais investigações também adquirem grande relevância quando levada em consideração a sua similaridade com desreguladores endócrinos de ação anti-androgênica. A exposição precoce a estes agentes pode ocasionar alteração do processo de diferenciação sexual do cérebro e do

desenvolvimento de estruturas reprodutivas (GRAY JR et al., 1994), bem como prejudicar a instalação dos comportamentos sociais dimórficos (HOTCHKISS et al., 2003) em ratos machos. Desreguladores endócrinos podem ser encontrados no ambiente, com a possibilidade de ocorrer exposição a mais de uma substância, em tempos diferentes ou simultaneamente. Assim, mesmo em concentrações relativamente baixas, tais agentes podem levar a comprometimentos reprodutivos devido à ação por adição (METZDORFF et al., 2007).

Neste sentido, o presente estudo investigou as influências do bloqueio androgênico perinatal sobre aspectos reprodutivos na vida adulta de ratos machos, com especial atenção sobre os parâmetros que afetam a capacidade de gerarem descendentes.

OBJETIVO GERAL

Considerando-se a possibilidade de via(s) adicional(is) para a elucidação do processo de defeminização e masculinização do hipotálamo, que não a aromatização e redução da testosterona a estradiol, o presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações reprodutivas em ratos machos expostos perinatalmente à flutamida, considerando-se a ação anti-androgênica desta droga.

Objetivos Específicos

- Verificar se o bloqueio androgênico perinatal interfere no desenvolvimento ou expressão de parâmetros dimórficos, reprodutivos e/ou sexuais;
- Verificar se alterações reprodutivas tardias comportamentais, físicas, hormonal e de biologia celular são observadas em decorrência do tratamento perinatal com flutamida.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos e fêmeas, provenientes da colônia do Biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu. Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, onde foram mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) e com água e ração própria para roedores à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP (Protocolo nº 69/07).

2. Drogas e reagentes

Flutamida (Genix Industria Farmacêutica Ltda., GO-Brasil; procedência: China); óleo de amendoim; pentobarbital sódico (Hypnol 3%, Fontoveter); heparina; tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3); 17β -benzoato de estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.USA); sulfeto de amônio, solução a 40% puríssima; thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA); triton X100 octyl-phenoxy polyethoxyethanol (Sigma Chemical Co., E.U.A.); corante de Shorr (Dinâmica Química, Brasil); meio de cultura (Nutriente de Ham F- 10 modificado, Cultilab Mat. Cult., Brasil); formaldeído (Dinâmica Química, Brasil); Paraplast Plus (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA); tampão citrato de sódio (10 mM, pH6,0); peróxido de hidrogênio; metanol; solução PBS 1X; albumina do soro bovino, fração V (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA); solução de leite desnatado Molico®; anticorpo contra receptores de andrógeno (sc815, rabbit antiAR, Santa Cruz Biothecnology Inc., Ca. USA); anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Santa Cruz Biothecnology Inc., Ca. USA);

diaminobenzidina, hematoxilina (Lab. Synth, Brasil); eosina (Lab. Synth, Brasil); álcool absoluto (Lab. Synth Ltda); xilol (Lab. Synth Ltda); cola Permont®.

3. Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Para a obtenção dos grupos experimentais, foram colocados para acasalar em gaiolas coletivas, no final da tarde, duas ratas fêmeas adultas em proestro, virgens e ciclando normalmente, com um rato macho adulto comprovadamente fértil. Na manhã do dia seguinte, foi realizada coleta de material vaginal para realização de esfregaço tomando-se o cuidado de não provocar estímulo que pudesse induzir à pseudo-prenhez. O procedimento foi realizado com o auxílio de hastes plásticas flexíveis com pontas de algodão hidrófilo embebidas em solução fisiológica em temperatura ambiente. O material coletado foi espalhado em uma lâmina histológica para análise ao microscópio óptico (“Zeiss”, aumento 10/0, 25x6,3). O diagnóstico de prenhez foi considerado positivo quando foram encontrados espermatozoides nas lâminas de esfregaço vaginal e constatada a fase estro do ciclo estral. O dia em que foi constatada tal situação foi considerado o primeiro dia da prenhez, quando a fêmea foi transferida a uma gaiola onde havia apenas fêmeas prenhes (4 fêmeas/gaiola). No 19^o dia da prenhez, cada rata foi alojada em uma gaiola individual.

4. Obtenção dos grupos experimentais

Os períodos de tratamento foram escolhidos com a finalidade de compreender o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica em ratos, coincidindo com os picos de testosterona pré-natal e neonatal.

4.1 Ratos tratados com flutamida perinatalmente (grupo Flutamida)

Ratas prenhes receberam 15 mg/kg de flutamida, s.c., uma vez ao dia, nos dias 19 e 22 da gestação, bem como durante os cinco primeiros dias pós-parto. Dessa forma, os descendentes foram expostos à droga via placenta e, posteriormente, via leite. As administrações foram realizadas sempre entre as 15:00 e 16:00 horas. Devido à característica oleosa do veículo, as aplicações foram feitas em dois pontos distintos do dorso dos animais, de modo a evitar excessiva distensão da área e extravasamento do conteúdo.

4.2 Ratos tratados com o veículo perinatalmente (grupo Controle)

Ratas prenhes receberam 1 ml/kg de óleo de amendoim (veículo), s.c.. uma vez ao dia, nos dias 19 e 22 da gestação, bem como durante os cinco primeiros dias pós-parto. As administrações foram realizadas sempre entre as 15:00 e 16:00 horas. Devido à característica oleosa do veículo, as aplicações foram feitas em dois pontos distintos do dorso dos animais, de modo a evitar excessiva distensão da área e extravasamento do conteúdo.

Os nascimentos ocorreram por parto normal. Do total de descendentes, foram mantidos 8 filhotes por rata, com o objetivo de evitar que o tamanho da ninhada interferisse no desenvolvimento dos mesmos. Na ninhada foram mantidos animais de ambos os sexos (ao menos 2:6), de forma que não houvesse alterações no cuidado da mãe com a prole. O desmame ocorreu aos 22 dias de vida pós-natal, ocasião em que os descendentes machos foram transferidos para gaiolas coletivas (máximo de 4 animais por gaiola) até sua utilização nos experimentos. Nesta mesma ocasião as fêmeas, mães e descendentes, foram eutanasiadas.

5. Parâmetros determinados do nascimento à puberdade

5.1 Peso corporal e distância anogenital ao nascimento e desmame

Imediatamente após o nascimento e aos 22 dias de idade foram determinados os pesos corporais e as distâncias anogenitais (DAG) dos descendentes machos de cada ninhada. O peso foi aferido por meio de balança analítica e a DAG foi medida com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo®).

5.2 Idades por ocasião da descida testicular e da instalação da puberdade

A descida testicular foi avaliada diariamente por observações diretas e apalpação dos testículos, a partir do 17º dia de lactação. A idade por ocasião da descida testicular foi considerada quando ambos os testículos encontravam-se alojados no escroto.

A partir do 40º dia de vida pós-natal, os descendentes machos foram examinados diariamente até que se verificasse a completa separação prepucial, ocasião em que a instalação da puberdade foi considerada, sendo os animais novamente pesados.

6. Parâmetros reprodutivos determinados na vida adulta

Os animais foram considerados adultos após atingirem 90 dias de idade.

6.1 Peso úmido de órgãos da reprodução e da glândula adrenal

Aos 110 dias de idade, animais de ambos os grupos experimentais foram pesados e eutanasiados com pentobarbital sódico (40mg/kg, i.p.) para a retirada dos órgãos de interesse. As laparotomias foram realizadas entre as 7:30 e 9:30 horas. Assim, os testículos direito e esquerdo, epidídimo esquerdo, vesícula seminal esquerda, ducto deferente esquerdo, próstata ventral e a glândula adrenal esquerda de cada animal foram removidos e dissecados. Após secagem em papel de filtro, foram determinados os respectivos pesos úmidos destes órgãos empregando-se balança analítica.

A partir do peso úmido dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) e do peso corporal, foi determinado o índice gônado-somático dos animais, empregando-se a fórmula:

$$\text{Índice gônado-somático} = \frac{\text{peso do TD} + \text{peso do TE}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

O peso da secreção da vesícula seminal foi obtido ao subtrair-se o peso da vesícula vazia do peso da vesícula cheia.

6.2 Avaliação da preferência sexual

Este teste foi empregado com o objetivo de avaliar se os ratos experimentais procuram preferencialmente um indivíduo do mesmo sexo ou uma fêmea receptiva. Esta avaliação foi realizada após o teste de comportamento sexual masculino, com animais experimentais inteiros. Os testes foram conduzidos sob luz com filtro vermelho, em biotério com ciclo de luz invertido, para onde os animais foram transferidos com antecedência de duas semanas, para adaptação. Em momento algum (antes ou durante o teste) os ratos experimentais tiveram contato direto com os “animais-isca”. O estímulo de incentivo para a procura dos animais-isca foi o odor exalado pelos mesmos. Para isso, foram utilizados ratos (isca) machos adultos sexualmente experientes e ratas (iscas) em estro natural. Previamente, cada rato experimental foi colocado individualmente na arena, por 3 min, 3 vezes/semana, durante 1 semana, para que se habituassem ao aparato.

No dia do teste, um macho-isca foi colocado em uma das gaiolas de incentivo e, em sentido oposto, na outra gaiola de incentivo, foi colocada uma fêmea-isca, com 5 min de antecedência, para habituação. Foram cronometrados os tempos que o animal testado permaneceu em cada uma das áreas de incentivo (área de incentivo do macho:

localizada próxima à caixa de incentivo do macho; área de incentivo da fêmea: localizada próxima à caixa de incentivo da fêmea receptiva), com tempo total de avaliação de 20 min. O tempo em que o animal permaneceu na área neutra não foi cronometrado, porém foi facilmente calculado com base nos demais dados. A entrada nas áreas de incentivo foi considerada apenas a partir do momento em que o animal cruzou a linha de delimitação com as quatro patas ou quando farejava diretamente a gaiola de incentivo. Considerou-se a “saída” do animal apenas quando o mesmo havia cruzado a linha com as quatro patas, voltando à zona neutra.

6.3 Estudo da fertilidade

Ratos adultos de ambos os grupos foram colocados para acasalar com ratas adultas não tratadas, virgens e com ciclo estral regular. Cada rato foi colocado em uma gaiola coletiva com 2 fêmeas. A partir da manhã seguinte, diariamente e até o 15^o dia ou até que tivessem acasalado, foi realizada a coleta do material vaginal, possibilitando o diagnóstico de prenhez (conforme descrito no item 3). No 20^o dia de prenhez as ratas foram sacrificadas em câmara saturada por CO₂ e imediatamente colocadas em decúbito dorsal. Efetuou-se, então, uma incisão na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos. Após a abertura dos cornos uterinos foram determinados os números de implantações, de fetos vivos, mortos ou em lise e de sítios de reabsorção. Os sítios de reabsorção puderam ser discriminados pela ausência do filhote apesar da presença de um ponto de implantação. Adicionalmente, os ovários foram isolados e os corpos lúteos foram separados e contados.

A partir do total de fêmeas acasaladas (que apresentaram espermatozóides na lâmina de esfregaço vaginal), fêmeas prenhes (que apresentaram fetos, vivos ou não) e fêmeas que apresentaram fetos vivos, foram calculados os índices gestacional e de

fertilidade para cada grupo experimental. Para isso, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Índice Gestacional} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas com fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}} \times 100$$

$$\text{Índice de Fertilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que acasalaram}} \times 100$$

De posse do número total de fetos (machos e fêmeas) obtidos durante a laparotomia das fêmeas prenhes, foi possível determinar o índice de virilidade da prole, a partir do seguinte cálculo:

$$\text{Índice de Virilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos machos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

Com os demais dados coletados durante a laparotomia exploratória de tais fêmeas, calcularam-se também:

$$\text{Taxa de Implantação} = \frac{\text{PI}}{\text{CL}} \times 100$$

$$\text{Taxa de Perda Pré-implantação} = \frac{\text{CL} - \text{PI}}{\text{CL}} \times 100$$

$$\text{Taxa de Perda Pós-implantação} = \frac{\text{PI} - \text{FV}}{\text{CL}} \times 100$$

$$\text{Taxa de Viabilidade Fetal} = \frac{\text{FV}}{\text{PI}} \times 100$$

Observação: **CL** = número de corpos lúteos; **FV** = número de fetos vivos; **PI** = número de pontos de implantação.

6.4 Avaliação do comportamento sexual masculino

Após o teste de fertilidade, os animais foram colocados em biotério com regime de luz claro-escuro invertido, onde permaneceram 15 dias para adaptação. Para a avaliação do comportamento sexual masculino, os animais foram colocados em gaiolas de observação (acrílico transparente) durante o período escuro do ciclo claro-escuro. Os testes foram conduzidos sob luz com filtro vermelho, de forma que os animais não enxergassem o examinador.

Cada macho foi previamente colocado na gaiola de observação, permanecendo 10 a 30 min para adaptação. Em seguida, uma fêmea em estro natural, comprovadamente receptiva, foi introduzida na mesma caixa. A partir deste momento, os animais foram observados durante 30 min. Contudo, os animais experimentais que não apresentaram nenhum comportamento sexual (monta sem inserção peniana, monta com inserção peniana ou ejaculação) ao final de 10 min, tiveram sua avaliação concluída e foram considerados inativos.

Cada animal foi testado uma única vez. Foram avaliados os seguintes parâmetros: latência para a 1^a monta ou intromissão (monta com inserção peniana); número de montas e número de intromissões até a 1^a ejaculação; latência para a 1^a ejaculação; latência para 1^a monta ou intromissão após a 1^a ejaculação; número total de montas, número total de intromissões e número total de ejaculações durante o tempo total do teste.

A ocorrência de intromissão peniana foi considerada quando se observou o seguinte conjunto de sinais: monta com duração superior a 2 segundos, lordose (encurvamento característico do dorso da fêmea) e subsequente limpeza da região genital do macho. A ejaculação foi considerada quando se observou uma intromissão

seguida pelo levantar do tronco do macho seguida de descanso com duração de alguns minutos, sem procura pela fêmea, além de limpeza da área genital.

A caixa de observação foi higienizada nos intervalos entre a saída de um animal e entrada do próximo, para amenização dos odores característicos. Para isso foi usado álcool etílico na concentração de 5%.

6.5 Avaliação do comportamento sexual feminino

Após serem avaliados quanto ao comportamento sexual masculino, os ratos foram orquidectomizados bilateralmente. Para a realização da operação, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose 40 mg/Kg (i.p.) e, então, procedeu-se à remoção dos testículos e fechamento dos ductos deferentes. Logo após o procedimento, a camada muscular e a pele foram devidamente suturadas e o local foi higienizado com solução de iodo 2% diluído em álcool 70% (1:3).

Após um período mínimo de 15 dias para recuperação da cirurgia e adaptação ao ciclo de luz invertido, os ratos de ambos os grupos experimentais foram pré-tratados com 17β -benzoato de estradiol, 20 μ g/Kg, i.p., (ARTECHE et al., 1997) 24 horas antes da avaliação do comportamento sexual feminino. No dia da avaliação, um macho não experimental, não tratado e sexualmente experiente foi colocado em uma gaiola de observação (acrílico transparente), onde permaneceu por, pelo menos, 10 min para adaptação. Em seguida, um macho experimental foi introduzido na gaiola. Os animais foram observados por 10 min, durante os quais foram avaliadas a realização de lordose e a aceitação da monta pelos machos experimentais. A partir da observação foram determinadas a latência para a 1ª monta, latência para a 1ª lordose, número de montas e número de lordoses. Contudo, quando nenhum dos comportamentos tipicamente

femininos (aceitação da monta e lordose) foi realizado pelo macho experimental, o mesmo foi classificado inativo para o comportamento feminino.

6.6 Dosagem de testosterona plasmática total

Aos 110 dias de idade, durante a laparotomia (descrita no item 6.1), coletou-se sangue diretamente da aorta abdominal dos animais de ambos os grupos experimentais. As coletas foram realizadas sempre no início do ciclo claro, entre as 7:30 e 9:30 horas da manhã. Para a separação do plasma, o sangue foi centrifugado em ultracentrífuga a 20.000 rpm, a 2 °C, durante 20 minutos. O plasma coletado foi acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C.

Em data conveniente, o material foi descongelado e submetido à dosagem de testosterona total pelo método Imuno-enzimático de Quimioluminescência em Laboratório de reconhecida competência na área de análises e pesquisas clínicas (certificado pelo ISO 9001:2000, número SQ-7131).

6.7 Espermograma

Durante a laparotomia descrita no item 6.1, coletaram-se os espermatozóides diretamente do ducto deferente direito. Logo após a coleta, os espermatozóides foram diluídos em 1ml de meio de cultura, incubados a 37°C e imediatamente analisados ao microscópio. Foram avaliadas a motilidade, concentração, vitalidade e morfologia espermática, descritas a seguir.

Motilidade espermática: Para esta avaliação 10µl de espermatozóides diluídos foram colocados na câmara de contagem de Makler (Makler Counting Chamber, Sefi-

Medical, Haifa, Israel) e a leitura foi feita em microscopia de fase no aumento de 100x. Foi realizada a contagem de duas amostras diferentes de cada animal sendo analisados 100 espermatozóides por amostra e foi feita a média. Foram considerados os padrões:

- Progressivos: espermatozóides móveis com progressão rápida ou lenta, com capacidade fertilizante;
- Não-progressivos: móveis, porém sem progressão e espermatozóides imóveis.

Concentração espermática: Após a análise do padrão de motilidade foi verificada a concentração dos espermatozóides, estimada em milhões por mililitro ($10^6/\text{ml}$). Para tanto foram utilizadas as câmaras de contagem de Makler preparadas no item anterior. Foram realizadas as contagens de duas amostras diferentes de cada animal, sendo que para cada amostra foram realizadas três contagens e calculadas as médias. A leitura foi realizada em microscopia de fase, aumento de 100x.

Vitalidade espermática: Em um tubo contendo 50 μl de espermatozóides diluídos em meio de cultura foram acrescentadas uma gota de eosina amarela (3%) e duas gotas de nigrosina (8%). Após homogeneização da mistura, foram confeccionados esfregaços do material, que foi analisado em microscopia de fase com aumento de 400x. Para cada animal foram realizados dois esfregaços do material, sobre duas lâminas histológicas, sendo que em cada lâmina foram avaliadas 100 células. Assim, a vitalidade espermática para cada animal foi determinada a partir da média calculada entre as duas lâminas.

Morfologia espermática: Dois esfregaços de sêmen de cada animal foram confeccionados sobre lâminas histológicas, secos naturalmente à temperatura ambiente, fixados em álcool 70% por 15 minutos e lavados em água corrente. Posteriormente foram colocados em hematoxilina por 45 segundos e lavados em água corrente. A seguir, as lâminas foram imersas sucessivamente em três cubas contendo álcool 90% e,

então, imersas em corante de Shorr por 5 minutos. Mais seis passagens sucessivas, três em álcool 95% e três em álcool absoluto, foram realizadas. Uma passagem em álcool-xilol (1:1) e duas passagens em xilol foram realizadas, permanecendo por 20 minutos no segundo recipiente de xilol. A partir desta preparação, foram avaliados, no mínimo, 200 espermatozóides por lâmina sob aumento de 1000x (imersão), sendo classificados em normais ou anormais. Assim, foi calculada a média dos números de células normais e de anormais encontradas nas duas lâminas.

6.8 Contagem espermática

Durante as laparotomias procedidas nos ratos experimentais (item 6.1), foram retirados e armazenados sob congelamento (-20°C) o testículo e o epidídimo direitos de cada animal.

Contagem das cabeças de espermátides maduras no testículo e cálculo da produção diária de espermatozóides

Para efetuar a contagem espermática os testículos foram descongelados, descapsulados e homogeneizados (Homogeinizador Janke & Kunkel, Ultra-Turrax, TR50), modificado de ROBB et al (1978). O parênquima foi colocado em tubo tampado, de peso conhecido e acrescido de 5ml de uma mistura de 9g de NaCl; 0,5 ml de Triton X100 e 0,1g de Thimerosal (em solução STM). Pesando-se tal sistema, foi obtido o valor de base para o cálculo da primeira diluição.

Uma alíquota de 100µl desta amostra foi diluída 10 vezes em STM. Com auxílio de mini-pipetas Pasteur, porções desse conteúdo foram transferidas para câmaras de Neubauer, possibilitando a contagem sob microscópio óptico. Foram avaliadas 2

câmaras por animal com 2 campos por câmara e 5 quadrantes por campo. Foi calculada a média aritmética do número de espermatozóides contados nos campos, resultando no número médio de espermatozóides $\times 10^6/\text{ml}$ de mistura. Este valor multiplicado pelas diluições utilizadas resultou em uma estimativa do número de espermátides presentes no testículo analisado. Para o cálculo da produção diária de espermatozóides (PDE), dividiu-se a concentração média de espermátides encontrada em cada testículo (média das contagens nas 2 câmaras) pelo valor 6,1; referente ao número de dias que as espermátides maduras (fase 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero.

Contagem do número de espermatozóides e cálculo do trânsito de espermatozóides no epidídimo

Para a realização da contagem de espermatozóides, o epidídimo foi dividido em duas peças: cabeça/corpo e cauda. Cada peça foi homogeneizada separadamente em presença de STM (cauda: 1ml:100mg de tecido e cabeça/corpo: 1ml:200mg de tecido). Após homogeneização, cada amostra foi diluída 20 vezes em STM e transferida para câmaras de Neubauer, procedendo-se semelhantemente ao descrito para os testículos. Foi calculada a média aritmética do número de espermatozóides contados nos campos, resultando no número médio de espermatozóides $\times 10^6/\text{ml}$ de mistura. Este valor multiplicado pelas diluições utilizadas resultou em uma estimativa do número de espermatozóides presentes na peça (cabeça/corpo ou cauda) analisada. Para o cálculo do trânsito de espermatozóides (dado em dias), dividiu-se o valor médio das contagens em cada parte do epidídimo pela produção diária de espermatozóides (PDE) encontrada para o respectivo testículo.

6.9 Análise morfométrica e imunocitoquímica da próstata ventral

Durante a laparotomia descrita no item 6.1, os dois lobos da próstata ventral foram removidos e pesados. Após a pesagem o lobo direito de cada animal foi imerso em paraformaldeído (4%) diluído em tampão fosfato (0,1M; pH 7,3), por 24 horas. Após a fixação, o material foi processado pelas técnicas histológicas descritas a seguir.

Obtenção de cortes em Paraplast

Após a fixação, o material foi lavado em água corrente e desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5 μ m foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Análise morfométrica

Os cortes obtidos em Paraplast foram corados por hematoxilina-eosina e observados sob luz normal, em microscópio Leica DMLB sob objetiva de aumento 40x. Foi aferida a altura média do epitélio da porção intermediária da estrutura túbulo-alveolar da próstata ventral, região que constitui a maior parte do lobo prostático. As medições foram realizadas a partir de imagens obtidas por câmera fotográfica acoplada ao microscópio e digitalizadas pelo software *Leica Qwin Standard versão 3.1*. Foram realizadas medições em 10 campos fotografados aleatoriamente na região de interesse de cada um dos lobos direitos coletados. Em cada campo foram feitas 20 medições, de forma que em cada grupo experimental, 1.500 medições foram realizadas, a partir das quais foi calculada a altura média do epitélio prostático em cada grupo.

Análise imunocitoquímica

Após recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato de sódio (10 mM pH6,0) em panela de pressão, os cortes foram lavados em solução PBS e embebidos em solução de leite desnatado em pó (em PBS a 3%) para o bloqueio das

interações proteína-proteína não-específicas. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário contra o receptor de andrógeno (AR) diluído em solução de albumina bovina (em PBS a 1%). Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase. A marcação foi revelada por diaminobenzidina e os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris.

Para avaliar a expressão do receptor de andrógeno pelas células epiteliais prostáticas, foi feita a contagem dos núcleos positivos (que reagiram positivamente ao ensaio, independentemente da intensidade) e negativos (que foram corados apenas pela hematoxilina). Foram avaliados 10 campos aleatórios de cada um dos lobos direitos coletados, totalizando aproximadamente 12.000 núcleos por grupo experimental. Estas contagens foram feitas em imagens obtidas com a objetiva para aumento de 40X e digitalizadas pelo software *Leica Qwin Standard versão 3.1*. A partir das contagens foi determinado o percentual de núcleos positivos contados em cada grupo.

7. Análise Estatística

A partir dos resultados obtidos, foram determinadas as Médias \pm Desvio Padrão da Média (DP) ou, quando adequada à natureza dos dados, a Mediana acompanhada pelos Intervalos Interquartis 25% e 75% ([IQ_{25%}-IQ_{75%}]). Para a comparação entre médias, foi utilizado o Teste t Corrigido por Welch, enquanto para as análises não-paramétricas foi usado o Teste de Mann-Whitney para a comparação entre medianas. Para a comparação dos dados expressos como proporções ou porcentagens puras, utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Foram consideradas significantes as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. Para a avaliação estatística foi utilizado o programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. Peso corporal, distância anogenital, descida testicular e instalação da puberdade

Ao nascimento, o peso corporal dos animais apresentou-se inalterado entre os grupos experimentais. Porém, a distância anogenital mostrou-se reduzida no grupo Flutamida (Tabela 1). Tanto a medida absoluta da DAG, quanto a medida corrigida pelo peso corporal ($0,46\pm 0,07/0,42\pm 0,06^*$ mm/g, teste t corrigido por Welch, $P<0,05$), mostraram esta redução.

Tabela 1: Peso e distância anogenital (DAG) ao nascimento dos animais dos grupos Controle e Flutamida.

Peso e DAG ao Nascimento		
	Controle (n=23)	Flutamida (n=26)
Peso Corporal (g)	6,51±0,49	6,47±0,67
Distância Anogenital (mm)	2,97±0,50	2,63±0,21**

Valores expressos em média±DP.

** $P<0,01$; teste t corrigido por Welch.

Número de animais entre parênteses.

Aos 22 dias de idade (desmame), o peso corporal apresentou-se menor no grupo Flutamida, quando comparado ao Controle (Tabela 2). A DAG manteve-se reduzida no grupo Flutamida, quando considerados os valores absolutos (Tabela 2). No entanto, realizando a correção destes dados pelo peso corporal dos respectivos animais (que

também mostrou redução), não ocorreu diferença entre os grupos Flutamida ($0,31\pm 0,03\text{mm/g}$) e Controle ($0,31\pm 0,02\text{mm/g}$), quando comparados pelo teste t Corrigido por Welch.

Tabela 2: Peso corporal e distância anogenital (DAG) ao desmame (22 dias) e peso corporal e idade por ocasião da instalação da puberdade.

	Peso (g)		DAG ao Desmame (mm)	Descida Testicular (dias)	Instalação da Puberdade (dias)
	Desmame	Puberdade			
Controle (n=23)	54,13±3,53	217,81±17,44	16,94±0,55	19,0 [18,0-19,0]	46,0 [44,5-47,5]
Flutamida (n=26)	47,34±4,83***	229,89±25,88*	14,75±0,45***	19,0 [18,0-19,0]	48,0* [45,0-51,0]

Valores expressos em média±DP ou mediana[IQ_{25%}-IQ_{75%}]

*P<0,05; ***P<0,001; teste t corrigido por Welch ou teste de Mann-Whitney.

Número de animais entre parênteses.

A idade por ocasião da descida testicular apresentou-se inalterada entre os grupos, porém a instalação da puberdade (completo descolamento do prepúcio) ocorreu significativamente mais tarde no grupo Flutamida (Tabela 2). À puberdade, o peso dos animais Flutamida mostrou-se aumentado (Tabela 2), no entanto, à vida adulta observou-se recuperação ($461,74\pm 20,0$ g) deste parâmetro, em relação ao grupo Controle ($459,10\pm 27,5$ g).

2. Peso úmido dos órgãos e da secreção da vesícula seminal

Aos 110 dias de idade os animais do grupo Flutamida apresentaram redução nos pesos úmidos da próstata e testículos. O peso úmido do epidídimo, por sua vez, mostrou-se aumentado nestes animais. Os pesos dos demais órgãos, bem como da secreção da vesícula seminal, mantiveram-se inalterados entre os grupos. (Tabela 3)

Tabela 3: Peso úmido de órgãos da reprodução, adrenal e da secreção seminal vesicular, em gramas, determinados aos 110 dias de idade.

Peso Úmido dos Órgãos		
	Controle (n=10)	Flutamida (n=9)
Testículo (g)	1,69±0,157	1,53±0,139*
Epidídimo (g)	0,63±0,082	0,71±0,066*
Ducto Deferente (g)	0,10±0,019	0,10±0,009
Vesícula Seminal (g)	0,20±0,035	0,19±0,040
Próstata (g)	0,48±0,107	0,38±0,103*
Adrenal (g)	0,035±0,009	0,038±0,009
Secreção Vesicular (g)	0,45±0,077	0,43±0,071

Valores expressos em média±DP.

*P<0,05; teste t corrigido por Welch.

Número de animais entre parênteses.

A partir da relação entre a média dos pesos dos testículos de cada animal e seu peso corporal, foi calculado o índice gônado-somático (IGS), expresso em porcentagem de peso corporal. Foi observada redução estatisticamente significativa no grupo Flutamida, em relação ao Controle (Figura 1).

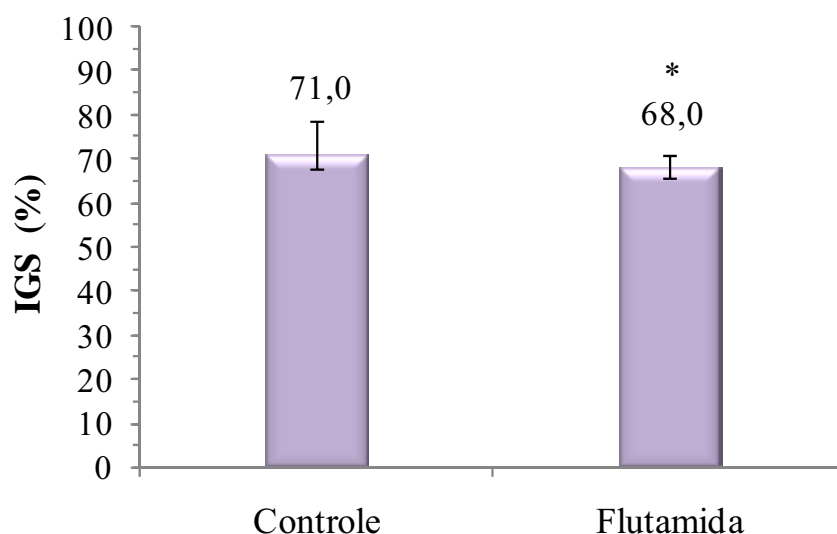


Figura 1: Índice gônado-somático aos 110 dias de idade. Dados expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}]. * P<0,05; teste de Mann-Whitney. (Controle: n=10; Flutamida: n=9).

3. Avaliação da Preferência Sexual

A avaliação da preferência sexual (tempo de permanência na área de incentivo da fêmea ou do macho e número de entradas em cada uma dessas áreas) não revelou alteração significativa entre os grupos. Tanto no teste com os animais ingênuos (primeiro teste), como no teste com os animais sexualmente experientes (segundo teste), os animais de ambos os grupos apresentaram padrões de escolha semelhantes, como mostram as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Número de entradas e tempo de permanência nas áreas de incentivo dos animais isca, durante o primeiro teste de preferência sexual, com machos experimentais sexualmente inexperientes.

1º Teste de Preferência Sexual		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=11)
Tempo de permanência na área da fêmea (s)	253,0 [227,8-312,5]	207,5 [92,5-463,5]
Número de entradas na área da fêmea	12,5 [8,0-15,0]	10,0 [9,0-13,5]
Tempo de permanência na área do macho (s)	698,0 [548,3-771,8]	577,0 [373,8-748,8]
Número de entradas na área do macho	14,5 [9,5-19,0]	18,0 [11,5-19,5]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

Não houve diferença significativa entre os grupos. $P > 0,05$; teste de Mann-Whitney.

Número de animais entre parênteses.

Tabela 5. Número de entradas e tempo de permanência nas áreas de incentivo dos animais isca, durante o segundo teste de preferência sexual, com machos experimentais sexualmente experientes.

2º Teste de Preferência Sexual		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=11)
Tempo de permanência na área da fêmea (s)	265,0 [136,8-502,5]	240,0 [83,0-476,0]
Número de entradas na área da fêmea	10,5 [7,3-13,8]	9,0 [4,5-11,5]
Tempo de permanência na área do macho (s)	778,0 [493,8-945,3]	600,0 [262,0-917,5]
Número de entradas na área do macho	12,0 [9,8-14]	9,0 [8,5-15,5]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

Não houve diferença significativa entre os grupos. $P > 0,05$; teste de Mann-Whitney.

Número de animais entre parênteses.

Embora não tenha ocorrido alteração entre os grupos Flutamida e Controle, analisando-se os dados de cada grupo separadamente encontraram-se resultados interessantes, corroborando a inalteração do padrão de preferência sexual. A partir do cálculo do índice de escolha, ficou evidente um maior interesse pela área de incentivo do macho em ambos os grupos, tanto durante o primeiro teste, quando ingênuos (Tabela 6), como durante o segundo teste, com os animais sexualmente experientes (Tabela 7).

Tabela 6. Índice de escolha apresentado pelos machos experimentais sexualmente inexperientes em relação aos animais isca, durante o primeiro teste de preferência sexual.

Índice de Escolha – 1º Teste de Preferência Sexual			
Controle (n=10)		Flutamida (n=11)	
Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
0,36	0,74**	0,24	0,76*
[0,29-0,61]	[0,62-0,77]	[0,11-0,47]	[0,53-0,89]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

*P<0,05; **P<0,01; teste de Mann-Whitney.

Comparações válidas apenas entre colunas do mesmo grupo.

Número de animais entre parênteses

Tabela 7. Índice de escolha apresentado pelos machos experimentais sexualmente experientes em relação aos animais isca, durante o segundo teste de preferência sexual.

Índice de Escolha – 2º Teste de Preferência Sexual			
Controle (n=10)		Flutamida (n=11)	
Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
0,24	0,76*	0,30	0,70*
[0,12-0,44]	[0,56-0,88]	[0,21-0,52]	[0,48-0,79]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

*P>0,05; teste de Mann-Whitney.

Comparações válidas apenas entre colunas do mesmo grupo.

Número de animais entre parênteses.

4. Estudo da fertilidade

Durante a laparotomia exploratória efetuada em cada uma das fêmeas não tratadas acasaladas com os machos experimentais, coletaram-se dados relacionados à capacidade de tais machos deixarem descendentes, pela análise da prole gerada (Tabela 8).

Tabela 8: Dados coletados durante laparotomia exploratória em fêmeas não tratadas, acasaladas por machos experimentais.

Estudo da Fertilidade		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=13)
Corpos Lúteos	13,0 [13,0-15,0]	14,5 [10,0-15,0]
Pontos de Implantação	13,0 [12,0-13,5]	4,0 * [3,0-9,5]
Sítios de Reabsorção	1,0 [0,0-1,0]	1,0 [0,0-1,5]
Tamanho da Ninhada	13,0 [11,0-13,0]	3,0 * [2,0-8,5]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

*P<0,05; teste de Mann-Whitney.

Número de machos experimentais entre parênteses (2 fêmeas/macho).

A avaliação dos dados absolutos não mostrou alteração entre os grupos quanto ao número de corpos lúteos. Porém, houve menor número de pontos de implantação no grupo Flutamida. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à quantidade

de sítios de reabsorção, apesar do tamanho da ninhada apresentar-se bastante reduzida (Tabela 8). Para melhor interpretação destes dados, foram calculados parâmetros derivados em forma de índices e taxas, expressos em porcentagem, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Taxas e índices derivados dos dados coletados durante laparotomia exploratória em fêmeas não tratadas, acasaladas por machos experimentais.

Estudo da Fertilidade - Dados Derivados		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=13)
Índice Gestacional (%)	100,0	100,0
Índice de Fertilidade (%)	95,0	46,7 **
Taxa de Implantação (%)	93,8 [88,5-100,0]	33,0 ** [17,5-58,0]
Taxa de Perda Pré-Implantação (%)	6,5 [0,0-9,6]	67,0 ** [42,0-82,5]
Taxa de Perda Pós-Implantação (%)	6,9 [0,0-8,3]	13,3 [0,0-33,3]
Taxa de Viabilidade Fetal (%)	93,1 [91,7-100,0]	86,7 [66,7-100,0]
Índice de Virilidade da Prole (%)	58,5 [47,6-63,1]	53,8 [50,0-67,9]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}] ou em porcentagem pura.

**P<0,01; teste de Mann-Whitney ou teste Exato de Fisher.

Número de machos experimentais entre parênteses (2 fêmeas/macho).

As taxas e índices calculados a partir dos dados coletados durante a laparotomia exploratória foram resumidos na Tabela 9. As taxas de implantação mostraram redução,

enquanto as taxas de perda pré-implantação mostraram-se aumentadas no grupo Flutamida e as taxas de perda pós-implantação permaneceram inalteradas entre os grupos. O índice gestacional mostrou-se inalterado, sendo de 100% em todos os grupos. Porém, o índice de fertilidade do grupo Flutamida apresentou-se reduzido em relação ao grupo Controle. Não foram observadas alterações na taxa de viabilidade fetal e no índice de virilidade da prole (Tabela 9). Adicionalmente, não houve número significativo, nem discrepante, de fetos em lise e fetos mortos.

5. Avaliação do comportamento sexual masculino

A porcentagem de animais que apresentaram comportamento sexual masculino (ativos) não diferiu estatisticamente entre os grupos. O grupo tratado com flutamida, entretanto, mostrou retardo para a ejaculação, necessidade de maior número de intromissões para que ocorresse a primeira ejaculação, bem como excessivo número de montas sem intromissão. Além disso, os animais deste grupo demoraram mais tempo para alcançar a ejaculação, bem como efetuaram um reduzido número de ejaculações findos os trinta minutos de teste (Tabela 10).

Tabela 10. Desempenho dos animais na avaliação do comportamento sexual masculino, perante fêmea comprovadamente receptiva.

Comportamento Sexual Masculino		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=13)
Animais ativos (%)	70,0	72,7
Latência para a 1ª intromissão (s)	32,0 [28,5 - 44,5]	151,0 * [102,5 – 285,0]
Nº de intromissões até a 1ª ejaculação	17,0 [12,0 – 21,0]	34,5 ** [28,8 – 45,8]
Latência para a 1ª ejaculação (s)	249,0 [225,5 -367,5]	647,0 * [556,0 – 738,0]
Latência para a 1ª intromissão após a 1ª ejaculação (s)	272,0 [258,0 – 328,5]	268,0 [236,8 – 306,8]
Nº de intromissões após a 1ª ejaculação	11,0 [10,0 – 12,5]	16,0 [11,0 – 20,3]
Número total de montas sem intromissão	0,0 [0,0 – 0,0]	7,5 *** [6,0 – 9,5]
Número total de ejaculações	3,0 [3,0 – 3,5]	0,5 ** [0,0 – 1,5]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}] ou porcentagem pura.

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; teste de Mann-Whitney ou teste Exato de Fisher.

Número de animais entre parênteses.

Com o propósito de melhor explicitar a dinâmica dos animais durante a avaliação do comportamento sexual masculino, foi construída a Figura 2, onde foi representada a porcentagem de animais que chegaram à primeira, segunda, terceira e

quarta ejaculação. No cálculo das porcentagens foram levados em consideração apenas os animais ativos.

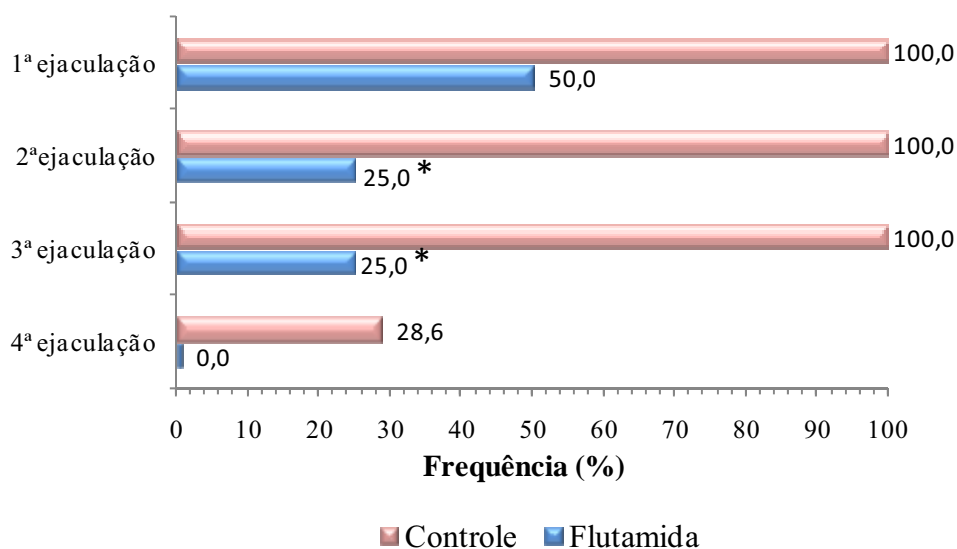


Figura 2: Porcentagem de animais que chegaram à primeira, segunda, terceira e quarta ejaculação, durante a avaliação de comportamento sexual masculino, segundo seus grupos experimentais. * $P < 0,05$; teste Exato de Fisher. (número inicial de animais: Controle = 10; Flutamida=13).

Os animais Controle realizaram em média três ejaculações, enquanto metade dos animais do grupo Flutamida nem sequer ejaculou em trinta min. de teste (Figura 2).

6. Avaliação do comportamento sexual feminino

Durante a avaliação do comportamento sexual feminino, com os machos experimentais sexualmente experientes, castrados e pré-tratados com estradiol, 5 dos 11 animais do grupo Flutamida apresentaram comportamento de aceitação da monta, porém nenhuma lordose ocorreu. Nenhum animal Controle apresentou quaisquer comportamentos sexuais femininos. Assim, não foi possível estabelecer comparação

estatística entre latências de início do comportamento ou número de montas aceitas. Os dados estatisticamente analisáveis se resumiram à proporção de animais que apresentaram comportamento sexual feminino (ativos) em cada grupo experimental. Assim, o grupo Flutamida diferiu estatisticamente do Controle quanto à porcentagem de animais ativos, como mostra a Figura 3.

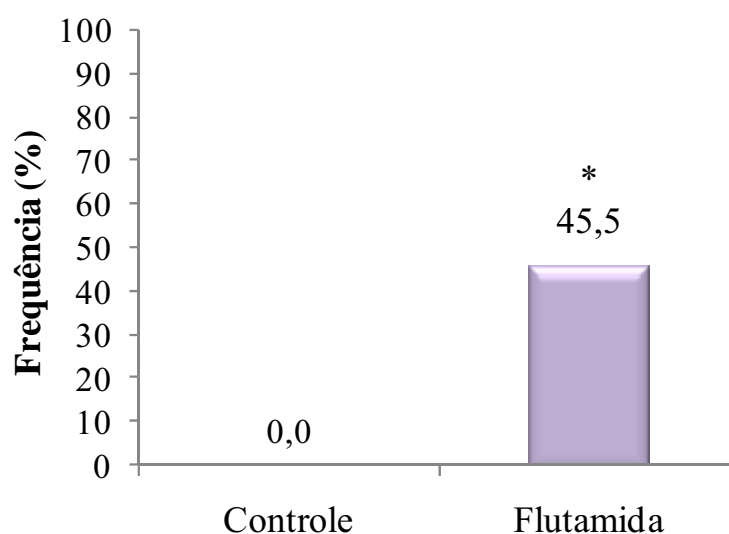


Figura 3: Proporção de animais orquidectomizados e pré-tratados com estradiol que aceitaram uma ou mais montas de um macho não tratado sexualmente experiente. Dados expressos em porcentagem pura. * $P < 0,05$; teste exato de Fisher. (Controle: $n=10$; Flutamida: $n=13$).

8. Dosagem de testosterona plasmática total

Houve redução significativa no nível plasmático de hormônio masculino nos animais do grupo Flutamida ($89,77[51,1-143,97]**$ ng/dl). A média das concentrações aferidas equivale a cerca de um terço da média encontrada para os animais do grupo Controle ($374,20[161,1-439,0]$ ng/dl), como mostra a Figura 4.

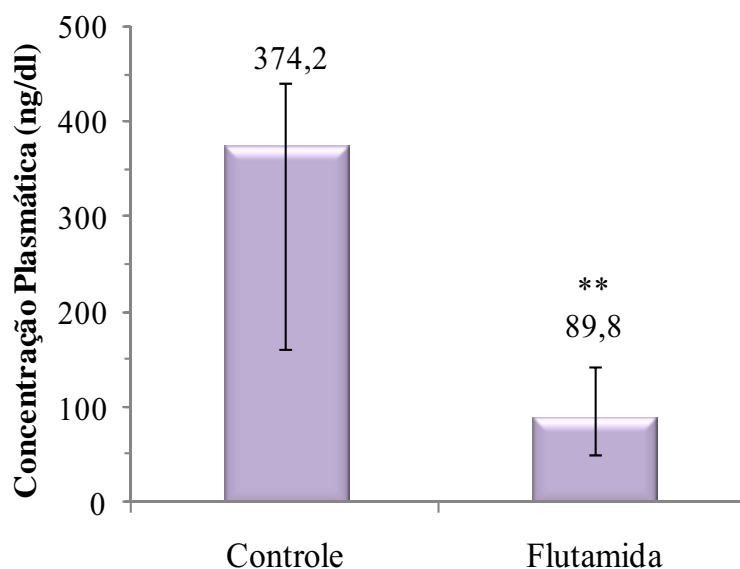


Figura 4: Concentração de testosterona total aferida no plasma dos animais, aos 110 dias de idade (ng/dl). Dados expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}]. **P<0,01; teste de Mann-Whitney. (n=8 animais/grupo)

9. Espermograma

Os dados gerados a partir do espermograma estão dispostos na Tabela 11. Observou-se, que a motilidade dos espermatozoides (progressivos ou não) não foi alterada pelo tratamento perinatal com flutamida. No entanto, a porcentagem de espermatozoides anormais foi maior e a concentração de espermatozoides apresentou-se reduzida no grupo tratado com o anti-androgênico.

Tabela 11. Espermograma realizado a partir do conteúdo do ducto deferente dos animais experimentais aos 110 dias de idade.

Espermograma		
Parâmetros	Controle (n=10)	Flutamida (n=9)
Espermatozóides Vivos (%)	99,0 [99,0 – 99,8]	99,0 [98,0 – 99,0]
Espermatozóides Progressivos (%)	43,5 [36,3 – 53,3]	36,0 [32,0 – 49,0]
Espermatozóides Não-Progressivos (%)	56,5 [46,8 – 63,8]	64,0 [51,0 – 68,0]
Espermatozóides Normais (%)	98,0 [98,0 – 98,8]	97,0** [96,0 – 97,0]
Espermatozóides Anormais (%)	2,0 [1,25 – 2,0]	3,0** [3,0 – 4,0]
Concentração de Espermatozóides (10^6 /ml)	81,3 [79,3 – 84,8]	63,0 ** [58,2 – 69,3]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

**P<0,01; teste de Mann-Whitney.

Número de animais entre parênteses.

10. Contagem Espermática

Procedeu-se à contagem das cabeças das espermátides coletadas diretamente do testículo e dos espermatozóides coletados das porções cabeça-corpo e cauda do epidídimo, separadamente. Os dados gerados durante tal avaliação estão dispostos na Tabela 12. Observa-se que o tratamento perinatal com flutamida levou a uma

diminuição na produção diária de espermatozóides (PDE) no testículo. No entanto, o tempo de trânsito dos gametas através do epidídimo não foi alterado.

Tabela 12. Dados gerados a partir da contagem das cabeças de espermátides maduras presentes no parênquima testicular e de espermatozóides em porções do epidídimo (cabeça-corpo e cauda), coletados dos animais experimentais aos 110 dias de idade.

Contagem Espermática e Trânsito de Espermatozóides			
		Controle (n=10)	Flutamida (n=9)
Testículo	Número de espermátides por grama de tecido	124,6 [110,5 - 128,1]	117,3 * [101,4 - 120,6]
	Produção Diária de Espermatozóides ($\times 10^6$ /testículo)	30,5 [26,8 - 31,8]	27,3 * [24,3 - 27,8]
Cabeça-Corpo	Número de espermatozóides por grama de tecido ($\times 10^6$ /g)	395,0 [365,0 - 443,8]	295 *** [291,3 - 305,0]
	Tempo de trânsito (em dias)	4,3 [3,8 - 5,5]	4,0 [3,6 - 4,8]
Cauda	Número de espermatozóides por grama de tecido ($\times 10^6$ /g)	753,8 [733,1 - 751,9]	637,5 ** [590,0 - 695,0]
	Tempo de trânsito (em dias)	6,2 [5,5 - 7,4]	6,4 [5,5 - 6,7]

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}].

*P< 0,05; **P<0,01 e ***P<0,001; teste de Mann-Whitney.

Número de animais entre parênteses.

11. Análise morfométrica e imunocitoquímica da próstata ventral

Pela análise da Tabela 13 observa-se que o grupo Flutamida apresentou uma menor porcentagem de núcleos epiteliais que reagiram positivamente ao ensaio imunocitoquímico para os receptores androgênicos (AR). Assim, as próstatas de animais adultos tratados perinatalmente com flutamida expressaram 10% menos receptores para o hormônio masculino do que os animais Controle. A altura média do epitélio prostático, aferida na região prostática intermediária, apresentou-se inalterada no grupo Flutamida, assemelhando-se à encontrada no grupo Controle.

Tabela 13. Porcentagem de núcleos epiteliais da próstata ventral que reagiram positivamente ao ensaio imunocitoquímico para AR e altura média do epitélio da região intermediária da próstata ventral (μm), de ratos aos 110 dias de idade.

Parâmetros	Análise da Próstata Ventral	
	Controle (n=7)	Flutamida (n=8)
Núcleos AR positivos (%)	75,8 [71,6 – 75,9]	65,4 * [64,7 – 67,9]
Altura média do epitélio (μm)	13,85 \pm 1,6	13,72 \pm 1,2

Valores expressos em mediana [IQ_{25%}-IQ_{75%}] ou média \pm DP.

*P < 0,05; teste de Mann-Whitney ou teste t corrigido por Welch.

Número de animais entre parênteses.

DISCUSSÃO

Os altos níveis de testosterona que ocorrem em momentos específicos da vida perinatal são elementos críticos no processo de diferenciação sexual hipotalâmica no macho. Neste sentido, observamos no presente estudo que ratos machos submetidos ao bloqueio androgênico perinatal por flutamida apresentaram comprometimentos em parâmetros reprodutivos logo após o nascimento, durante a puberdade e, principalmente, durante a vida adulta reprodutiva. Assim, ao nascimento, a distância anogenital mostrou-se reduzida no grupo Flutamida, apesar destes animais terem sido expostos a apenas duas doses de flutamida até o momento da aferição. Esta alteração evidenciou o quão rapidamente o organismo respondeu ao bloqueio androgênico. Estes resultados corroboram aqueles observados por Miyata et al. (2003). A ausência de alteração no peso corporal destes animais evidenciou que a redução não estava atrelada a uma redução no tamanho do animal. A distância anogenital, um fator morfológico testosterona-dependente, consiste em um caractere dimórfico em mamíferos. Desta forma, pode-se presumir que outros caracteres andrógeno-dependentes também tenham sofrido comprometimento. Além disso, distância anogenital ao nascer tem sido considerada um preditivo do volume do núcleo do dimorfismo sexual na área pré-óptica medial do hipotálamo de ratos adultos (FABER & HUGHES, 1992), caracteristicamente de três a cinco vezes maior em machos (SIMERLY, 1998). A ativação de receptores androgênicos na área pré-óptica medial do hipotálamo é essencial para a completa expressão do comportamento sexual masculino em ratos adultos (McGINNIS et al., 1996), especificamente para o comportamento copulatório (HARDING & McGINNIS, 2004). Coerentemente, observou-se que fêmeas expostas prenatalmente a níveis aumentados de testosterona apresentaram masculinização permanente da distância anogenital (aumento) e da genitália externa, com a formação de

fissura fálica e hipospádia (HOTCHKISS et al., 2007). Assim, a redução da distância anogenital ao nascer, no presente estudo, apontou precocemente para a existência de alteração no processo de diferenciação sexual do núcleo do dimorfismo da área pré-óptica medial, bem como possíveis alterações em estruturas periféricas.

Ao desmame, a medida absoluta da distância anogenital permaneceu reduzida no grupo Flutamida, porém foi acompanhada pela redução do peso corporal aferido na mesma ocasião. No entanto, efetuada a correção da DAG pelo peso corpóreo dos animais, não ocorria mais a diferença significativa, mostrando recuperação neste parâmetro. Assim, mecanismos compensatórios de atuação da testosterona (como, por exemplo, um aumento momentâneo da quantidade de receptores de andrógeno) podem ter sido ativados ao fim do tratamento com flutamida, resultando em um rápido desenvolvimento deste caractere e recuperação ao desmame. Essa normalização dos dados parece esclarecedora, porém, é importante ressaltar que não foram avaliados outros prováveis fatores que levaram a esta alteração do peso corporal, nem foram realizadas medidas corporais (circunferência do abdome e comprimento do corpo). Desta forma, é possível que a redução da DAG tenha realmente persistido até o desmame e que a normalização tenha levado a um mascaramento deste dado. A hipótese de uma real redução corrobora os dados de Miyata et al. (2003), além de ser coerente com estudos que mostram DAG reduzida à vida adulta reprodutiva em ratos tratados com flutamida na vida pré-natal (McINTYRE et al., 2001; CASTO et al., 2003).

A idade por ocasião do completo descolamento do prepúcio, momento em que a instalação da puberdade é considerada, mostrou-se retardada no grupo Flutamida. Este resultado corrobora com o observado por Miyata et al. (2003), em ratos tratados perinatalmente com o anti-androgênico. A instalação da puberdade é um evento altamente dependente de testosterona, coincidindo com um aumento característico na

produção de testosterona seguido de uma estabilização. Assim, o atraso para a instalação da puberdade, bem como a reduzida concentração de testosterona observada na vida adulta dos ratos tratados com flutamida no presente estudo, apontam para a prevalência de baixos teores de testosterona também durante esta fase. Noriega et al. (2009) observaram tal associação entre redução na concentração de testosterona e atraso na instalação da puberdade em estudo com ratos pré-púberes expostos ao fitalato di(2-etilhexil). Apesar desta associação, o atraso observado no presente estudo também pode estar relacionado a uma reduzida expressão de receptores androgênicos, modulando os efeitos da testosterona. Adicionalmente, estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que a inibição da conversão da testosterona à diidrotestosterona na fase perinatal não interferiu na idade por ocasião da instalação da puberdade, apontando para a importância da testosterona como hormônio *per se* neste processo (RIBEIRO & PEREIRA, 2005). Durante a puberdade, os hormônios esteróides ativam respostas endócrinas e comportamentais específicas, organizadas durante o desenvolvimento, de acordo com o sexo do indivíduo (ABDELNABI & OTTINGER, 2003). Desta forma, prejuízos a este processo podem ter agravado as alterações decorrentes da imperfeita masculinização causada pelo tratamento perinatal com flutamida. À puberdade o peso corporal mostrou-se aumentado no grupo Flutamida, o que pode se dever a um provável aumento de deposição de gordura devido à possível redução no teor de testosterona. Há também a possibilidade do aumento de peso dever-se ao fato destes animais terem sido pesados alguns dias depois (devido ao atraso para o descolamento do prepúcio). Apesar destas oscilações, o peso corporal do grupo Flutamida apresentou-se normalizado durante a vida adulta, momento em que o nível de testosterona geralmente se estabiliza. As alterações no peso corporal no grupo Flutamida podem indicar uma interferência do tratamento no desenvolvimento físico desses animais de um modo geral. No entanto,

isoladamente os dados de peso são insuficientes para uma conclusão precisa sobre alterações no desenvolvimento.

À idade adulta foram constatadas alterações no peso úmido dos testículos, próstata e epidídimos dos animais tratados com flutamida. Apesar dos três órgãos serem dependentes de testosterona, os dois primeiros apresentaram pesos reduzidos, enquanto o epidídimo apresentou-se aumentado. A redução dos testículos foi reafirmada a partir do cálculo do índice gônado-somático, pelo qual se determina a relação entre o peso das gônadas e o peso corporal do animal. Estes dados corroboram parcialmente os resultados de outros estudos que utilizaram bloqueio androgênico por flutamida (CASTO et al., 2003; MIYATA et al., 2003; METZDORFF et al., 2007), os quais descrevem redução nos pesos de órgãos da reprodução, inclusive epidídimo. Foi também observado que ratos adultos que foram expostos à flutamida *in utero* apresentaram hipoplasia, lesões e mal-formações em órgãos da reprodução em uma relação de gravidade dose-dependente (McINTYRE et al., 2001). Há a possibilidade, entretanto, de diversos fatores não diretamente ligados a atuação ou teores de testosterona terem levado ao aumento do peso do epidídimo, como um acúmulo de líquidos no parênquima do órgão e respostas alteradas a outros hormônios. Ademais, os estudos supracitados utilizaram períodos de tratamento mais prolongados, compreendendo o período de gênese de alguns destes órgãos. É interessante acrescentar que os pesos dos órgãos da reprodução em ratos machos adultos não foram alterados pela inibição pré-natal da conversão de testosterona a estradiol (GERARDIN & PEREIRA, 2002), evidenciando a importância da ação dos andrógenos na masculinização destas estruturas.

Os animais tratados perinatalmente com flutamida, do presente estudo, apresentaram o mesmo padrão de escolha dos animais Controle, durante o teste de

preferência sexual. Mesmo após terem contato direto e copularem com uma fêmea receptiva, houve preferência pela proximidade ao macho-isca. Neste sentido, o bloqueio androgênico na parte posterior da área pré-óptica medial do cérebro de ratos adultos foi capaz de reduzir a preferência por uma fêmea receptiva (McGINNIS et al., 2002). Assim, apesar de contribuir para o perfil de preferência em machos adultos, a ativação de receptores androgênicos aparentemente não é a relevante para a organização do perfil de preferência sexual durante o período investigado no presente estudo.

A partir do estudo da fertilidade ficou evidente a ineficácia dos animais tratados perinatalmente com flutamida em deixar descendentes. Mais de 50% das fêmeas acasaladas por machos do grupo Flutamida não apresentaram filhotes no dia da laparotomia exploratória. Este dado gerou um índice de fertilidade menor do que 50%, mostrando que os espermatozóides dos animais tratados com o anti-androgênico foram ineficazes na fecundação dos óvulos da fêmea receptiva não tratada. Uma redução em 24% na taxa de fertilidade acompanhada de um aumento de 30% nas taxas de perda pré-implantação foi encontrada em fêmeas normais acasaladas com machos tratados prenatalmente com letrozol, em nosso laboratório (GERARDIN & PEREIRA, 2002). No entanto, os resultados encontrados durante o presente estudo mostram que o bloqueio androgênico perinatal foi mais deletério para a organização da fertilidade do que essa inibição da enzima aromatase. Encontramos uma redução de 48.3% na taxa de fertilidade e um aumento de 60% nas taxas de perda pré-implantação, equivalente ao dobro do observado após inibição da aromatase. Elevadas taxas de perda pré-implantação foram também observadas em ratas acasaladas com machos expostos a um inibidor da conversão de testosterona a diidrotestosterona, durante a vida perinatal (RIBEIRO & PEREIRA, 2005). Assim, mais uma vez, a administração de flutamida mostrou maior comprometimento na fertilidade. Estes dados apontam para uma atuação

paralela ou sinérgica da testosterona juntamente aos seus metabólitos na organização da fertilidade. Inawaka et al., (2009) não observaram alterações na fertilidade de ratos machos tratados *in utero* com flutamida durante a primeira metade da prenhez (do 8º ao 15º dia gestacional), apesar de empregarem dose semelhante à utilizada no presente estudo. Este resultado indica que a contribuição da testosterona na organização pré-natal de parâmetros relacionados à fertilidade na vida adulta, provavelmente esteja limitada ao final da gestação, como o observado no presente estudo. O índice gestacional mostrou-se inalterado, visto que todas as fêmeas que levaram a prenhez a termo apresentaram todos os fetos vivos, apesar de em número reduzido, no momento da laparotomia exploratória. As taxas de perda pós-implantação mostraram-se inalteradas, bem como o número de sítios de reabsorção e de fetos em lise ou mortos. Assim, o tratamento parece não ter-se apresentado tóxico aos embriões/fetos. Adicionalmente, os números de corpos lúteos observados nas fêmeas acasaladas com os machos experimentais refletiram homogeneidade entre elas, de modo que os prejuízos, aparentemente, se deveram a comprometimentos advindos dos machos do grupo Flutamida. Assim, de um modo geral, o tratamento perinatal com flutamida não impossibilitou os animais de deixarem descendentes, mas levaram a padrões anormais de prenhez, gerando ninhadas de tamanho extremamente reduzido.

Os animais submetidos ao tratamento perinatal com flutamida mostraram-se também ineficientes na realização dos comportamentos sexuais tipicamente masculinos. O aumento na latência para o início da cópula observada nestes animais, pode se dever, entre outros fatores, à baixa concentração plasmática de testosterona, necessária à realização do comportamento copulatório (HARDING & MCGINNIS, 2004). Informações olfatórias também influenciam o comportamento sexual de machos (CAVALCANTE et al., 2006) sendo que os feromônios femininos levam ao aumento da

concentração de testosterona no macho (MACRIDES et al., 1975) e a mudanças comportamentais através de vias neurais correlacionadas a este processo (HALPERN & MARTINEZ-MARCOS, 2003). Assim, a reduzida concentração de testosterona observada no grupo Flutamida pode ter levado a uma percepção olfatória ineficiente, resultando em demora para o início da cópula. O elevado número de montas sem intromissão, também observado nestes animais, pode ser interpretado como insucesso para intromissão peniana. Tais insucessos podem ter comprometido a motivação sexual, contribuindo para o elevado número de intromissões que foram necessárias para que a primeira ejaculação ocorresse. Este padrão de comportamento corrobora o encontrado por Kojima et al. (2002) em camundongos tratados prenatalmente com flutamida e que apresentaram genitália normal. Apesar da ausência de anormalidades severas, há a possibilidade das alterações no desempenho sexual dos ratos do grupo Flutamida estarem associadas a uma redução no tamanho do pênis e da DAG na vida adulta, como mostrado no estudo de Casto et al. (2003). O reduzido número de ejaculações realizado pelos animais do grupo Flutamida corrobora os resultados de Dominguez-Salazar et al. (2002) que, entretanto, administraram flutamida por período mais extenso (do dia gestacional 12 até o nascimento). Estes autores também relataram um reduzido número de intromissões penianas nos animais que receberam o antiandrogênico, diferentemente do observado no presente estudo. As raras ejaculações, com um rápido encerramento da série ejaculatória, também podem estar relacionadas ao reduzido nível de testosterona observado nos animais Flutamida, visto que os hormônios esteróides contribuem para a determinação da saciedade sexual (PHILLIPS-FARFÁN & FERNÁNDEZ-GUASTI, 2009). Prejuízos semelhantes foram observados em ratos expostos ao estresse perinatal em nosso laboratório (GERARDIN et al., 2005). Os glicocorticóides aumentados durante o estresse interferiram na atuação da testosterona perinatal, levando a efeitos

semelhantes aos do bloqueio androgênico neste mesmo período. Ambas as manipulações compreenderam o período crítico de diferenciação sexual, assim sugerimos que os prejuízos ao comportamento copulatório observados no presente estudo provavelmente resultaram de um imperfeito processo de masculinização do cérebro.

Além do comprometido comportamento sexual masculino, os animais submetidos ao bloqueio androgênico perinatal apresentaram o comportamento tipicamente feminino de aceitação da monta, após castração seguida de estrogenização. Esta resposta comportamental do macho ao hormônio feminino pode ser considerada um preditivo para a existência de receptores estrogênicos remanescentes no cérebro destes animais, refletindo um processo de defeminização incompleto. Apesar da aceitação das montas, nenhuma lordose foi observada, provavelmente por serem comportamentos organizados e/ou modulados diferentemente. Neste sentido, Ribeiro e Pereira (2005), observaram lordose e aceitação da monta em ratos submetidos perinatalmente a um inibidor da enzima 5α -redutase2, castrados e estrogenizados quando adultos, salientando a importância da diidrotestosterona no processo de defeminização. Dominguez-Salazar et al. (2002) não observaram diferenças entre o comportamento feminino de ratos machos controle e tratados com flutamida, pois os animais de ambos os grupos apresentaram o comportamento semelhantemente. Adicionalmente, foi mostrado que ratos expostos precocemente a flutamida reagem diferentemente a situações estressantes, liberando mais glicocorticóides e em maior frequência (SEALE et al., 2005), além de apresentarem reação menos agressiva (CASTO et al., 2003). Assim, deve-se considerar que o tratamento perinatal com flutamida possa ter interferido na forma de reação destes animais frente à situação

estressante, de ser submetido à presença de um macho estranho, bem como sua menor pré-disposição a confrontá-lo, deixando-se ser montado.

O bloqueio androgênico perinatal com flutamida levou à redução da concentração de testosterona plasmática na vida adulta dos animais do presente estudo. Níveis aumentados de glicocorticóides durante a vida pré-natal, dados pela corticoterapia ou pelo estresse, também levaram à redução do hormônio na vida adulta (GERARDIN et al., 2005; PIFFER et al., 2009a,b). Porém, este resultado diverge de outros estudos (MIYATA et al., 2003; BENBRAHIM-TALLAA et al., 2008) que não observaram alteração nos níveis de testosterona nos animais submetidos ao tratamento com flutamida. Miyata et al. (2003) utilizaram também tratamento perinatal, porém com administração por gavagem e na dosagem de 10mg/kg/dia, além de terem efetuado a coleta do soro aos 56 dias de idade, quando oscilações no nível de testosterona ainda podem ocorrer. Em contrapartida, a inibição das enzimas de conversão da testosterona a diidrotestosterona e a estradiol durante a vida pré- e perinatal ocasionaram aumento da concentração plasmática de testosterona na vida adulta (RIBEIRO & PEREIRA, 2005; GERARDIN et al., 2008). Assim, a redução de testosterona observada no presente estudo sugere uma contribuição da testosterona *per se*, durante a fase perinatal, para a organização permanente da função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Sabendo-se que os aumentos recíprocos entre LH e testosterona testicular são ativados no feto a partir do dia 19,5 da gestação (PAKARINEN et al., 1994), pode-se sugerir que o tratamento perinatal com flutamida possa ter interferido na instalação deste padrão de produção de testosterona mediado pelo estímulo do LH.

A qualidade e contagem espermática apresentaram-se prejudicadas nos animais submetidos ao bloqueio androgênico perinatal. Apesar de não diferirem quanto à porcentagem de espermatozóides móveis e imóveis, estes animais apresentaram maior

porcentagem de espermatozoides anormais, além da reduzida concentração espermática. Coerentemente com esta redução, a contagem espermática revelou que a produção diária de espermatozoides também estava reduzida no grupo Flutamida. Em vista da baixa produção diária, a contagem de espermatozoides nas porções cabeça-corpo e cauda do epidídimo também foram significativamente menores. Estes prejuízos provavelmente foram responsáveis pelas reduzidas taxas de implantação e aumentadas taxas de perda pré-implantação, observadas em fêmeas acasaladas com machos do grupo Flutamida. A associação entre infertilidade e redução da qualidade espermática, já foi bem descrita na literatura (OVERSTREET & KATZ, 1987), o que foi corroborado pelo pequeno número de descendentes deixados pelos animais do grupo Flutamida. Em geral, a contagem espermática está também positivamente correlacionada à contagem das células de Sertoli (ORTH et al, 1988) sugerindo que o bloqueio androgênico perinatal possa ter levado a uma redução no número desse tipo celular. Alterações na maturação das células de Sertoli e um aumento na taxa apoptótica em células germinativas foram observadas em ratos adultos submetidos ao tratamento intra-uterino com flutamida (BENBRAHIM-TALLAA et al., 2008). Omezzine et al. (2003) associaram a hipoespermatogênese, observada em ratos adultos expostos *in utero* à flutamida, a um processo apoptótico crônico vinculado ao aumento da expressão e atividade das caspases 3 e 6 nas células germinativas. Assim, o processo apoptótico parece ser um forte candidato como fator crítico na espermatogênese e, aparentemente, sofre modulação pela testosterona pré-natal, podendo auxiliar na interpretação dos dados do presente estudo. Adicionalmente, a contribuição da testosterona para a organização da espermatogênese parece ocorrer em um período limitado da embriogênese. Estudos nos quais a manipulação hormonal por flutamida contemplou o final da gestação resultaram em alterações na contagem e/ou qualidade espermáticas

(OMEZZINE et al., 2003; BENBRAHIM-TALLAA et al., 2008), assim como no presente estudo. Corroborando esta hipótese, o bloqueio androgênico restrito ao início e metade da gestação não resultou em prejuízo neste parâmetro (INAWAKA et al., 2009). Apesar das alterações quanto à contagem e qualidade espermática, o tempo de trânsito espermático não diferiu entre os grupos do presente estudo, indicando que o processo de maturação dos espermatozoides provavelmente não foi afetado pelo bloqueio androgênico. Portanto, as anormalidades morfológicas observadas nos espermatozoides durante a análise seminal provavelmente não se deveram a prejuízos neste parâmetro.

O receptor androgênico está localizado na membrana nuclear das células-alvo e sua ativação é responsável por desencadear a síntese de proteínas específicas. Assim, o bloqueio androgênico perinatal por flutamida pode ter ocasionado mudanças no padrão de transcrição gênica durante esta importante fase do desenvolvimento e de organização reprodutiva. Sabe-se que a maioria dos genes localizados no cromossomo Y é expressa na crista genital do embrião e está associada ao desenvolvimento dos testículos e à espermatogênese (GRAVES, 2000). Um deles, o *gene relacionado ao sexo* (Sry), é considerado um gene crítico para o início do processo de diferenciação fenotípica entre os sexos e para o desenvolvimento das gônadas (KNICKMEYER & BARON-COHEN, 2006). Assim, aventamos a possibilidade dos prejuízos observados na produção diária e na morfologia dos espermatozoides, observados no presente estudo, estarem associadas a possíveis interferências do tratamento perinatal com a transcrição gênica. Adicionalmente, as alterações observadas nos animais do grupo Flutamida podem também ter resultado de uma alteração na atividade da enzima aromatase, uma vez que a atuação da testosterona em receptores específicos parece interferir na ativação desta enzima (BEYER et al., 1994), modulando, indiretamente, a taxa de conversão do hormônio masculino a estradiol. Dessa forma, é possível que parte dos

comprometimentos observados nos animais do grupo Flutamida se deva a uma redução desta conversão, considerada um evento-chave na diferenciação sexual hipotalâmica. Em um estudo recente, também foi observada influência da testosterona sobre a produção das isoformas da enzima 5α -redutase, em ratos com poucos dias de idade (SÁNCHEZ et al., 2006). Por outro lado, Recabarren et al (2008) observaram que níveis aumentados de testosterona na vida pré-natal resultam na redução da contagem e motilidade espermática, além de haver redução do diâmetro escrotal.

A partir da análise imunocitoquímica do epitélio da próstata ventral foi observado que os animais do grupo Flutamida apresentaram uma redução de 10% na quantidade de núcleos celulares contendo receptores androgênicos. Este pode ter sido um fator determinante para o reduzido peso úmido deste órgão. No entanto, não foi detectada alteração na altura média do epitélio prostático, em geral associada à expressão do receptor de andrógeno. Semelhantemente ao observado na próstata, é possível que uma redução da expressão do receptor androgênico tenha ocorrido em outras estruturas, explicando parte das alterações observadas em outros órgãos. Na próstata, os andrógenos atuam via receptores androgênicos mesenquimais para estimulando a síntese e secreção de vários fatores autócrinos e parácrinos que regulam o crescimento e a diferenciação do epitélio e do estroma prostáticos (CUNHA et al 1995). Assim, pode ter ocorrido um retardo no crescimento e proliferação celular da próstata, resultando em um menor peso úmido, apesar da altura do epitélio ter-se apresentado inalterada. A partir dos dados descritos em relação aos testículos de ratos adultos submetidos ao bloqueio androgênico perinatal (OMEZZINE et al., 2003; BENBRAHIM-TALLAA et al., 2008), também é possível sugerir alteração na maturação celular e taxa apoptótica na próstata dos animais Flutamida.

O conjunto destes resultados nos possibilita afirmar que os processos de masculinização e defeminização do hipotálamo ocorreram de forma incompleta na ausência de ligação da testosterona ao seu receptor. Esta imperfeita diferenciação sexual culminou na ineficiência dos animais do grupo Flutamida para o propósito de deixarem descendentes. Alterações na diferenciação sexual decorrentes de insultos intra-uterinos foram bastante estudados (PEREIRA et al., 2002; GERARDIN et al., 2005; PEREIRA & PIFFER, 2005; PIFFER et al., 2009a,b) e perinatais (GOGAN et al., 1981; LONSTEIN et al., 2002; PEREIRA et al., 2003; RIBEIRO & PEREIRA, 2005). No entanto, raros são os estudos recentes que abordam alterações decorrentes da interferência de agentes que possam atuar como desreguladores endócrinos exclusivamente sobre a vida neonatal. Assim, há a impressão de que os insultos pré-natais são os responsáveis pelas alterações observadas em manipulações perinatais. Neste sentido, o estudo de Hotchkiss et al. (2003) mostra a interferência da manipulação hormonal sobre o comportamento dimórfico de luta. Assim, os autores observaram os efeitos da administração neonatal dos anti-androgênicos vinclozolin (um fungicida) e flutamida sobre o comportamento de ratos jovens. Ambos os tratamentos resultaram em machos menos reativos que animais controle e que fêmeas androgeneizadas no mesmo período. Apesar de não ser possível distinguir os prejuízos decorrentes do bloqueio androgênico sobre cada fase separadamente, fica indicada a importância da testosterona neonatal sobre a organização de comportamentos dimórficos no presente estudo.

Assim, o bloqueio androgênico perinatal foi capaz de prejudicar a organização do comportamento sexual e o desenvolvimento de órgãos essenciais à reprodução. Estes resultados corroboram a importância da atuação da testosterona como hormônio *per se* no processo de diferenciação sexual de estruturas centrais e periféricas.

CONCLUSÕES

- O comprometimento do peso corporal dos animais do grupo Flutamida indicou interferência do bloqueio androgênico perinatal no desenvolvimento físico.
- A redução da distância anogenital ao nascimento evidenciou a rápida resposta do organismo ao tratamento e indicou precocemente uma alteração na diferenciação sexual.
- O retardo na idade por ocasião da instalação da puberdade indicou uma reduzida concentração de testosterona neste período e um possível prejuízo no processo de ativação reprodutiva.
- O reduzido nível plasmático de testosterona aponta para um comprometimento à função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, que provavelmente contribuiu para várias alterações observadas nos demais parâmetros.
- O comprometimento da qualidade e contagem espermáticas, assim como do comportamento de cópula, prejudicaram a capacidade dos animais deixarem descendentes.
- O padrão de preferência sexual não foi afetado pelo tratamento perinatal com flutamida.
- A aceitação da monta indicou a existência de receptores cerebrais de estrógeno remanescentes, apontando para um imperfeito processo de defeminização hipotalâmica.
- O bloqueio androgênico perinatal levou à redução dos pesos úmidos da próstata e testículo. A diminuição da próstata parece ter resultado da redução nos receptores androgênicos, retardando seu crescimento. Semelhante redução na expressão de receptores androgênicos pode ter ocorrido em outros tecidos, inclusive nos testículos.

Finalizando, o conjunto de resultados possibilita afirmar que a ligação da testosterona ao seu receptor durante vida perinatal consiste realmente em um evento essencial ao perfeito desenvolvimento dos parâmetros reprodutivos. O bloqueio androgênico perinatal foi capaz de prejudicar o desenvolvimento de órgãos da reprodução, a instalação do padrão comportamental masculino, a capacidade de deixar descendentes, a expressão de receptores androgênicos e a função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada na vida adulta. Desta forma, as estruturas relacionadas à reprodução parecem ser extremamente sensíveis à atuação da testosterona como hormônio *per se* durante o período investigado no presente estudo. Com base nestas colocações, concluímos que a testosterona *per se* participa de vias metabólicas essenciais à completa masculinização e defeminização do cérebro, bem como de estruturas periféricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABI, M.A., OTTINGER, M.A. Hypothalamic indolamines during embryonic development and effects of steroid exposure. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.130, p.13-9, 2003.
- ANAHARA, R., TOYAMA, Y., MAEKA, W.A.M., KAI, M., ISHINO, F., TOSHIMORI, K., MORI, C. Flutamide depresses expression of cortactin in the ectoplasmic specialization between the Sertoli cells and spermatids in the mouse testis. **Food Chem. Toxicol.**, v.44, p.1050–6, 2006.
- ARTECHE, E., STRIPPOLI, G., LOIRAND, G., PACAUD, P., CANDENAS, L., MOLTÓ, J.C., SOUTO L., FERNANDEZ, J., NORTE, M., MARTÍN, J.D., SAVINEAU, J.P. An analysis of the mechanisms involved in the okadaic acid induced contraction of the estrogen-primed rat uterus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.282, p.201-7, 1997.
- BALTHAZART, J., BALL, G.F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neurosci.**, v.21, p.243-9, 1998.
- BENBRAHIM-TALLAA, L., SIDDEEK ,B., BOZEC, A., TRONCHON, V., FLORIN, A., FRIRY, C., TABONE, E., MAUDUIT, C., BENAHMED, M. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. **J. Endocrinol.**, v.196, n.1, p.21-31, 2008.
- BEYER, C., GREEN, S.J., HUTCHISON, J.B. Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse hypothalamic aromatase neurons in vitro. **Endocrinology**, v.135, n.3, p.1220-6, 2007.
- BOCCON-GIBOD, L., FOURNIER, G., BOTTET, P., MARECHAL, J.M., GUITER, J., RISCHMAN, P., HUBERT, J., SORET, J.Y., MANJIN, P., MALLO, C., FRAYSSE, C.E. Flutamide versus orchidectomy in the treatment of metastatic prostate carcinoma. **Eur. Urol.**, v.32, n.4, p.391-5, discussion 395-6, 1997.
- CAO, A., ZHANG, C. Sex-specific effects of androgen and estrogen on proliferation of the embryonic chicken hypothalamic neurons. **Endocrine**, v.31, n.2, p.161-6, 2007.
- CASTO, J.M., WARDA, O.B., BARTKEB, A. Play, copulation, anatomy, and testosterone in gonadally intact male rats prenatally exposed to flutamide. **Physiol. Behav.**, v.79, p.633– 41, 2003.

- CAVALCANTE, J.C., BITTENCOURT, J.C., ELIAS, C.F. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. **Physiol. Behav.**, v.88, p.160–6, 2006.
- CHABNER, B.A., RYAN, D.P., PAZ-ARES, L., GARCIA-CARBONERO, R., CALABRESI, P. Antineoplastic Agents. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.1442.
- CORBIER, P., EDWARDS, D.A., ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. **Arch. Int. Physiol. Biochim. Bioph.**, v.100, p.127-31, 1992.
- CORBIER, P., KERDELHUE, B., PICON, R., ROFFI, J. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. **Endocrinology**, v.103, p.1985-91, 1978.
- CUNHA, G.R. Mesenchymal-epithelial interactions during androgen-induced development of the prostate. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.171, p.15-24, 1985.
- DOHLER, K.D. The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. **Int. Rev. Cytol.**, v.131, p.51-7, 1991.
- DOMINGUEZ-SALAZAR, E., PORTILLO, W., BAUM, M.J., BAKKER, J., PAREDES, R.G. Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. **Physiol. Behav.**, v.75, p.337– 46, 2002.
- ERSKINE, M.S., TOBET, S., BAUM, M.J. Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity, and hypothalamic estradiol in male and female ferrets. **Endocrinology**, v.122, p.524-30, 1988.
- FABER, K.A., HUGHES Jr, C.L., (1992). Anogenital distance at birth as a predictor of volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the hypothalamus and pituitary responsiveness in castrated adult rats. **Biol. Reprod.**, v.46, p.101–4.
- GERARDIN, D.C.C., PEREIRA, O.C.M., KEMPINAS, W.G., FLORIO, J.C., MOREIRA, E.G., BERNARDI, M.M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiol. Behav.**, v.84, p.97-104, 2005.

- GERARDIN, D.C.C., PEREIRA, O.M.C. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.309-13, 2002.
- GERARDIN, D.C.C., PIFFER, R.C., GARCIA, P.C., MOREIRA, E.G., PEREIRA, O.C.M. Effects of maternal exposure to an aromatase inhibitor on sexual behaviour and neurochemical and endocrine aspects of adult male rat. **Reprod. Fertil., Dev.**, v.20, p.557–62, 2008.
- GOGAN, F., SLAMA, A., BIZZINI-KOUTZNETZOVA, B. Importance of perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat. **J. Endocrinol.**, v.91, p.75-9, 1981.
- GRAVES, J.A.M. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - a feminist view. **Biol. Reprod.**, v.63, p.667–76, 2000.
- GRAY Jr, L.E., OSTBY, J.S., KELCE, W.R.. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide Vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.129, p. 46-52, 1994.
- HALPERN, M., MARTINEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Prog. Neurobiol.**, v.70, p.245–318, 2003.
- HARDING, S.M., MCGINNIS, M.Y. Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. **Physiol. Behav.**, v.81, p.671-80, 2004.
- HIORT, O., HOTERHUS, P.M. The molecular basis of male differentiation. **Eur. J. Endocrinol.**, v.142, p.101-10, 2000.
- HOTCHKISS, A.K., LAMBRIGHT, C.S., OSTBY, J.S., PARKS-SALDUTTI, L., VANDENBERGH, J.G., GRAY Jr, L.E. Prenatal Testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female sprague-dawley rats. **Toxicol. Sci.**, v.96, n.2, p.335–45, 2007.
- HOTCHKISS, A.K., OSTBY, J.S., VANDENBERGH, J.G., GRAY Jr, L.E.. An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. **Physiol. Behav.**, v.79, p.151– 6, 2003.
- INAWAKA, K., KAWABE, M., TAKAHASHI, S., DOI, Y., TOMIGAHARA, Y., TARUI, H., ABE, J., KAWAMURA, S., SHIRAI, T. Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on

- spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.;237, p.178–87, 2009.
- KELCE, W.R., WILSON, E.M. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. **J. Mol. Med.**, v.75, p.198-207, 1997.
- KNICKMEYER, R.C., BARON-COHEN S. Fetal testosterone and sex differences. **Early Hum. Dev.**,v.82, p.755-60, 2006.
- KOJIMA, Y., HAYASHI, Y., MIZUNO, K., MOGAMI, M., SASAKI, S., KOHRI, K. Spermatogenesis, fertility and sexual behavior in a hypospadiac mouse model. **J. Urol.**, v.;167, p.1532-37, 2002.
- LAUBER, M.E., SARASIN, A., LICHTENSTEIGER, W. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.61, n.3-6, p.359-64, 1997.
- LEE, V.W.K., DE KRETZER, D.M., HUDSON, B. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **J. Reprod. Fertil.**, p.553-91, 1975.
- LONSTEIN, S.J., ROOD, B.D., DE VRIES, G.J. Parental responsiveness is feminized after neonatal castration in virgin male prairie voles, but is not masculinized by perinatal testosterone in virgin females. **Horm. Behav.**, v.41, p.80–7, 2002.
- LUND, T.D., SALYER, D.L., FLEMING, D.E., LEPHART, E.D. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. **Dev. Brain Res.**, v.120, p.261–6, 2000.
- MACLUSKY, N.J., NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v.211, p.1294-303, 1981.
- MACRIDES, F., BARTKE, A., DALTERIO, S. Strange females increase plasma testosterone levels in male mice. **Science**, v.189, p.1104–6, 1975.
- McCARTHY, M.M., DAVIS, A.M., MONG, J.A. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. **Brain Res. Bull.**, v.44, p.487-95, 1997.
- McEWEN, B.S. Sexual maturation and differentiation: the role of the gonadal steroids. **Prog. Brain Res.**, v.8, p.291-307, 1978.

- McGINNIS, M.Y., MONTANA, R.C., LUMIA, A.R. Effects of hydroxyflutamide in the medial preoptic area or lateral septum on reproductive behaviors in male rats. **Brain Res. Bull.**, v.59, n.3, p. 227–34, 2002.
- McGINNIS, M.Y., YU, A.W. Age-related changes in androgen receptor levels in cranial nerve nuclei of male rats. **Brain Res. Bull.**, v.36, n.6, p.581-5, 1995.
- McGINNIS, M.Y., WILLIAMS, G.W., LUMIA, A.R. Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area of hypothalamus, but not amygdala or septum. **Physiol. Behav.**, v.60, n.3, p.783-9, 1996.
- McINTYRE, B.S., BARLOW, N.J., FOSTER, P.M.D. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide *in utero*: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. **Toxicol. Sci.**, v.62, p.236–49, 2001.
- METZDORFF, S.B., DALGAARD, M., CHRISTIANSEN, S., AXELSTAD, M., HASS, U., KIERSGAARD, M.K., SCHOLZE, M., KORTENKAMP, A., VINGGAARD, A.M. Dysgenesis and histological changes of genitals and perturbations of gene expression in male rats after *in utero* exposure to antiandrogen mixtures. **Toxicol. Sci.**, v.98, n.1, p.87–98, 2007.
- MIYATA, K., YABUSHITA, S., SANO, M., MIYASHITA, K., OKUNO, Y., MATSUO, M. Effects of perinatal exposure to flutamida on sex hormone responsiveness in F1 male rats. **J. Toxicol. Sci.**, v.28, n.3, p.149-63, 2003.
- MONTANO, M.M., WELSHONS, W.V., VOM SAAL, F.S. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol fetal and sexual differentiation in female rats. **Biol. Reprod.**, v.53, p.1198-207, 1995.
- NAGHDI, N., NAFISY, N., MAJLESSI, N. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. **Brain Res.**, v.897, p.44-51, 2001.
- NORIEGA, N.C., HOWDESHELL, K.L., FURR, J., LAMBRIGHT, C.R., WILSON, V.S., GRAY Jr, L.E. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male sprague-dawley and long-evans rats. **Toxicol. Sci.**, v.111, n.1, p.163–78, 2009.
- OMEZZINE, A., CHATER, S., MAUDUIT, C., FLORIN, A., TABONE, E., CHUZEL, F., BARS, R., BENAHMED, M. Long-term apoptotic cell death process with

- increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. **Endocrinology**, v.144, p.648–61, 2003.
- ORTH, J.M., GUNSALUS, G.L., LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v.122, p.787-94, 1988.
- OVERSTREET, J.W., KATZ, D.F. Semen analysis. **Urol. Clin. North Am.**, v.14, p.441-9, 1987.
- PAKARINEN, P., PROSHLYAKOVA, E., HUHTANIEMI, I. Pituitary-gonadal interactions in perinatal rats: relationships of plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations, and pituitary levels of LH subunit mRNAs. **Neuroendocrinology**, v.60, n.1, p.42-9, 1994.
- PARKER, K.L., SCHEDL, A., SCHIMMER, B.P. Gene interactions in gonadal development. **Annu. Rev. Physiol.**, v.61, p.417-33, 1999.
- PEREIRA, O.C.M., ARENA, A.C., YASUHARA, F., KEMPINAS, W.G. Effects of prenatal hydrocortisone acetate exposure on fertility and sexual behavior in male rats. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.38, p.36-42, 2003.
- PEREIRA, O.C.M., PIFFER, R.C. Puberty installation and adrenergic response of seminal vesicle from rats exposed prenatally to hydrocortisone. **Life Sci.**, v.77, p.1381-90, 2005.
- PEREIRA, O.C.M., YASUHARA, F., ARENA, A.C. Cholinergic responses of seminal vesicles isolated from rats exposed perinatally to hydrocortisone. **Pharmacol. Res.**, v.48, p.91-5, 2002.
- PEREIRA, O.C.M. Endocrine disruptors and hypothalamic sexual differentiation. **Annu. Rev. Sci.**, v.5, p.87-94, 2003.
- PHILLIPS-FARFÁN, B.V., FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. **Neurosci. Behav. Rev.**, v.33, p.442–55, 2009.
- PIFFER, R.C., GARCIA, P.C., GERARDIN, D.C.C., KEMPINAS, W.G., PEREIRA, O.C.M. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.21, p.634–9, 2009.

- PIFFER, R.C., GARCIA, P.C., PEREIRA, O.C.M. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. **Physiol. Behav.**, v.98, p.163–7, 2009.
- PRINCE, K.N., PRINCE, J.S., KINGHORN, E.W., FLEMING, D.E., RHEES, R.W. Effects of sexual behavior manipulation on brain plasticity in adult rats. **Brain Res. Bull.**, v.47, p.349-55, 1998.
- RECABARREN, S.E., ROJAS-GARCIA, P.P., RECABARREN, M.P., ALFARO, V.H., SMITH, R., PADMANABHAN, V., SIR-PETERMANN, T. Prenatal testosterone excess reduces sperm count and motility. **Endocrinology**, v.149, n.12, p.6444-8, 2008.
- RHEES, R.W., AL-SALEH, H.N., KINGHORN, E.W., FLEMING, D.E., LEPHART, E.D. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. **Brain Res. Bull.**, v.50, n.3, p.193-9, 1999.
- RHODA, J., COBIER, P., ROFFI, J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 β -estradiol. **Endocrinology**, v.114, p.1754-60, 1984.
- RIBEIRO, C.M., PEREIRA, O.M.C. 5 α -reductase 2 inhibition impairs brain defeminization of male rats: reproductive aspects. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.82, p.228-35, 2005.
- ROBB, G.W., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.103-7, 1978.
- SÁNCHEZ, P., TORRES, J.M., DEL MORAL, R.G., ORTEGA, E. Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in early postnatal life of rat. **Neurochem. Int.**, v.49, n.6, p.626-30, 2006.
- SEALE, J.V., WOOD, S.A., ATKINSON, H.C., LIGHTMAN, S.L., HARBUZ, M.S. organizational role for testosterone and estrogen on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. **Endocrinology**, v.146, n.4, p.1973-82, 2005.
- SELMANOFF, M.K., BRODKIN, L.D., WEINER, R.I. Aromatization and 5 α -reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. **Endocrinology**, v.101, p.841-8, 1977.
- SIMERLY, R.B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways, **Behav. Brain Res.**, v.92, p.195–203, 1998.

WARD, I.L., WEISZ, J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males.
Science, v.207, p.328-9, 1980.

Copulatory efficiency and fertility in male rats exposed perinatally to flutamide

^aLeonelli, C., ^bGarcia P.C., ^{a,b,*} Pereira O.C.M.

^aDepartment of Pharmacology, Institute of Biosciences - Sao Paulo State University – UNESP, 18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

^bDepartment of Internal Medicine, Botucatu Medical School - Sao Paulo State University – UNESP, 18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 14 3811 6253; fax: +55 14 3815 3744.

E-mail address: pereira@ibb.unesp.br (OCM Pereira).

Abstract

This study investigated the effects of perinatal treatment with the antiandrogenic flutamide on male sexual behavior, semen parameters, and fertility in adult male rats. Pregnant rats received 15mg/kg of flutamide or peanut oil, s.c., at day 19 of pregnancy (GD19) and for the first five postnatal days (PND1-5). The treated animals showed increases in latency to copulatory behavior, number of mounts without penis intromission, number of intromissions until ejaculation, latency to ejaculation, and reduced number of ejaculations. Flutamide treated rats presented reductions in percentage of normal spermatozoa, spermatozoa concentration, daily testicular sperm production, and testosterone level. Normal females mated with treated males presented more pre-implantation losses, reduced implantation rates, and consequently reduced offspring size. Thus, the present results indicated that perinatal flutamide treatment damaged organizational processes of sexual differentiation, which led to inefficiency in copulatory behavior and reductions in sperm quality and count, resulting in low capacity for producing descendants.

Keywords: flutamide, androgen blockade, perinatal, sexual behavior, fertility, sperm quality, sperm count, male rat.

Introduction

Several studies have reported the importance of the presence of testicular hormone in the perinatal period, to stabilize physiology, behavior and neuroanatomic differences between the sexes [1,2]. Self-radiographic and biochemical studies have shown that androgen receptors are highly concentrated in some areas of the brain such as the medial preoptic area of the hypothalamus [3-5], where the nucleus of sexual dimorphism was found, which supports the idea that sexual differentiation is influenced by androgens. Understanding the mechanisms involved in testosterone action on sexual differentiation is a very important front in the current debate on environmental exposure to some endocrine disruptors that can act antiandrogenically. Exposure to these substances leads to altered sexual differentiation [6] and impaired dimorphic play behavior [7] in male rats. Exposure to several endocrine disruptors can occur in combination, when found in the environment. Thus, even at relatively low concentrations, these substances can act cumulatively, leading to reproductive disorders, as observed after administration of different doses of flutamide, vinclozolin and procymidone [8].

In males, the establishment of typical male sexual behavior in adulthood is linked to the occurrence of genetic sex determination and sexual differentiation processes. The genetic sex (XX or XY) and gonadal hormones determine, together, the sexual phenotype of the animal and influence the development of the central nervous system (CNS) and other systems [9]. Although the sexual maturation and reproductive function occur only after birth, the sexual differentiation processes occur essentially during embryogenesis [10]. The sexual differentiation is mediated by gonadal hormones and occurs over a limited period of perinatal development called the *critical period of differentiation* [11-13], when testosterone peaks occur, resulting in physiological, morphological, behavioral, and neuroanatomic differences in males and females [14]. In rats, this process takes place from the last third of fetal development through the first postnatal week [15,16]. The testosterone peaks occur between the 18th and 19th days of gestation [17] and between 0 hours and 2 hours after birth [18]. These moments were suggested as specific periods during which a tissue can be modified by environmental influences. Thus they are adaptive, since development cannot be influenced outside the sensitive period, protecting the animal from disruptive influences [19].

However, some factors commonly associated with these perinatal periods can interfere with sexual differentiation. Studies in our laboratory have shown that

reproductive parameters were impaired in adult rats submitted to prenatal stress [20] and prenatal corticotherapy [21-23] during the critical period of differentiation, due to a reduction or inhibition of the perinatal testosterone peaks. Impaired parameters of sexual behavior and fertility also were observed in adult rats exposed prenatally to corticotherapy [24]. It was observed that damages caused by prenatal stress were prevented by replacement with neonatal testosterone [25], corroborating the importance of neonatal testosterone surge during the sexual differentiation process of the brain. Additionally, two distinct processes determine the sexual differentiation of the CNS: defeminization, which includes the induction of anovulatory sterility and reduces the ability to perform lordosis and masculinization, which results in the capacity to perform mounts, a typically male sexual behavior [26] and the establishment of a pattern of tonic secretion of gonadotropins [15]. The masculinization process of the hypothalamus is dependent on testosterone that is metabolized to estradiol by the action of the cytochrome P450 aromatase enzyme, and acts on the central nervous system [27,28]. This conversion is crucial to sexual differentiation of the preoptic area of the hypothalamus, where the nucleus of sexual dimorphism was found [1,4,29]. This conversion is very important for activation of male sexual behavior [30,31] through stimulating estrogen-sensitive neurons by estrogen [32] and contributing to the regulatory effect of hypothalamic negative feedback on secretion of gonadotropins [33]. In spite of this, a significant decrease in the size of this nucleus was observed in males treated with flutamide pre- or postnatally, such that nucleus size resembled that of oil-treated female controls [5]. Testosterone also leads to dose-dependent effects on hypothalamic aromatase activity and numbers of aromatase-immunoreactive cells mediated via stimulating androgen receptors, which, in turn, modulate the conversion of testosterone to estradiol [34]. Furthermore, a synergistic effect of testosterone and estradiol was expressed by the proliferation of male chicken hypothalamic cells in culture [35]. These accumulated findings signal a possible role of androgens, independent of or synergistically with its conversion to estradiol, in the process of sexual hypothalamic differentiation. In this sense, the importance of a possible effect of androgens *per se* on sexual parameters is appropriately studied by using flutamide. Flutamide is a non-steroidal drug that inhibits the translocation of the androgen receptor to the nucleus from the cytoplasm of the target cells [36]. It is a powerful and specific antiandrogen utilized, among other applications, to treat prostate cancer [37]. A review

article summarized the abnormal histological changes produced in mouse testis by flutamide, showing the interference of the antiandrogen in spermatogenesis and fertility [39].

On the basis of these considerations, the aim of the present study was to investigate the long-term effects of perinatal exposure to flutamide on sexual behavior, fertility, sperm count, and sperm quality in adult male rats.

1. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocol

Wistar rats from the Central Breeding Laboratory of Sao Paulo State University (UNESP; Botucatu, Brazil) were used as the parent generation. Rats were kept in a controlled environment (temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity $55 \pm 5\%$; 12-h light–dark cycle) and had free access to regular laboratory chow and tap water. Virgin female rats were mated overnight and pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears the following morning, which was considered Day 1 of gestation (GD1). Dams were divided into two groups: a Control group, in which 4 dams received peanut oil, s.c., at GD 19 and on 5 subsequent postnatal days; and a Flutamide group, in which 4 dams received $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ of flutamide (Genix Pharmaceutical Industry Ltd., GO-Brazil) dissolved in peanut oil, s.c., at GD 19 and on 5 subsequent postnatal days.

The experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Research (Protocol n° 69/07-CEEA).

2.2. Evaluation of male sexual behavior

At 120 days of age, sexually inexperienced male descendents (10 males from the control group and 11 males from the Flutamide group) were observed under red light illumination during the dark phase of the light cycle. To evaluate sexual behavior, untreated female rats that were in natural estrus phase were used. Each male was placed into a Plexiglass cage and, after 10 min for adaptation; a receptive female was introduced into the cage. Over a period of 30 min, the following parameters were recorded: (1) latency until initiation of sexual behavior, measured, in seconds, from the

introduction of the female rat into the cage until the first mount (rapid anteroposterior pelvic thrusts[40]; or penis intromission latency (vaginal penetration; [40]); (2) ejaculation latency, the time, in seconds, from first mount or intromission until the first ejaculation (starting with an intromission but, after vaginal penetration, the male remains on the female for 1–3 s;[40]); (3) the number of intromissions until the first ejaculation; (4) the total number of mounts without penis intromission during the test.

If a male did not initiate sexual behavior at 10 min of test, the evaluation was aborted and the male was considered sexually inactive [20,25,41,42]. Moreover, males were considered sexually active if one or more sexual parameters analyzed (mount, intromission and ejaculation) were observed.

2.3. Fertility Assessment

Each male rat of both groups was housed in a large cage with two regularly cycling females. Vaginal smears were examined daily to detect the presence of spermatozoa, indicating copulation. On gestation day 21, all mated females were killed in a CO₂ gas chamber. The contents of the uterine horns were removed and the following parameters were analyzed: size of offspring, gestational index, fertility index and rates of implantation and of pre- and post-implantation losses. Gestational Index was calculated through the formula (Number of females with live fetuses/Number of females with fetuses)x100. Fertility Index was calculated through the formula (Number of females with fetuses/Number of mated females)x100. Post-implantation loss rate was calculated by the formula [(Points of implantation – Live fetuses)/Number of corpora lutea]x100. The pre-implantation loss rate was calculated through [(Number of corpora lutea - Points of implantation)/Number of corpora lutea]x100. Rate of implantation was calculated by (Points of implantation/Number of corpora lutea)x100.

2.4. Sperm quality

Spermatozoa were collected from vas deferens and diluted in 1.0ml of culture medium (Ham Nutrient F-10 Modify - Cultilab, Brazil) for evaluation of concentration, motility, vitality, and morphology. The concentration and sperm motility were analyzed in a Makler counting chamber. Sperm motility was assessed by counting both motile

and immotile spermatozoa in at least 10 separate randomly selected fields. At least one hundred spermatozoa were evaluated per 10 μ l drop in the five drops analyzed in each sample, under phase microscopy (\times 125 magnifications). Then, the proportion of sperm that exhibited flagellar activity was recorded. Sperm vitality was analyzed after survival staining with eosin Y-nigrosin. One hundred spermatozoa were classified as either colored orange-red, if the stain passed through the membrane so that the cell was considered dead, or non-stained, indicating a live cell, under the negative phase-contrast microscope (\times 400 magnification). The results were expressed as percentage of live sperm. This staining technique makes it possible to differentiate spermatozoa that are immotile but live from those that are dead. Reduced motility percentage with a high percentage of viable sperm may reflect structural or metabolic abnormalities of sperm that are derived from abnormalities in testicular function or antimotility factors in the seminal plasma [43]. For the sperm morphology, smears were prepared on histological slide, stained with hematoxylin and Shorr, and observed in a phase-contrast microscope (\times 1000 magnification). The spermatozoa were classified as normal or abnormal [43-45].

2.5. Sperm Count

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) and sperm in the caput/corpus epididymis and cauda epididymis were enumerated; the right testis, decapsulated and weighed soon after collection, was homogenized in 5ml of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5%, followed by sonication for 30s [45]. After a 10-fold dilution the sample was transferred to Neubauer chambers (four fields per animal), followed by a count of mature spermatids. Daily sperm production (DSP) was determined by dividing the total number of homogenization-resistant spermatids per testis by 6.1, which is the number of days of a seminiferous cycle that these spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymidis portions were cut into small fragments with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis. The transit times through the caput/corpus epididymis and cauda epididymis were calculated by dividing the number of sperm within each of these portions by the DSP.

2.6. Testosterone Plasma Level

At adult life, blood from the abdominal aorta was collected, centrifuged (2500 rpm for 20 min at 2 °C), and the plasma stored at -20 °C until assayed. Plasma hormone level was measured by eletroquimioluminescence. Twenty different samples, ten from Flutamida group and ten from Control group, were analyzed.

2.7. Statistical Analysis

The medians (IQ25% - IQ75%) values were compared by two-tailed Mann-Whitney nonparametric test. The Mean±S.D. values were compared by t Welch Correted test. The data expressed as pure proportions were compared by Fisher's Exact test. Differences between groups were considered significant if $P < 0.05$.

2. Results

Perinatal treatment with flutamide led to a significant reduction in the efficacy of the sexual behavior. The animals treated with flutamide showed increases in latency until initiating copulatory behavior, number of mounts without penis intromission, number of intromissions until first ejaculation, latency to first ejaculation, and a reduced number of ejaculations (Table 1).

The fertility parameters were significantly impaired by perinatal treatment with flutamide. Untreated females mated with males from the Flutamida group had a decreased implantation rates and a reduced litter size (Table 2). There was no variation in the number of corpora lutea, dead fetuses (data not shown), and resorption sites (Table 2). Post-implantation loss rates were not altered, but there was a significant increase in the number of pre-implantation losses among untreated female rats mated with male rats from the Flutamida group (Fig.1). Furthermore, the Flutamida group displayed a decrease in the fertility index but no alteration in the gestational index (Table 2).

The sperm quality assessment revealed a reduced sperm concentration in semen collected from vas deferens of rats in the Flutamida group (63.0 [58.2 – 69.3]; $p < 0.01$) in comparison with the Control group (81.3 [79.3 – 84.8]). Additionally, a reduced percentage of normal form spermatozoa was also observed, even though the live and progressive (mobile) spermatozoa percentages remained unaltered (Fig.2).

As shown in Table 3, the perinatal flutamide treatment decreased the testicular spermatid number, epididymal sperm number, and daily sperm production (DSP), however, no alteration was observed in the sperm transit time through caput/corpus and cauda of the epididymis in the Flutamide group.

Reduced level of testosterone was observed in animals of Flutamide group (101.63 ± 56.43), when compared with Control group values (319.04 ± 158.37) by t test Welch Corrected ($p < 0,01$).

3. Discussion

High levels of testosterone during specific moments of perinatal life are critical for the process of hypothalamic sexual differentiation in the male. The later repercussion of the androgen blockade, imposed during perinatal life, on the installation of typically male sexual behavior, as well as on the male fertility parameters during adulthood was studied. The administration of the antiandrogen flutamide during the perinatal phase impaired male sexual behavior. These treated animals displayed delayed initiation of copulation, which may be due, among other factors, to the low serum testosterone observed in adulthood. It is known that the display of copulatory behavior by male mammals is dependent on testicular hormones acting on the brain [46] and that olfactory information influences male and female sexual behavior [47]. The female pheromones induce augmentation of circulating testosterone levels [48] and changes in behavioral responses through the activation of related neural pathways [49] in adult male rats. Thus, the reduced testosterone level in treated males would lead to an inefficient olfactory perception, resulting in slowed start of copulation. In the present study, the fact that these animals performed a greater number of mounts without intromission indicates unsuccessful penile intromissions, thus interfering in the number of penile intromission needed for ejaculation. A prior study found that 43% of male mice treated with flutamide (GD15-17) presented hypospadias [50]; however, this damage was not observed in the rats of the current study. In this sense, the pattern of sexual behavior in treated animals was similar to those submitted to prenatal flutamide with normal genitalia. The reduced number of ejaculations observed in treated males of the current study corroborates the findings from prenatal treatment with flutamide from GD12 until birth [51].

It has been found in our laboratory that perinatal manipulations, by interfering with the normal display of male sexual behavior in adulthood were due to decreasing the testosterone level during perinatal life, as well as to the dynamics of this hormone. Similarly, this alteration may be occurring in the present study. Thus, male rats submitted to prenatal stress showed a longer latency until mount or intromission as well as reduced number of ejaculations [20], whereas male rats exposed to prenatal corticotherapy presented fewer mounts and a higher percentage of sexually inactive animals [24]. It appears that a normal pattern of male sexual behavior is directly related to physiological testosterone levels, as found in adult control animals of the current study. Additionally, the altered male sexual behavior observed in the current study probably was not associated with conversion of testosterone to dihydrotestosterone. This hypothesis is supported by results shown by Ribeiro and Pereira [52], who observed an unaltered male sexual behavioral pattern in rats exposed to 5-alpha-reductase-2 inhibitor.

Since the plasma testosterone level was reduced in adult treated rats from the present study, we inferred that this hormone had also been reduced at puberty. At puberty steroidal hormones activate sex-specific endocrine and behavioral responses organized during development [53]. Thus, this reduction would interfere with the activation process of reproduction structures in these animals during this critical phase. Coherently, in the current study, impairments arising from perinatal treatment were observed after puberty, namely, during adult reproductive life.

Despite the importance of testosterone to estradiol conversion, brain areas involved in male sexual behavior contain androgen-sensitive neurons, estrogen-sensitive neurons and neurons sensitive to both hormones [54]. Thus, testosterone *per se* seems to act both alone and synergistically with its metabolite estradiol. Thus, the treatment probably impaired the stimulation of pathways mediated by androgen receptors, but we cannot discard the idea that these pathways may be associated with the process of conversion to estradiol.

In the current study the animals treated perinatally with flutamide were not only inefficient in carrying out the typical male mating behavior, they were also inefficient at producing descendants. Over 50% of untreated females mated (slides of vaginal smears with sperm cells and typical estrus cells) with males of the Flutamide group had not produced pups on the day of exploratory laparotomy. This finding of a fertility rate

below 50% reveals how the sperm of animals treated with the antiandrogen were inefficient at fertilizing ova of receptive females. Female rats mated with males of the Flutamide group had abnormal pregnancies, as expressed by their higher pre-implantation loss rates and reduced implantation rates which, consequently, resulted in a diminished number of pups left per litter. Low fertility (rates 24% reduced) and elevated pre-implantation loss rates were also found in our laboratory in male rats treated prenatally with letrozole [30]. These data show that androgen blockade was more deleterious than aromatase inhibition to the organizational process of fertility (48.3%) as well as to pre-implantation loss. It was evident that the animals submitted to androgen blockade were ineffective at producing descendants. Thus, in the present study we observed multiple pieces of evidence that prenatal testosterone contributed to fertility organization that can occur within a specific time window. The unchanged capacity to leave descendants of male rats treated with flutamide at precedent period (GD8-15) supported this hypothesis [55]. Additionally, the post-implantation loss rates were shown to be unchanged in the present study, as were the number of resorption sites, dead fetuses or fetuses in lysis (data not shown). Thus, the perinatal treatment with flutamide apparently did not inhibit the development of embryos. Given the unaltered gestational index shown by the fact that all females that had undergone pregnancy termination showed all fetuses alive at the time of exploratory laparotomy, the treatment with flutamide was probably not toxic to the fetuses.

On the other hand, the ineffectiveness at leaving descendants was, at least in part, due to low sperm quality confirmed by the sperm analysis. The association between infertility and reduced sperm quality [56] was corroborated by the results of the current study. The reduced sperm concentration and increased percentage of abnormal sperm found in semen collected from the vas deferens of flutamide-treated male rats probably contributed to the low fertility observed in the current study. These impairments probably were responsible for the increased pre-implantation loss rates observed in normal females mated with flutamide-treated males. The sperm count also revealed a reduction in daily sperm production (DSP) in the testes of the experimental animals treated with flutamide, which explains the low sperm concentration found in semen collected from the lumen of the vas deferens. The reduction in DSP, consequently, led to reduction in sperm count of the body-head and tail parts of the epididymis. However, the sperm transit time did not differ between the groups. This finding indicates that the

maturation of the sperm, while passing through the epididymis, probably was not affected. Thus, the morphological abnormalities found in spermatozoa during the sperm quality analysis are probably not due to damage in this parameter. In general, sperm cell count is positively correlated with Sertoli cell count [57]. Thus, DSP reduction observed in the present study may have resulted from the diminished number of Sertoli cells in testes. Additionally, the apoptotic process appears to be also a strong candidate as a critical factor in spermatogenesis, reflecting the sperm quality and sperm counts. In this sense, the hypospermatogenesis observed in the testes of adult rats exposed to flutamide (GD6 until birth) was associated with the chronic germ cell apoptotic process and with increased expressions of caspase-3 and -6 as well as their activation in germ cells [58]. Changes in the maturation process of Sertoli cells and increased germ cells apoptosis in adult male rats exposed to flutamide (GD10 until birth) were also observed [59]. These data could explain the reduced DSP observed in flutamide-treated animals in the current study. On the other hand, flutamide administration at middle pregnancy produced no changes in sperm quality or spermatogenesis in testes [55]. Thus, the damage associated with perinatal flutamide exposure suggests that the testosterone contributes to fertility organization during later intrauterine life.

Thus, the results of the current study indicated that the prenatal moment investigated can be considered within a sensitive period in relation to testosterone action on the brain during organization of male sexual behavior, as well as on organization of spermatogenesis. The androgen blockade during this time window irreversibly impaired copulatory behavior and damaged the sperm quality and count, resulting in low capacity for producing descendants.

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Financial support was provided by a fellowship from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, at Carina Leonelli (Proc. nº 07/57521-1). This work constituted part of the MSc Thesis presented to UNESP, in 2009, by Carina Leonelli.

References

- [1] Lauber M.E, Sarasin A, Lichtensteiger W. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *Steroid Biochem Molec Biol* 1997;61(3-6):359-64.
- [2] Naghdi N, Nafisy N, Majlessi N. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. *Brain Res* 2001;897:44-51.
- [3] McGinnis YM, Yu AW. Age-related Changes in Androgen Receptor Levels in Cranial Nerve Nuclei of Male Rats. *Brain Res Bull* 1995;36(6):581-5.
- [4] Rhees RW, Al-Saleh HN, Kinghorn EW, Fleming DE, Lephart ED. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed males rats. *Brain Res Bull* 1999;50(3):193-9.
- [5] Lund TD, Salyer DL, Fleming DE, Lephart DE. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Develop Brain Res* 2000;120:261–6.
- [6] Gray Jr. LE, Ostby JS, Kelce WR. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide Vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol and Appl Pharmacol* 1994;129:46-52.
- [7] Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg, JG, Gray Jr LE. An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav* 2003;79:151-56.
- [8] Metzdorff SB, Dalgaard M, Christiansen S, Axelstad M, Hass U, Kiersgaard M K, Scholze M, Kortenkamp A, Vinggaard AM. Dysgenesis and Histological Changes of Genitals and Perturbations of Gene Expression in Male Rats after In Utero Exposure to Antiandrogen Mixtures. *Toxicol Sci* 2007;98(1):87–98.
- [9] Prince KN, Prince JS, Kinghorn E.W, Fleming DE, Rhees RW. Effects of sexual behavior manipulation on brain plasticity in adult rats. *Brain Res Bull* 1998;47:349-55.
- [10] Parker KL, Schedl A, Schimmer BP. Gene interactions in gonadal development. *Ann Rev Physiol* 1999;61:417-33.
- [11] Lee VWK, De Kretser DM, Hudson B. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil* 1975;42(1)121-6.

- [12] Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 1978;103:1985-91.
- [13] Gogan F, Slama A, Bizzini-Koutznetzova B. Importance of perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat. *J Endocrinol* 1981;91:75-9.
- [14] McCarthy MM, Davis AM, Mong JA. Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Res Bull* 1997;44:487-95.
- [15] Maclusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981;211:1294-303.
- [16] Montano MM, Welshons WV, Vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol fetal and sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod* 1995;53:1198-207.
- [17] Ward IL, Weisz J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 1980;207:328-9.
- [18] Corbier P, Edwards, DA, Roffi, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochem Bioph* 1992;100:127-31.
- [19] Knickmeyer RC, Baron-Cohen S. Fetal testosterone and sex differences. *Early Hum Develop* 2006;82:755-60.
- [20] Gerardin DCC, Pereira OCM, Kempinas WG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav* 2005;84:97-104.
- [21] Pereira OCM, Piffer RC. Puberty installation and adrenergic response of seminal vesicle from rats exposed prenatally to hidrocortisone. *Life Sci* 2005;77:1381-90.
- [22] Piffer RC, Garcia PC, Gerardin DCC, Kempinas WG, Pereira OCM. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. *Reprod Fertil Develop*, 2009;21:634–9.
- [23] Piffer RC, Garcia PC, Pereira OCM. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. *Physiol Behav* 2009;98:163–7.
- [24] Pereira OCM, Arena AC, Yasuhara F, Kempinas WG. Effects of prenatal hydrocortisone acetate exposure on fertility and sexual behavior in male rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2003;38:36-42.

- [25] Pereira OCM, Bernardi MM, Gerardin DCC. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? *Life Sci* 2006;78:2767-71.
- [26] McEwen BS. Sexual maturation and differentiation: the role of the gonadal steroids. *Prog Brain Res* 1978;8:291-307.
- [27] Rhoda J, Cobier P, Roffi J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 β -estradiol. *Endocrinology* 1984;114:1754-60.
- [28] Erskine MS, Tobet S, Baum MJ. Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity, and hypothalamic estradiol in male and female ferrets. *Endocrinology* 1988;122:524-30.
- [29] McGinnis MY, Williams GW, Lumia AR. Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area of hypothalamus, but not amygdala or septum. *Physiol Behav* 1996;60(3):783-9.
- [30] Gerardin DCC, Pereira OCM. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:301-5.
- [31] Gerardin DCC, Piffer RC, Garcia PC, Moreira EG, Pereira OCM. Effects of maternal exposure to an aromatase inhibitor on sexual behaviour and neurochemical and endocrine aspects of adult male rat. *Reprod Fertil Develop* 2008;20:557-62.
- [33] Balthazart J, Ball GF. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 1998;21:243-9.
- [34] Beyer C, Green SJ, Hutchison JB. Androgens Influence Sexual Differentiation of Embryonic Mouse Hypothalamic Aromatase Neurons in Vitro. *Endocrinology* 1994;135(3):1220-6.
- [35] Cao A, Zhang C. Sex-specific effects of androgen and estrogen on proliferation of the embryonic chicken hypothalamic neurons. *Endocrine* 2007;31(2):161-6.
- [36] Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P. Antineoplastic Agents. In : Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics*, New York: McGraw-Hill; 2001, p. 1442.
- [37] Boccon-Gibod L, Fournier G, Bottet P, Marechal JM, Guiter J, Rischman P et al. Flutamide versus orchidectomy in the treatment of metastatic prostate carcinoma. *Eur Urol* 1997;32(4):391-5;discussion 395-6.

- [38] Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Repr Toxicol* 2008;25:139–43.
- [39] Agmo A. male rat sexual behavior. *Brain Res* 1997;1(2):203-9.
- [40] Gerardin, DCC, Bernardi MM, Moreira EG, Pereira, OCM. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:618-23.
- [41] Oliva SU, Messias AG, Silva DAF, Pereira OCM, Gerardin DCC, Wilma WG. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod Toxicol* 2006;22:599-60.
- [42] World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4rd ed. Australia: Cambridge University Press; 1999.
- [43] Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 1992;6:491-505.
- [44] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DN, Wise LD. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* 1996;10:237-44.
- [45] Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CD, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007;23:106-12.
- [46] Harding SM, McGinnis MY. Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. *Physiol Behav* 2004;81:671-80.
- [47] Cavalcante JC, Bittencourt JC, Elias CF. Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. *Physiol Behav* 2006;88:160–6.
- [48] Macrides F, Bartke A, Dalterio S. Strange females increase plasma testosterone levels in male mice. *Science* 1975;189:1104–6.
- [49] Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 2003;70:245–318.
- [50] Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Mogami M, Sasaki S, Kohri K. Spermatogenesis, fertility and sexual behavior in a hypospadiac mouse model. *J Urol* 2002;167:1532-37.

- [51] Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum M J, Bakker J, Paredes R G. Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 2002;75:337–46.
- [52] Ribeiro CM, Pereira OMC. 5alpha-reducyase 2 inhibition impairs brain defeminization of male rats: Reproductive aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;82:228-35.
- [53] Abdelnabi MA, Ottinger MA. Hypothalamic indolamines during embryonic development and effects of steroid exposure. *Gen Comp Endocrinol* 2003;130, 13–9.
- [54] Grèco B, Edwards DA, Zumpe D, Clancy AN. Androgen receptor and mating-induced Fos immunoreactivity are co-localized in limbic and midbrain neurons that project to the male rat medial preoptic area. *Brain Res* 1998;781:15-24.
- [55] Inawaka K , Kawabe M, Takahashi S, Doi Y, Tomigahara Y, Tarui H, Abe J, Kawamura S, Shirai T. Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:178–87.
- [56] Overstreet JW, Katz DF. Semen analysis. *Urol Clin North Am* 1987;14:441-9.
- [57] Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122:787-94.
- [58] Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, Bars,R, Benahmed M. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 2003;144:648–61.
- [59] Bebrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A, Tronchon V, Florin A, Friry C et al. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J Endocrinol* 2008;196(1):21-31.

*Tables***Table 1.** Sexual behavior performance of adult control rats and rats exposed perinatally to flutamide.

Parameters	Male Sexual Behavior	
	Experimental groups	
	Control (n=10)	Flutamide (n=10)
Active Animals	70.0%	72.7%
Latency to 1 st mount or intromission	32.0 (28.5 – 44.5)	151.0* (102.5 – 285.0)
Number of intromissions until 1 st ejaculation	17.0 (12.0 – 21.0)	34.5** (28,8 – 45,8)
Latency to 1 st ejaculation	249.0 (225.5 -367.5)	647.0* (556.0 – 738.0)
Latency to 1 st post-ejaculation intromission	272.0 (258.0 – 328.5)	268.0 (236.8 – 306.8)
Number of post-ejaculation intromissions	11.0 (10.0 – 12.5)	16.0 (11.0 – 20.3)
Number of mounts without intromission	0.0 (0.0 – 0.0)	7.5*** (6.0 – 9.5)
Total number of ejaculations	3.0 (3.0 – 3.5)	0.5** (0.0 – 1.5)

Values expressed as median (IQ25%-IQ75%), Mann-Whitney *U*-test or percentage, Fisher's Exact test for proportion comparison.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Table 2: Corpora lutea, offspring size, resorption and implantation sites, gestational index, and fertility index observed in untreated female rats mated with control males and with those exposed perinatally to flutamide.

Parameters	Fertility Assessment	
	Experimental groups	
	Control	Flutamide
Corpora lutea	13.0 (13.0-15.0)	14.5 (10.0-15.0)
Resorption site	1.0 (0.0-1.0)	1.0 (0.0-1.5)
Points of Implantation	13.0 (12.0-13.5)	4.0 (3.0-9.5)*
Offspring size	13.0 (11.0-13.0)	3.0 (2.0-8.5)*
Rate of Implantation (%)	93.8 (88.5-100.0)	33.0 (17.5-58.0)**
Fertility Index (%)	95.0	46.7*
Gestational Index (%)	100.0	100.0

Values expressed as median (IQ25%-IQ75%), Mann-Whitney *U*-test or percentage, Fisher's Exact test for comparison of proportions.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. N=10 males/group (2 females/male).

Table 3: Sperm count, daily sperm production (DSP) and sperm transit time in experimental rats of Control and Flutamide groups.

Sperm Count and Transit Time				
Parameters		Experimental Groups		
		Control (n=10)	Flutamide (n=9)	
Testis	Spermatid number ($10^6/g$)	124.6 (110.5 - 128.1)	117.3 * (101.4 - 120.6)	
	DSP (n° spermatids x $10^6/testis$ per day)	30.5 (26.8 - 31.8)	27.3 * (24.3 - 27.8)	
Epididymis	Caput- Corpus	Sperm number ($10^6/g$)	395.0 (365.0 - 443.8)	295.0 *** (291.3 - 305.0)
		Transit time (days)	4.3 (3.8 - 5.5)	4.0 (3.6 - 4.8)
	Cauda	Sperm number ($10^6/g$)	753.8 (733.1 - 751.9)	637.5 ** (590.0 - 695.0)
		Transit time (days)	6.2 (5.5 - 7.4)	6.4 (5.5 - 6.7)

Values expressed as median (IQ25%-IQ75%), Mann-Whitney *U*-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

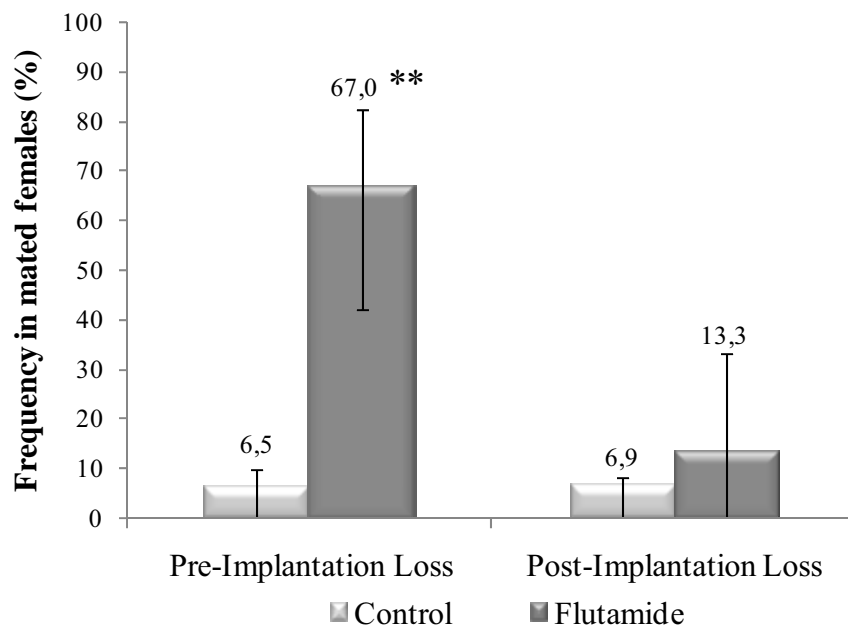


Fig.1. Frequency of untreated female rats that showed pre- and post-implantation losses when mated with male rats from Control or Flutamide groups.

Values expressed as median (IQ25%-IQ75%), Mann-Whitney *U*-test ** $p < 0.01$, $n = 10$ males/group (2 females/male).

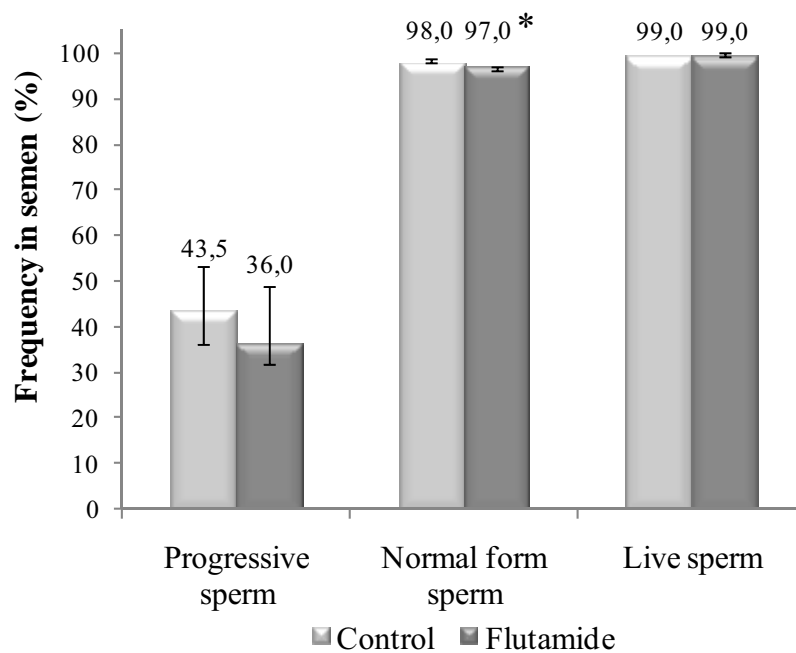


Fig.2. Frequency of progressive sperm and normal form sperm of semen collected from vas deferens of male rats of Control and Flutamide experimental groups. Values expressed as median (IQ25%-IQ75%), Mann-Whitney *U*-test, * $p < 0.05$ of 10 males/group.