

Elisângela Martins dos Santos

Alteração na expressão das enzimas 3 β -HSD e aromatase nos testículos de ratos adultos submetidos a exposição crônica ao herbicida atrazina, seguida de um período de recuperação.

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho de 2013

Elisângela Martins dos Santos

Alteração na expressão das enzimas 3 β -HSD e aromatase nos testículos de ratos adultos submetidos a exposição crônica ao herbicida atrazina, seguida de um período de recuperação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientadora: Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira.

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho de 2013

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira, e contou com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CNPq/MAPA-Edital 64) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Todo fazer leva a um novo fazer: é o círculo cognitivo que caracteriza o nosso ser, num processo cuja realização está imersa no modo de ser autônomo do ser vivo.” Maturana e Varela

*À minha querida família, a qual eu devo toda gratidão.
Jamais esquecerei tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e saúde a mim concedida para chegar até aqui.

Aos meus pais, irmãos, cunhados (as), queridos sobrinhos, pessoas amáveis com as quais sei que sempre poderei contar.

À família Barbosa (Dona Sônia, Dedê, Carlim, Pri, Rick e Henrique), obrigado pelo incentivo e momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao Éder Barbosa, pelo carinho, cumplicidade, companheirismo, por me propiciar e compartilhar bons momentos, idem pra você: *“é bom ter motivos para sorrir durante os dias”*.

A minha orientadora Dr.^a Cleida Aparecida de Oliveira, por acreditar, incentivar e me ensinar a fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Germán Arturo Bohórquez Mahecha pelos sábios ensinamentos e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do LABRE, por toda ajuda e convivência. Ao André, Mônica e Regiana que me ensinaram muito do que sei hoje no laboratório. Em especial ao Cris e a Polly que participaram ativamente na execução do projeto atrazina, sem os quais não teria sido possível dar continuidade a este projeto.

No decorrer deste trabalho contei com a ajuda e o apoio de muitas pessoas, dentre elas o Prof. Dawidson Assis Gomes, Mariana Brandão, Carolina Carvalho. A essas e outras pessoas não citadas, porém lembradas, meu: Muito Obrigado!

A querida Luciana Allain por me iniciar no encantador mundo da pesquisa.

Aos meus bons e velhos amigos, Lili, Dislane, Josi, Vânia, Érica, César, Cris, Dani, Duda, Marli, Lucy, pessoas que nem sempre estão por perto, mas que sempre vou lembrar com carinho.

Ao professor José Carlos Nogueira, pela alegria e exemplo de pesquisador que entusiasma.

Aos alunos do programa de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial a Sílvia Amaral, Patrícia Auler, Thaís da Mata... Obrigado pelos conselhos e incentivos em momentos de desesperança.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular por contribuírem para minha formação.

Obrigado a todos que junto comigo vibram por mais essa conquista!

RESUMO

Atrazina é um componente ativo de herbicidas, considerado um potente desregulador endócrino, que causa diversas desordens reprodutivas em machos. O mecanismo de ação de atrazina não está completamente determinado, mas estudos *in vitro* mostraram que atrazina induz a expressão de RNAm e atividade de aromatase, a enzima que converte andrógenos em estrógenos. Em adição, foi demonstrado *in vivo* o impacto negativo de atrazina na expressão da enzima esteroideogênica 3 β -HSD nos testículos. Apesar da gravidade, não se sabe se os efeitos de atrazina sobre a reprodução masculina são reversíveis ou permanentes, sendo esse o objetivo do presente estudo. Adicionalmente, avaliou-se, em um modelo *in vivo*, se atrazina causa alterações também nos níveis proteicos de aromatase. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, que receberam atrazina em dose diária de 200mg/Kg de atrazina durante 7, 15 e 40 dias, por via oral. Parte dos animais tratados por 40 dias foi submetida a um período de 75 dias para recuperação da exposição ao herbicida. Os resultados revelaram alterações na morfologia e redução de 3 β -HSD testicular a partir de 7 dias de exposição, enquanto alterações na expressão de aromatase foram mais tardias. As alterações incluíram aumento transitório do peso testicular, dilatação luminal e atrofia testicular. A atrofia testicular e redução de 3 β -HSD foi mais marcante após 75 dias de interrupção da exposição ao herbicida, sugerindo que seus efeitos são prolongados e irreversíveis. O presente estudo acrescenta informações importantes, sobre os efeitos adversos desse herbicida como potente desregulador endócrino.

Palavras-chave: Atrazina, testículo, desregulador endócrino, 3 β -HSD, aromatase.

ABSTRACT

Atrazine is the active compound of herbicides, considered as a potent endocrine disruptor, causing various reproductive disorders in males. The mechanism of action of atrazine is not completely determined, but *in vitro* studies have demonstrated that atrazine induces the RNA expression and activity of aromatase, the enzyme that converts androgens to estrogens. In addition, was demonstrated *in vivo* the negative impact of atrazine in the expression of the steroidogenic enzyme 3 β -HSD in the testis. In spite of the seriousness, it is not known whether these effects of atrazine on male reproduction are permanent or transient, the main goal of the present study. Additionally, we intend to evaluate, in an *in vivo* model, atrazine was also cause changes in the protein levels of aromatase. Were used male Wistar rats, adult, which were treated with atrazine at the dosage of 200mg/Kg for 7, 15 or 40 days. Part of the animals treated for 40 days were subjected to a period of 75 days for recovery from exposure to the herbicide. The results showed changes were observed in the morphology and reduced 3 β -HSD from 7 days of exposure, while changes in the expression of aromatase occurred later. Changes included transient increase in testicular weight, testicular atrophy and luminal dilation. Testicular atrophy and the reduction of 3 β -HSD was more marked after 75 days of cessation of exposure to the herbicide, suggesting that the effects of atrazine are extended in the testes and irreversible. In short, this study adds important information on the adverse effects of this herbicide as a potent endocrine disrupter.

Keywords: Atrazine, testes, endocrine disruptors, 3 β -HSD, aromatase.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1	Sistema Genital Masculino	2
2	Testículo	2
2.1	Estrutura	2
2.2	Espermatogênese	4
2.3	Controle Hormonal da Espermatogênese	5
3	Esteroidogênese	7
3.1	Enzima 3 β -HSD	10
3.2	Enzima Aromatase	11
4	Desreguladores Endócrinos	12
5	Atrazina	13
II.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	16
1	Justificativa	17
2	Objetivo Geral	18
2.1	Objetivos específicos	18
III.	METODOLOGIA	19
1	Animais	20
2	Tratamento	20
3	Sacrifício dos animais	21
4	Preparação histológica	21
5	Documentação fotográfica e morfometria	21
6	Imunohistoquímica	22
7	Western blotting	23
8	Análise estatística	24
IV.	RESULTADOS	26
1	Peso Corporal e Testicular	27
2	Morfologia Testicular	28
3	Detecção de 3 β -HSD	31
4	Detecção de Aromatase	33
V.	DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	35
VI.	PERSPECTIVAS	40
	REFERÊNCIAS	43

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 Sistema Genital Masculino

O sistema genital masculino de mamíferos é responsável pela produção contínua, nutrição e estocagem temporária dos espermatozoides, além de sua veiculação até as vias genitais femininas. Esse sistema é constituído pelos testículos, vias espermáticas, glândulas sexuais anexas e órgão copulador, o pênis (Setchell e Breed, 2006).

Os testículos são responsáveis tanto pela produção de espermatozoides quanto pela produção de andrógenos, que são essenciais para a manutenção da fertilidade masculina (Russel e França, 1995). Além disso, os testículos produzem quantidades consideráveis de estrógenos, sendo uma das principais fontes desse esteroide nos machos (Carreau et al., 2003).

As vias espermáticas compreendem os túbulos retos, rede testicular, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes e uretra, por onde os espermatozoides produzidos nos testículos são transportados até as vias genitais femininas, durante a cópula. Durante o trânsito através do epidídimo, os espermatozoides sofrem maturação e adquirem motilidade progressiva e capacidade para fertilizar o ovócito (Cornwall, 2009).

As glândulas sexuais anexas incluem a próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais, órgãos responsivos a andrógenos, cuja função é a produção dos constituintes do plasma seminal, importante para nutrir e manter os espermatozoides (Mann, 1974). O plasma seminal funciona ainda como um meio pelo qual os gametas masculinos serão conduzidos até as vias genitais femininas (Setchell e Breed, 2006).

2 Testículo

2.1 Estrutura

O testículo corresponde à gônada masculina, com função exócrina e endócrina, produzindo tanto os espermatozoides quanto hormônios, dentre eles, os andrógenos que servem para manter a função reprodutiva e as

características sexuais secundárias (Russel, 1990; Russel e França 1995). O testículo produz também estrógenos a partir da aromatização de andrógenos (Carreau, 2003; Hess, 2003).

O testículo é envolto por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea, da qual partem septos fibrosos para o interior do parênquima testicular, dividindo o órgão em lóbulos. Morfologicamente, o parênquima testicular constitui-se do compartimento dos túbulos seminíferos e o compartimento intertubular ou intersticial (Russel, 1990; Kerr et al., 2006).

O compartimento dos túbulos seminíferos não é innervado nem vascularizado e constitui a maior parte do órgão na maioria das espécies. Cada túbulo seminífero é constituído pela túnica própria e epitélio seminífero, delimitando o lúmen tubular (Russel, 1990; Kerr et al., 2006). A túnica própria possui uma ou mais camadas de células mióides contráteis, dependendo da espécie, e material intercelular, incluindo fibras colágenas e elásticas e substância fundamental amorfa (Bustos-Obregon, 1976; Dym, 1987; Christl, 1990). O epitélio seminífero é constituído por camadas concêntricas de células germinativas associadas a um único tipo de célula somática, a célula de Sertoli (Hess e França, 2008). As células germinativas se desenvolvem em estreita interação com as células de Sertoli que desempenham um importante papel na regulação da espermatogênese (Russel et al., 1993; Skinner e Anway, 2005).

As células de Sertoli exercem funções especializadas, a maioria das quais estão relacionadas à manutenção, proliferação e diferenciação das células germinativas. Dentre essas funções destaca-se o suporte e nutrição das células, liberação de espermátides maduras para o lúmen do túbulo seminífero, secreção do fluido testicular e de proteínas, como a proteína de ligação a andrógenos (ABP) e inibina, dentre outras, além de fagocitose das células germinativas em degeneração e corpos residuais, resultantes da espermiogênese (Russel, 1998). Destaca-se ainda a compartimentalização do túbulo seminífero estabelecida por junções de oclusão que unem as células de Sertoli entre si, formando a barreira de célula de Sertoli, que proporciona um ambiente protegido e especializado para as células germinativas (Hess e França, 2008). A célula de Sertoli é ainda uma célula chave que medeia as ações do hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona (Russel, 1998).

No compartimento intertubular são encontradas as células de Leydig, associadas a vasos sanguíneos e linfáticos, que são essenciais para o transporte de hormônios e nutrientes no testículo, além de fibras e células de tecido conjuntivo, especialmente macrófagos e ocasionalmente mastócitos (Russel, 1998). A célula de Leydig possui abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, os quais contêm as enzimas associadas à síntese de esteroides (Russel, 1990), como a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), responsável por várias etapas na via esteroidogênica, incluindo a síntese de androstenediona, precursora da testosterona (Simard, 2005).

A testosterona produzida pelas células de Leydig é fundamental durante o desenvolvimento fetal, para a diferenciação sexual masculina, e pós-natal, para a iniciação e manutenção da espermatogênese, além da expressão de características sexuais masculinas secundárias (Payne e Youngblood, 1995; Contreras et al., 2007).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo biológico complexo de transformação celular para produção de células haplóides ou gametas masculinos a partir de células germinativas diplóides, as células-tronco espermatogoniais (Hess e França, 2008). Consiste de um processo cíclico e altamente organizado em que células germinativas imaturas proliferam, sofrem meiose e diferenciação para dar origem a espermátides haplóides (O'Donnell et al., 2001). Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos, em estreita associação com as células de Sertoli. Quando o desenvolvimento das células germinativas é concluído, as espermátides maduras são liberadas já como espermatozoides no lúmen dos túbulos, e prosseguem através da rede testicular, até entrar no epidídimo através dos ductos eferentes. Durante a passagem ao longo do epidídimo, os espermatozoides sofrem uma série de alterações bioquímicas, em um processo chamado de maturação, para se tornarem capazes de fertilização (O'Donnell et al., 2001).

O processo de espermatogênese nos mamíferos é composto de três fases distintas, baseado em características morfológicas e funcionais: (a) fase

proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por uma série de divisões mitóticas; (b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual as espermatogônias já comprometidas com a diferenciação formam os espermatócitos primários que iniciam a primeira divisão meiótica, formando os espermatócitos secundários, que em seguida sofrem a segunda divisão meiótica, formando as espermátides arredondadas; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermátides arredondadas sofrem modificações morfológicas originando células especializadas para a fertilização, os espermatozoides (Sharpe, 1983; Russel, 1990).

2.3 Controle Hormonal da Espermatogênese

A iniciação e manutenção da espermatogênese requerem a secreção de gonadotrofinas, LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante), a partir da hipófise, em resposta ao GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), o qual é produzido por neurônios do hipotálamo (Fig.1). O GnRH tem sua liberação controlada por kisspeptinas, peptídeos que atuam como ligantes naturais para o receptor órfão acoplado a proteína G (Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003), conhecido como gpr-54 em ratos (Lee et al., 1999) e AXOR12 em humanos (Muir et al., 2001). As kisspeptinas atuam no *feedback* positivo e negativo do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (Navarro et al., 2004; Smith et al., 2005; Roa et al., 2009). Através de *feedback* positivo estimulam a secreção de LH (Navarro et al., 2004), e ainda medeiam o *feedback* negativo de testosterona sobre a secreção de GnRH (Smith et al., 2005).

As células de Leydig estimuladas pelo LH sintetizam a testosterona, considerado o principal hormônio para o controle da espermatogênese, sendo essencial para a iniciação e manutenção desse processo, além de exercer efeito *feedback* negativo na liberação de LH e GnRH (RUSSEL, 1990).

As células de Sertoli possuem receptores para o FSH e testosterona, que são os principais reguladores hormonais da espermatogênese. Estimuladas pelo FSH, essas células secretam glicoproteínas que são essenciais para o sucesso da espermatogênese, tal como a proteína de ligação a andrógenos (ABP), que é responsável pelo transporte e proteção de

andrógenos contra a degradação, facilitando sua concentração nos testículos e sua veiculação pelas vias genitais masculinas (Bardin et al., 1981; Sofikitis et al., 2008). Produzem ainda inibina e ativina, sendo que a ativina estimula a produção de FSH, enquanto a inibina exerce efeito *feedback* negativo na liberação de FSH (Ling et al., 1986; Robertson et al., 1986).

A ação de *feedback* negativo dos andrógenos sobre a secreção de gonadotrofinas pode ocorrer de forma direta, mediada pelos receptores de andrógenos, ou indireta, mediada pela aromatização de andrógenos à estrógenos. As ações fisiológicas dos estrógenos são mediadas por proteínas intracelulares específicas, denominadas receptores de estrógenos (ER), com dois subtipos: receptor de estrógeno alpha (ER α) e receptor de estrógeno beta (ER β), os quais são predominantemente nucleares (Carreau e Hess, 2010). No testículo, ER β é o receptor mais abundante sendo encontrado nas células peritubulares mióides, nas células intersticiais de Leydig, células de Sertoli e em células germinativas com exceção de espermatídes alongadas, mas principalmente em espermatócitos (Saunders et al., 2001). Em contrapartida ER α é encontrado somente em células de Leydig e algumas células peritubulares mióides (Fisher et al., 1997; Carreau e Hess, 2010).

A atividade de estrógenos na espermatogênese envolve a indução da proliferação de células germinativas, diferenciação e maturação final de espermatídes, bem como a regulação da sobrevivência e inibição de apoptose das células germinativas. As etapas finais da maturação de espermatídes são particularmente sensíveis e dependentes de estrógenos (Carreau e Hess, 2010).

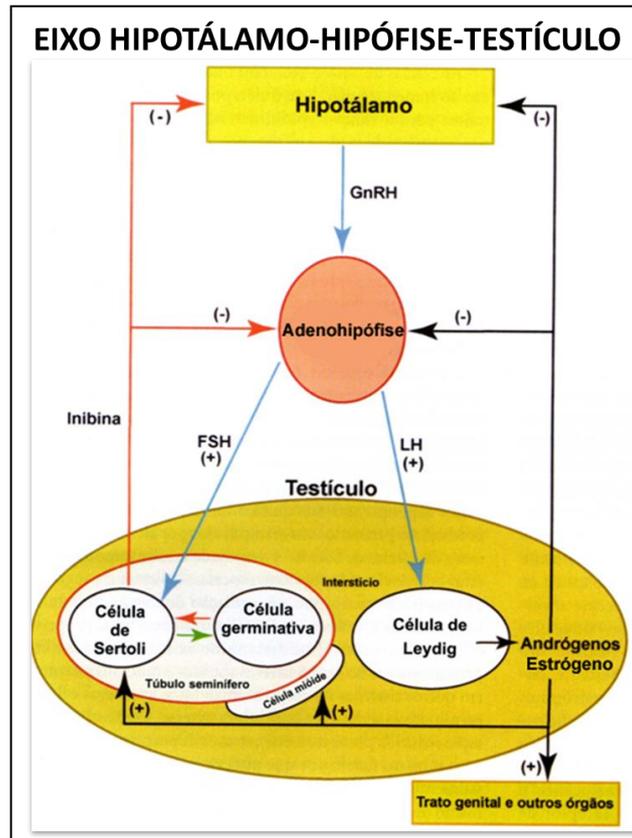


Figura 1: Representação esquemática do eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo. Adaptado de França e Chiarini-Garcia, 2005.

3 Esteroidogênese

Os hormônios esteroides são compostos derivados do colesterol, os quais possuem em sua estrutura básica 17 átomos de carbono, formando o denominado núcleo ciclopentanoperidronantreno, com 4 anéis não planares A, B, C e D, unidos entre si (Fig.2). Outros átomos de carbono podem ser adicionados nas posições 10 e 13 ou a uma cadeia lateral ligada no carbono 17 (Moss et al., 1989).

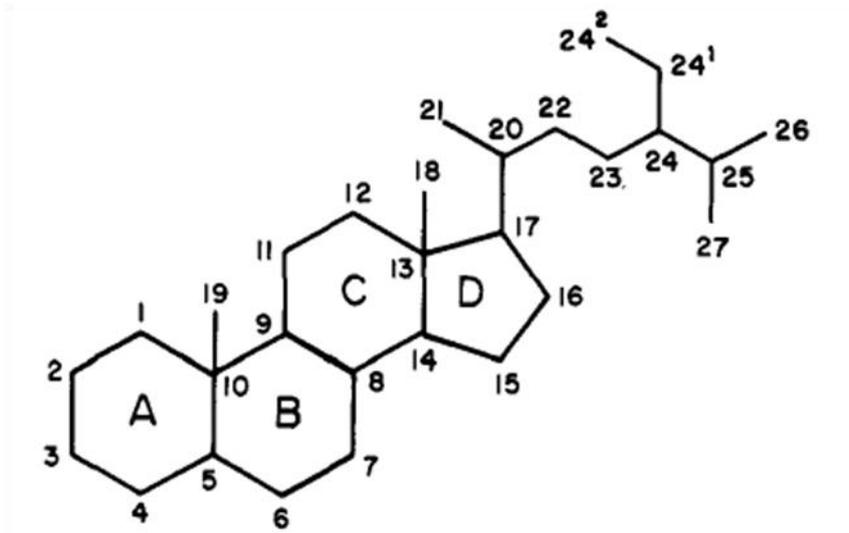


Figura 2: Estrutura básica da molécula de colesterol, precursora dos esteroides (núcleo ciclopentanoperidrofenantreno com núcleos A-D e cadeia lateral). Retirado de Moss et al., 1989.

Hormônios esteroides são sintetizados nas glândulas adrenais, gônadas, tecido adiposo e no sistema nervoso central. Diferentes hormônios esteroides possuem efeitos fisiológicos distintos, sendo que o tipo de hormônio produzido depende do arranjo de enzimas esteroidogênicas presentes no tecido em questão (Stocco, 2000).

A biossíntese de esteroides ocorre em duas etapas: (1) transporte de colesterol para as mitocôndrias e formação de pregnenolona; (2) metabolismo de pregnenolona por enzimas esteroidogênicas em tecidos específicos. Na primeira etapa, o transporte do colesterol do citoplasma para o interior da mitocôndria é realizado pela proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) juntamente com a proteína translocadora TSPO (*translocator protein*), uma proteína de alta afinidade por colesterol que se encontra localizada na membrana mitocondrial externa (Fig.3). Uma vez na matriz mitocondrial, o colesterol é clivado em pregnenolona, pela enzima CYP11A ou enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (*P450_{scc}* – *side chain cleavage*), presente na membrana mitocondrial interna (Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010). A pregnenolona livre difunde para fora da mitocôndria e a partir de então será usada para a formação dos hormônios esteroides (glicocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, progestógenos).

Essa próxima etapa da esteroidogênese depende da ação da enzima 3β-hidroxiesteróide desidrogenase, que converte a pregnenolona em progesterona (Simard, 2005). Considerando os testículos, pregnenolona e progesterona são os precursores na biossíntese de testosterona e, subsequentemente, estradiol (Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010).

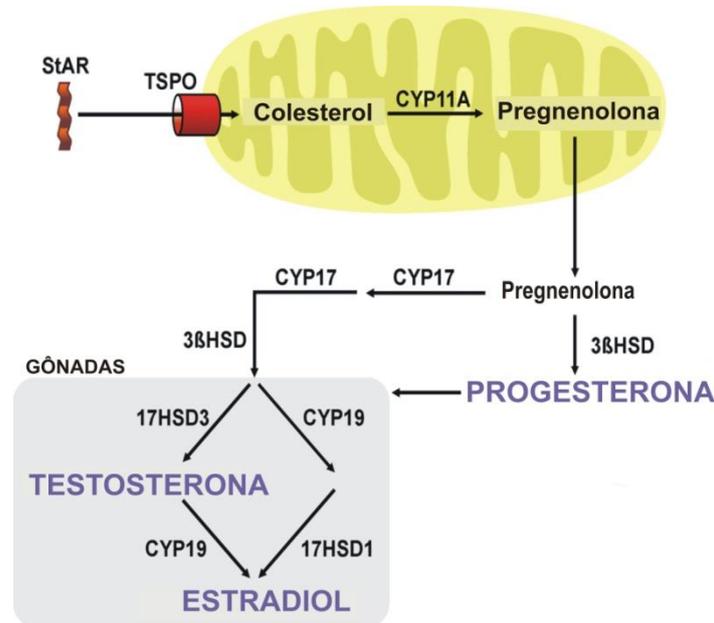


Figura 3: Via biossintética de esteroides nos testículos. Adaptado de Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010.

Nos testículos, a esteroidogênese é composta basicamente de produção de andrógenos pelas células de Leydig. O andrógeno mais importante sintetizado nos testículos é a testosterona, que é requerida para produção espermática e manutenção da função sexual masculina (Russel e Wilson, 1994). Para sua produção há participação de uma cascata de enzimas, como a CYP17 (P450c17 ou 17α-hidroxilase/C17-20 liase), enzima que prossegue a biossíntese de testosterona, induzindo a conversão de progesterona a 17α-hidroxiprogesterona, e em seguida a androstenediona. Finalmente, a androstenediona é convertida, através da ação da enzima 17β-hidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD), em testosterona (Stocco e McPhaul, 2000).

A testosterona produzida nos testículos pode ser metabolizada pela enzima 5α-redutase em 5α-dihidrotestosterona (DHT), um andrógeno metabolicamente mais ativo que a testosterona (Russel e Wilson, 1994), ou

pode ainda ser aromatizada a 17 β -estradiol pela ação da enzima P450-aromatase (Carreau et al., 2003).

3.1 Enzima 3 β -HSD

A 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteróide desidrogenase) é uma importante enzima esteroidogênica, responsável por etapas essenciais para a formação de todas as classes de hormônios esteroides, motivo que a faz reconhecida como um marcador para as células secretoras de esteroides (Zhao, 1991; Simard, 2005). Esta enzima apresenta duas isoformas em humanos, sendo a 3 β -HSD tipo I, localizada na placenta e tecidos periféricos como a pele, glândula mamária e próstata, e a isoforma tipo II que é predominantemente expressa na adrenal e gônadas. As isoformas 3 β -HSD tipo I e II são codificadas pelos genes *HSD3 B1* e *HSD3 B2*, respectivamente, e compartilham 93,5% de homologia, sendo que a 3 β -HSD tipo I tem 372 aminoácidos e a 3 β -HSD tipo II com 371 aminoácidos (Pelletier, 1992; Simard, 2005).

No rato são descritas quatro isoformas para 3 β -HSD, com distribuição tecido-específico, as isoformas tipo I e II são expressas nas gônadas, adrenais, rim, placenta, tecido adiposo e útero, enquanto a isoforma tipo III é expressa exclusivamente no fígado de machos e a isoforma tipo IV é expressa na placenta e pele (Simard, 2005). 3 β -HSD tipo I e II de ratos possuem 94% de homologia na sequência de aminoácidos, tendo peso molecular de 41,9 e 42,1 kDa, respectivamente, sendo que a enzima tipo I é mais ativa (Zhao et al, 1991). A expressão de 3 β -HSD ocorre nas células de Leydig, associada à membrana mitocondrial interna e ao retículo endoplasmático liso (Pelletier, 1992). A 3 β -HSD marca a diferenciação das células precursoras de Leydig em progenitoras, e à medida que prosseguem em diferenciação para células maduras, a intensidade da imunomarcação para 3 β -HSD aumenta concomitante com o aumento do volume celular e capacidade de secreção de testosterona (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001).

3.2 Enzima Aromatase

A biossíntese de estrógenos é catalisada pela enzima P450 aromatase, a qual pertence à superfamília do citocromo P450, codificada pelo gene *CYP19*. Essa enzima é responsável pela conversão de andrógenos a estrógenos, como por exemplo, a conversão de testosterona a 17β -estradiol. Portanto, é considerada uma enzima chave para o balanço entre os níveis de andrógenos e estrógenos (Simpson et al., 1994).

P450 aromatase é um complexo enzimático microsomal composto por duas proteínas localizadas no retículo endoplasmático liso de vários tipos celulares, o citocromo P450 aromatase e o NADPH-citocromo P450 redutase. O citocromo P450arom é responsável pela ligação ao substrato do C_{19} da cadeia estrutural de hormônios esteroides, catalisando uma série de reações que leva à formação do anel aromático (fenol A), característico de estrógenos. O NADPH-citocromo P450 redutase, por sua vez, é responsável pela transferência de equivalentes de redutores NADPH para o citocromo P450 (Graham-Lorence et al., 1991, Simpson et al, 1994). O complexo aromatase encontra-se presente em todos os vertebrados, especialmente em mamíferos, localizado principalmente no cérebro, placenta, gônadas e tecido adiposo de seres humanos e primatas (Carani et al., 1997).

Nos testículos de ratos, a atividade aromatase está relacionada com a idade, sendo localizada principalmente nas células de Sertoli de ratos imaturos e em células de Leydig de ratos adultos (Papadopoulos et al., 1986). Contudo, diversos estudos têm demonstrado a presença de aromatase também em células de Sertoli e células germinativas de ratos adultos, sendo as células germinativas consideradas importantes fonte de estrógenos em machos (Janulis et al., 1996; Bilinska et al., 2000; Carreau et al., 2003). A atividade de aromatase é mais intensa nas células germinativas haplóides, principalmente espermatídes alongadas (Janulis et al., 1998; Levallet et al., 1998), destacando sua importância no processo de espermatogênese.

A presença de aromatase e/ou estrógenos no testículo é de suma importância, uma vez que estudos com animais deficientes para aromatase ou com administração de inibidores de aromatase e/ou estrógenos mostram a ocorrência de diversos distúrbios reprodutivos, como redução no número de

espermátides arredondadas e alongadas (Shetty et al., 1998), espermatogênese anormal com interrupção da maturação de células germinativas na fase de espermátides (Fisher et al., 1998) e atrofia testicular seguida de infertilidade (Oliveira et al., 2001). Em adição, a produção local de aromatase parece exercer um importante papel na motilidade e capacitação de espermatozoides, pois a ausência de aromatase leva a imobilidade de espermatozoides (Lazaros et al., 2011).

4 Desreguladores Endócrinos

Os desreguladores endócrinos são substâncias naturais ou sintéticas presentes no ambiente, que interferem na síntese, estocagem, metabolismo, distribuição, eliminação ou ação dos hormônios naturais, por se ligarem a seus receptores e mimetizarem ou inibirem a ação dos mesmos, levando a alterações na regulação normal do sistema endócrino (Toppari, 2008).

Diversas são as substâncias capazes de levar ao desequilíbrio endócrino. Dentre esses potenciais desreguladores endócrinos estão substâncias denominadas xenoestrógenos, os quais mimetizam ou antagonizam as ações dos estrógenos endógenos, tais como pesticidas e herbicidas (Atrazina, Dicloro-Difenil-Tricloroetano), contaminantes plásticos (Bisfenol A), compostos farmacêuticos, como os estrógenos sintéticos (Dietilestilbestrol e 17 α -etinilestradiol), compostos naturais (Fitoestrógenos), dentre outras (Cheek et al., 1998; Crisp et al., 1998; Frye et al., 2011).

A relação entre desreguladores endócrinos e reprodução masculina tem sido amplamente investigada em face das evidências crescentes quanto à relação entre a exposição a esses compostos e o aumento de distúrbios reprodutivos em machos, tanto em humanos quanto em animais silvestres (Victor-Costa et al., 2010; Hayes et al., 2011). Nesse contexto, a exposição ambiental aos desreguladores endócrinos tem sido relacionada à síndrome da disgenesia testicular por induzir alterações no sistema genital masculino, que podem ocorrer antes do nascimento, durante o desenvolvimento ou em jovens adultos. Dentre essas alterações inclui-se o incompleto descenso testicular (criptorquidismo), má formação da abertura uretral no pênis (hipospadia), redução do tamanho testicular, diminuição da produção espermática, má

qualidade do sêmen (Sharpe et al., 1995; Sharpe et al., 2008), redução na motilidade de espermatozoides e eventual morte celular (Kniewald et al., 2000; Betancourt et al., 2006), alterações degenerativas na arquitetura testicular (Kniewald et al., 2000), câncer testicular das células germinativas (Sharpe et al., 2008), dentre outras. Essas alterações têm sido atribuídas ao efeito deletério dos desreguladores endócrinos, com ação estrogênica ou antiandrogênica (Sharpe et al., 2008).

Dentre os potenciais desreguladores endócrinos está a atrazina, um herbicida com ampla utilização no Brasil, entretanto com uso restrito nos Estados Unidos e proibido na União Europeia, devido a seus efeitos deletérios na reprodução masculina.

5 Atrazina

Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-S-triazina) é um componente ativo de herbicidas da família dos triazinas, comumente utilizados na agricultura, para controle de plantas infestantes das culturas de cana-de-açúcar, milho, sorgo, abacaxi, pinus, seringueira e sisal, dentre outros (*United States Environmental Protection Agency*, 2006). Devido à baixa persistência do herbicida no solo, repetidas aplicações precisam ser praticadas para o controle de plantas infestantes em campos agrícolas e, como consequência, grandes quantidades de herbicidas acumulam-se nos corpos d'água (Nwani et al., 2010). Quanto à toxicidade, o produto é classificado como medianamente tóxico ao ser humano - Classe III (ANVISA, 1985). No entanto, estudos recentes mostram que atrazina é um potente desregulador endócrino, capaz de alterar a esteroidogênese testicular (Hayes et al., 2010; Hussain et al., 2010; Tillitt et al., 2010; Victor-Costa et al., 2010; Jin et al., 2013; Forgacs et al., 2013).

Atrazina começou a ser utilizado na agricultura a partir de 1950, introduzido como um herbicida de amplo espectro para controle anual de gramíneas e plantas infestantes de folhas largas (*United States Environmental Protection Agency*, 2006). Este herbicida é frequentemente pulverizado nas fases pré- e pós-colheita de diversos produtos alimentares. O potencial herbicida de atrazina deve-se à sua ação na inibição da fotossíntese pela

interrupção da reação de Hill, ou seja, inibe a cadeia de transporte de elétrons do fotossistema II (Knauer et al., 2009). Inicialmente, pensava-se que, devido ao modo de ação da atrazina ser limitado a fotossíntese das plantas, os animais seriam resguardados de qualquer efeito do herbicida. No entanto, diferentes classes de animais tem sido alvo dos efeitos adversos de atrazina (Stanko et al., 2010; Hayes et al., 2011). A intensificação da agricultura e o correspondente aumento no uso de herbicidas têm levado a preocupação quanto a esses efeitos adversos. O uso indiscriminado desse herbicida, o manuseio descuidado, derrames acidentais ou descarga de efluentes sem tratamento nos cursos d'água naturais têm efeitos nocivos sobre as populações de peixes e outros organismos aquáticos e podem contribuir para os efeitos de longo prazo no ambiente (Nwani et al., 2010). Devido às propriedades de bioacumulação e resistência a biodegradação, a atrazina é comumente encontrada em águas de superfície e, em pequena extensão, nas águas subterrâneas (Solomon et al., 1996). Atrazina foi detectado ainda em águas de fontes muito distantes do local da aplicação, onde era a única fonte conhecida de contaminantes orgânicos, terminando em sistemas de distribuição de água potável (Benotti et al., 2009). Além do contato ocupacional e contaminação de pessoas e animais que vivem próximas às áreas de utilização do herbicida, a exposição a esse composto pode ocorrer a longas distâncias através da dispersão atmosférica desse herbicida (Dos Santos et al., 2011) e através da rede de abastecimento de água tratada. Além disso, atrazina já foi detectado em produtos alimentícios de consumo diário, como leite e iogurte (Garcia et al., 2012; Li et al., 2013).

Estudos diversos mostram que a exposição à atrazina provoca desordens reprodutivas nas diferentes classes de vertebrados, incluindo redução da reprodução e desova em peixes (Tillitt et al., 2010), alteração na razão entre sexos em peixes (Suzawa e Ingraham, 2008), indução de feminização em anfíbios (Hayes et al., 2002; Hayes et al., 2010), redução de células germinativas primárias do ovário de anfíbios (Tavera-Mendoza et al., 2002), alterações na arquitetura testicular e níveis de testosterona em crocodilianos (Rey et al., 2009), redução dos testículos e dos túbulos seminíferos com diminuição do número de células germinativas em aves (Hussain et al., 2010), bem como atraso na maturação sexual (Stoker et al.,

2000; Trentacoste et al., 2001; Ashby et al., 2002), redução do número e motilidade de espermatozoides (Kniewald et al., 2000; Betancourt et al., 2006; Swan et al., 2006) e redução no peso da próstata e vesícula seminal de mamíferos (Kniewald et al., 2000; Trentacoste et al., 2001; Stoker et al., 2002; Stanko et al., 2010).

Em ratos, os resultados dos efeitos da exposição a atrazina sobre os testículos são controversos, desde de que alguns mostram aumento (Abarikwu et al., 2009) ou redução (Pogrmic et al., 2009) no peso do órgão, enquanto outros não detectam alteração no peso testicular (Kniewald et al., 2000; Stoker et al., 2000). Resultados conciliadores foram obtidos por Victor-Costa et al. (2010), que revelaram que a diferença de peso depende da dose e período de exposição ao herbicida, desde que doses mais baixas (50 mg/kg) não alteram o peso testicular, enquanto doses mais altas, mas por curtos períodos de tempo (200 mg/kg/15 dias ou 300 mg/kg/7 dias), levam a aumento transitório de peso testicular, seguido de atrofia do órgão, após período mais longo de exposição ao herbicida (200mg/Kg/40 dias). Os efeitos na morfologia testicular ocorreram em paralelo à redução dos níveis plasmáticos e testiculares de testosterona e aumento de estradiol (Victor-Costa et al., 2010).

O mecanismo de ação de atrazina não está completamente determinado, mas estudos *in vitro* mostram que atrazina induz a expressão e atividade de P450 aromatase, levando a um desequilíbrio entre os níveis de andrógenos e estrógenos (Sanderson et al., 2001; Fan et al., 2007a). Evidências *in vivo* para tal efeito são escassas, limitando-se a um estudo de atividade aromatase no soro de camundongos pré-púberes (Jin et al., 2013). Em contraste, outro experimento *in vivo* revelou redução na atividade microsomal de aromatase testicular de ratos púberes tratados com atrazina, apesar do aumento na proporção local de estrógenos/testosterona e níveis inalterados de RNAm de aromatase (Quignot et al., 2012a). Por outro lado, Victor-Costa et al., (2010) demonstraram que houve efeito também na via esteroidogênica com diminuição na expressão da enzima 3 β -HSD nas células de Leydig. Dessa forma, a inibição de 3 β -HSD pode representar um mecanismo alternativo, através do qual atrazina afeta a androgênese testicular, levando a alterações na espermatogênese.

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1 Justificativa

Considerando a ampla utilização de atrazina na agricultura, sua fácil disseminação no ambiente e ainda seus efeitos adversos sobre o sistema genital masculino, torna-se necessário aprofundar os estudos sobre as alterações teciduais e hormonais desencadeadas por esse herbicida nos testículos, que representam importante alvo de ação dos desreguladores endócrinos.

Um dos efeitos consensuais de atrazina em diversas espécies animais é a redução nos níveis de testosterona, paralelo a alterações testiculares que podem justificar a redução na produção de espermatozoides e o potencial risco de infertilidade. A hipótese mais aceita para justificar essa alteração é o aumento nos níveis e atividade da enzima aromatase que metaboliza testosterona em estrógenos, levando assim ao desequilíbrio endócrino. No entanto, as evidências desse fato em condições *in vivo* são escassas, e controversas (Quignot et al., 2012a; Jin et al., 2013), sendo inexistentes para animais adultos, o que dificulta uma conclusão precisa. Dessa forma, pretendemos confirmar em um modelo adulto *in vivo* se a exposição à atrazina tem efeito na expressão da enzima aromatase em nível de proteína, uma vez que os níveis de transcrição nem sempre são indicadores precisos da atividade enzimática.

Por outro lado, uma alternativa para justificar a redução de testosterona foi apresentada por Victor-Costa et al. (2010), que detectaram redução na expressão de 3 β -HSD testicular, uma enzima envolvida em etapas iniciais na cascata esteroidogênica na síntese de testosterona. Em sequência a esses resultados, interessa-nos investigar se os efeitos provocados pela exposição à atrazina na morfologia e expressão de 3 β -HSD testicular, previamente descritos (Victor-Costa et al., 2010), são reversíveis ou permanentes após a interrupção da exposição ao herbicida.

2 Objetivo Geral

O presente estudo visa investigar se as alterações na morfologia e esteroidogênese previamente encontradas nos testículos de ratos adultos expostos a atrazina (Victor-Costa et al., 2010), são permanentes ou transitórias.

2.1 Objetivos específicos

Sempre comparando animais controle e expostos ao herbicida, pretende-se:

- Determinar o peso corporal e o peso relativo dos testículos;
- Descrever a morfologia testicular através de estudos histológicos e morfométricos;
- Avaliar possíveis alterações na expressão da enzima 3β -HSD nos testículos de ratos expostos ao herbicida e submetidos a um período de recuperação da exposição;
- Avaliar possíveis alterações na expressão da enzima aromatase nos testículos de ratos expostos a diferentes tratamentos com o herbicida.

III. METODOLOGIA

1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, sexualmente maduros (100 dias de idade), adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada (Nuvital Nutrientes S.A, Colombo, PR) e água à vontade, e mantidos sob condições constantes de luminosidade (12h de luz/12h de escuro) e temperatura (22°C). Os procedimentos experimentais seguiram as normas ditadas pelo Comitê de Ética Animal da UFMG - CETEA (ANEXO A).

2 Tratamento

Para as investigações da expressão de aromatase, foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- Animais tratados com atrazina - 7 dias (n=4);
- Controles do tratamento - 7 dias (n=4);
- Animais tratados com atrazina - 15 dias (n=4);
- Controles do tratamento - 15 dias (n=4);
- Animais tratados com atrazina - 40 dias (n=12);
- Controles do tratamento - 40 dias (n=12);
- Animais tratados com atrazina - 40 dias e submetidos à recuperação (n=6);
- Controles do tratamento - 40 dias/recuperação (n=6).

Os animais tratados receberam dose diária de atrazina 200mg/Kg de peso corporal diluída em óleo de milho (volume aproximado de 0,7 ml), por via oral. Os animais controle dos tratamentos receberam apenas óleo de milho, pela mesma via e períodos de tratamentos. Ressalta-se que as doses e períodos de tratamento basearam-se em estudo feito anteriormente que mostrou alterações na morfologia e esteroidogênese testicular de ratos adultos expostos a atrazina (Victor-Costa et al., 2010). Os períodos de tratamentos com atrazina 200mg/Kg durante 15 e 40 dias já foram anteriormente realizados (Victor-Costa et al., 2010), e foram repetidos no presente estudo com a

finalidade de se comparar com os outros grupos experimentais utilizados neste estudo e validar os resultados anteriores.

Para determinar se as alterações morfológicas e de expressão de 3 β -HSD testiculares, verificadas anteriormente (Victor-Costa et al., 2010), são reversíveis ou permanentes, após o período de 40 dias de tratamento, parte dos animais foi mantida no biotério para recuperação da exposição ao herbicida por um período de 75 dias, nas mesmas condições de alimentação, água, luminosidade e temperatura. Esse período de recuperação foi escolhido por ser suficiente para abranger mais de um ciclo de espermatogênese, que nos ratos Wistar é de 58 dias (Russel, 1990). O grupo controle da recuperação recebeu óleo de milho por via oral, diariamente, durante 40 dias, sendo que a seguir foi submetido ao mesmo período de recuperação de 75 dias.

3 Sacrifício dos animais

Após o período de tratamento e/ou de recuperação, os ratos foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de pentobarbital sódico 80mg/Kg e cloridrato de quetamina 10mg/Kg. A seguir, os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca, via aorta, com solução de Ringer, seguida de solução fixadora de formalina neutra tamponada a 10%. Após a fixação, os testículos foram dissecados, pesados e imersos no mesmo fixador, em cujo líquido foram mantidos a temperatura de 4°C. Os testículos fixados foram destinados a técnicas rotineiras de preparação histológica e imunohistoquímica. Para os ensaios de Western blotting, os animais foram perfundidos apenas com solução de Ringer. Os órgãos de interesse foram então dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em freezer (- 80°C) até o momento do processamento.

4 Preparação histológica

Os testículos fixados foram seccionados em fragmentos destinados a inclusão em parafina ou em resina de glicolmetacrilato. Para isso, os fragmentos foram previamente desidratados em uma série crescente de etanol, e no caso da inclusão em parafina, os tecidos passaram também por uma série

de xilóis para diafanização. Após pré-infiltração e infiltração em cada meio de inclusão, procedeu-se a inclusão propriamente dita. Após a inclusão, foram obtidos cortes de 5µm para os tecidos incluídos em parafina e 3µm para os fragmentos incluídos em glicolmetacrilato. Os cortes obtidos das inclusões em glicolmetacrilato foram submetidos a protocolos de rotina para colorações com hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina-borato de sódio ou ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) contracorado com hematoxilina, para investigação das alterações morfológicas e morfometria. Os cortes obtidos das inclusões em parafina foram destinados aos estudos imunohistoquímicos.

5 Documentação fotográfica e morfometria

Visando complementar as observações histológicas foram realizadas estimativas quantitativas das alterações morfológicas dos testículos, utilizando imagens assistidas por computador. Para tanto, os preparados histológicos foram fotografados utilizando câmera digital (Nikon Coolpix 995, Japão ou OPTIXCAM S/N:K500210030, China), acoplada a fotomicroscópio (Nikon Eclipse E600, Japão). As imagens obtidas foram processadas utilizando o programa Adobe Photoshop.

Para determinação do percentual de túbulos seminíferos atrofiados nos testículos de animais controle e expostos a atrazina, foi realizada a contagem do número de túbulos seminíferos por seção transversal de tecido, a partir de cortes histológicos obtidos de tecidos incluídos em glicolmetacrilato e corados pela hematoxilina e eosina. As contagens foram feitas com o auxílio de retículo de 100 pontos e área total de 6,25mm², acoplado a ocular do microscópio, sendo as observações feitas em objetiva de 40X. Para cada animal foram selecionadas três áreas diferentes, duas na periferia e uma no centro do corte. Em cada área foram contados os túbulos seminíferos totais visualizados dentro da área do retículo e categorizados em normais, com lúmen dilatado e atrofiados.

Para mensurar o diâmetro luminal, para cada animal, foram analisadas 05 seções de túbulos seminíferos, o mais transversal possível, os quais se encontravam nos estádios 7 ou 8 do ciclo do epitélio seminífero, classificado de acordo com o método da morfologia tubular. Esses estádios foram escolhidos

por apresentarem maior expressão de receptores de andrógenos e receptores de estrógenos do tipo beta (Oliveira et al., 2001 e 2009), sendo portanto, mais sensíveis a alterações em níveis de andrógenos e estrógenos. As medidas foram feitas com o auxílio de régua micrométrica de 2,5 μ m, acoplada à ocular, e objetiva de 40X. O tratamento de 40 dias seguido de período de recuperação não foi considerado por conter somente túbulos atroficos.

6 Imunohistoquímica

Alterações na expressão de 3 β -HSD e P450-aromatase foram investigadas através de imunohistoquímica. Cortes de testículos fixados em formalina neutra tamponada e incluídos em parafina foram desparafinados, hidratados em série decrescente de etanol e incubados em solução de metanol com peróxido de hidrogênio 0,6% para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram submetidos ao procedimento de recuperação antigênica, por imersão em tampão citrato 0,1M pH 6,0 e aquecimento em micro-ondas na potência 70, durante aproximadamente 8 minutos. Após resfriamento dos cortes em temperatura ambiente, os mesmos foram lavados em salina tampão fosfato (PBS) e incubados com soluções de bloqueio de avidina e biotina endógena (Avidin/biotin blocking kit – Vector Laboratories, EUA). Seguiu-se a incubação dos cortes em soro normal 10% para bloqueio de ligações inespecíficas, antes de serem expostos a anticorpos primários monoclonais de cabra anti-3 β -HSD (P-18, SC-30820, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e de coelho anti-aromatase (A7981, Sigma-Aldrich, USA), nas diluições de 1:500 em 1% de albumina de soro bovino e PBS, *overnight* a 4°C. Para os controles negativos, os cortes foram incubados em PBS em substituição ao anticorpo primário. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos secundários biotinilados coelho-anti-cabra, para 3 β HSD, e cabra anti-coelho (Dako, Carpinteria, CA, USA), para aromatase, na diluição de 1:100, por 60 minutos. Na sequência foi realizada lavagem com PBS e incubação com solução do complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (Vectastain Ellite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), por 30 minutos, para amplificação da imunomarcção. A revelação foi feita por adição do substrato contendo diaminobenzidina a

0,05% (p/v) contendo 0,01% (v/v) de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 7,6. A reação foi interrompida, por imersão em água destilada. Ao final, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados e montados para análise.

7 Western blotting

As alterações na expressão de 3β -HSD e aromatase nos testículos foram ainda avaliadas através de ensaios de Western blotting. Devido à heterogeneidade detectada no peso e refletida na morfologia testicular, para esse ensaio, os testículos dos animais tratados por 40 dias foram reagrupados em 03 categorias: pequenos, médios e grandes. Os testículos pequenos correspondem àqueles atrofiados, os médios com peso e morfologia mais próximos dos controles e os grandes com peso acima dos controles e contendo túbulos dilatados. Os testículos congelados em nitrogênio líquido (n = 3 por grupo) foram macerados em gelo seco, submetidos à ultrasonicação e homogeneizados em tampão NETN (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0.5% Nonidet P-40), para 3β -HSD, e tampão de uréia 8M (20 mM Tris-HCl, pH 7,0, EDTA 0,5 mM, pH 8,0), para aromatase, seguido de adição de coquetel inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail - Sigma, EUA). Para extração de proteínas totais, as amostras foram centrifugadas a 15000 G na temperatura de 4°C, durante 10 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese contínua em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (20 *volts* por 90 minutos, para 3β -HSD; 100 *volts* por 60 minutos, para aromatase). Após, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBST (TBS com 0,1% de Tween 20), para 3β -HSD, ou soro normal de cabra a 10%, para aromatase, durante 60 minutos, e depois incubadas com anticorpos primários monoclonais de cabra anti- 3β -HSD (P-18, SC-30820, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), na diluição 1:500, coelho anti-aromatase (A7981, Sigma-Aldrich, USA), na diluição 1:1000, ou coelho anti-GAPDH (14C10, Cell Signaling, USA), na diluição 1:1000, *overnight*, seguidas de lavagem e incubação com anticorpos secundários biotinilados coelho-anti-cabra na diluição de 1:2000,

para 3 β -HSD, cabra anti-coelho na diluição de 1:2000, para aromatase, ou cabra-anti-coelho na diluição 1:1000, para GAPDH (Dako, Carpinteria, CA, USA), durante 60 minutos. O GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle interno dos ensaios. Após lavagens com TBST ou PBS, as membranas foram incubadas por 30 minutos com solução de complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (Vectastain Standard ABC kit – Vector Laboratories, EUA). Após lavagens com PBS-Twen 0,05% e PBS, as reações foram reveladas por adição de 0,01% de 3,3'diaminobenzidina em PBS contendo cloronaftol 0,05%, 16,6% de metanol e 0,04% de peróxido de hidrogênio. As respectivas reações foram paradas com água deionizada.

8 Análise estatística

Os animais que integraram cada um dos grupos experimentais foram escolhidos aleatoriamente. As alterações promovidas pelo tratamento com atrazina, nas variáveis: peso corporal, peso testicular relativo e parâmetros morfométricos, foram analisadas utilizando-se Teste *t-Student* entre pares. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

1 Peso Corporal e Testicular

A exposição à atrazina na dosagem de 200 mg/kg de peso corporal resultou em significativa redução no peso corporal dos animais, enquanto após o período de recuperação o peso corporal dos animais expostos ao herbicida retornou para patamares similares ao controle (Fig. 4A)

Em relação ao peso testicular relativo, não houve alteração após 7 dias de exposição a atrazina, mas houve aumento significativo após 15 e 40 dias (Fig. 4B). Em contraste, o peso dos testículos dos animais submetidos a recuperação mostrou-se significativamente reduzido (58%) em relação aos animais controle.

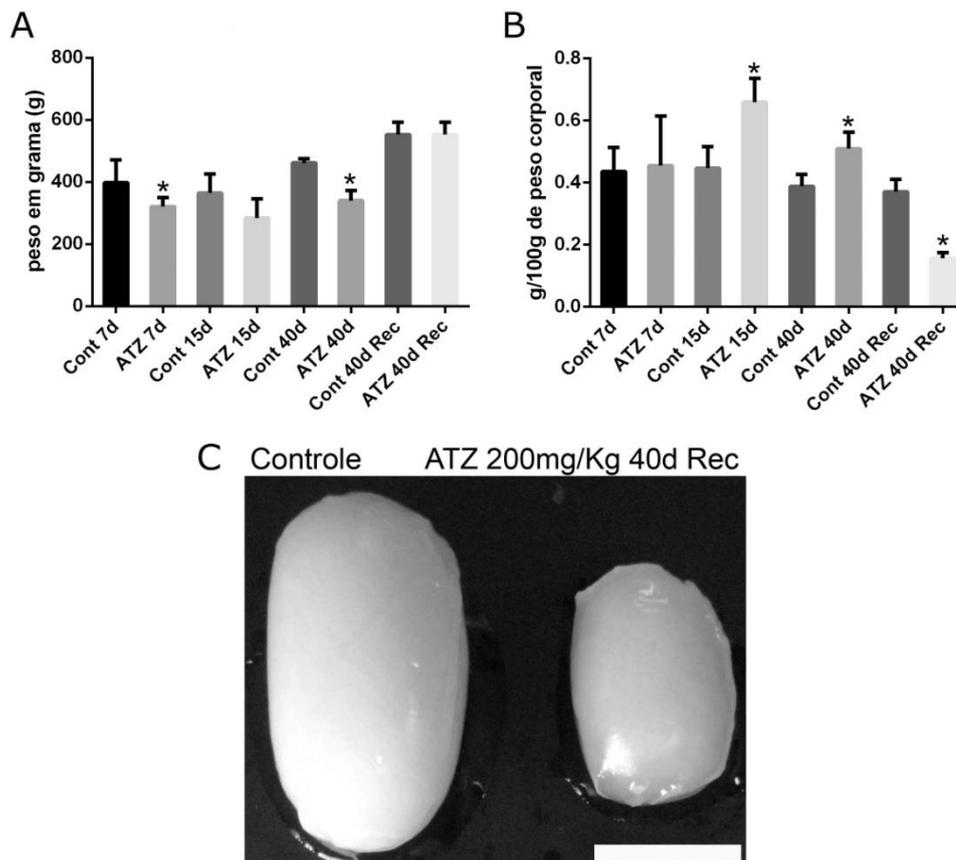


Figura 4: Efeitos de atrazina sobre o peso corporal **(A)** e peso testicular relativo **(B)**. Comparação do tamanho testicular **(C)**. Cont = animais controle; ATZ = animais tratados com atrazina 200mg/Kg; Barra em C = 1 cm; * $P \leq 0,05$.

2 Morfologia Testicular

Para todos os grupos controle, o compartimento dos túbulos seminíferos apresenta lúmen tubular regular, epitélio seminífero com células espermatogênicas em diferentes estágios de diferenciação, sendo evidenciadas espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas e células de Sertoli (Fig. 5). No espaço intertubular encontram-se as células de Leydig, dispostas em proximidade a vasos sanguíneos e espaços linfáticos. O tratamento com 200mg/Kg de atrazina durante 7 dias não resultou em diferenças morfológicas aparentes em relação aos animais controle. Após 15 dias de exposição a morfologia testicular mostrou-se heterogênea, sendo que túbulos normais colocalizaram com túbulos dilatados ou em diferentes graus de atrofia nas mesmas secções (Fig. 5). As alterações testiculares foram mais marcantes nos animais expostos cronicamente ao herbicida, onde a maioria dos túbulos apresentou-se com significativo aumento do diâmetro luminal (Fig. 6) ou em atrofia.

Os túbulos atrofiados foram caracterizados pela perda das células germinativas, sendo em sua maioria, constituídos apenas por células de Sertoli (Fig. 5). Nesses túbulos foram observadas frequentes células germinativas em apoptose e células gigantes multinucleadas, identificadas pelo grande tamanho e pelos diversos núcleos correspondentes às células espermatogênicas que não separaram as pontes citoplasmáticas durante o processo de meiose. Após o período de recuperação, nos túbulos seminíferos atrofiados restaram apenas células de Sertoli e raras espermatogônias, volumosas, e que, em alguns túbulos, apresentaram-se em divisão mitótica (Fig. 5). No compartimento intertubular foi observado aparente aumento na quantidade de células de Leydig e essas apresentaram predomínio de heterocromatina periférica.

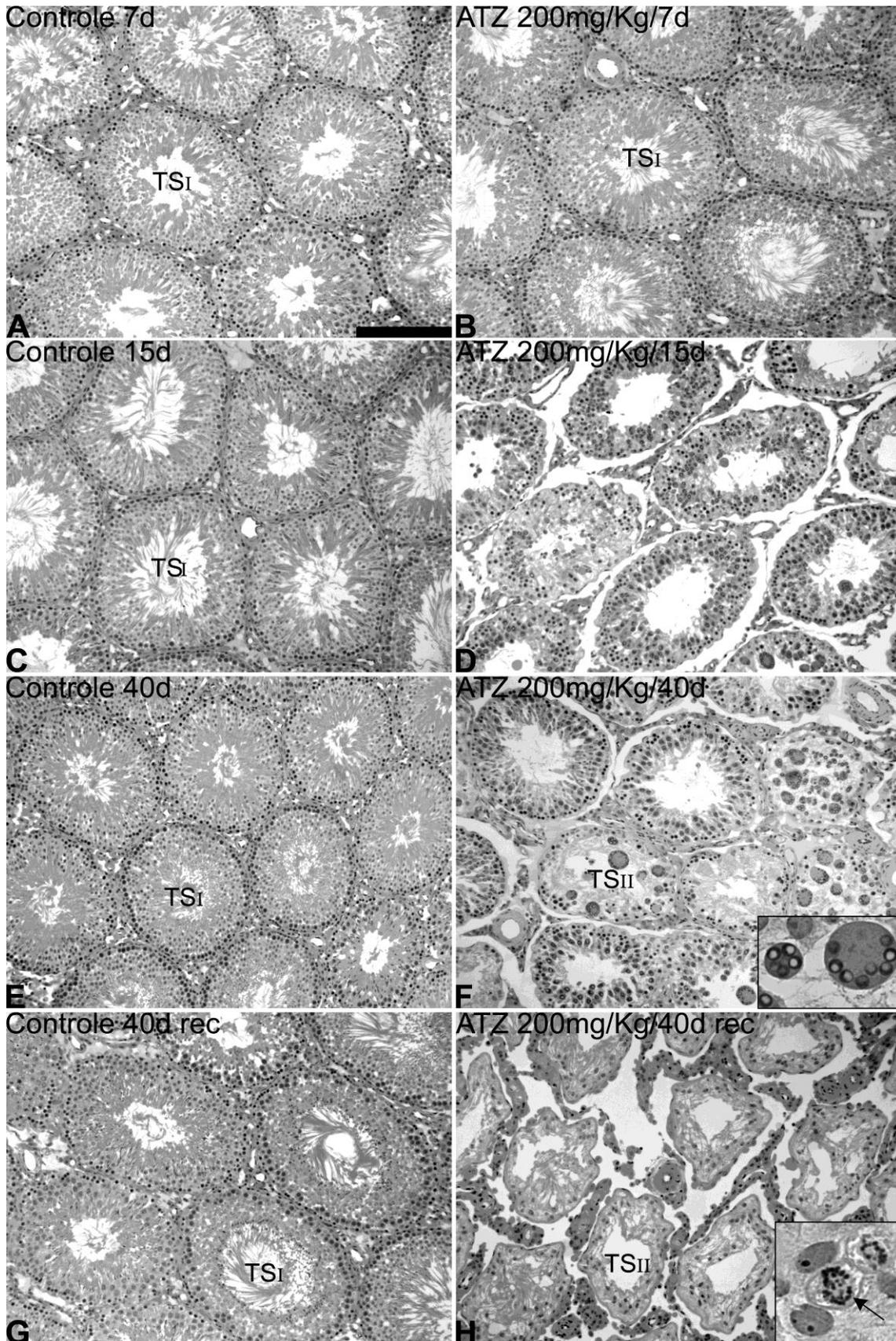


Figura 5: Efeitos de atrazina na morfologia testicular. (A, C, E, G) animais controle; (B, D, F, H) animais tratados com atrazina 200mg/Kg. Inseto em F - células gigantes multinucleadas. Inseto em H - espermatogônias em divisão mitótica (seta). TSI = Túbulos seminíferos normais, TSII = Túbulos seminíferos atrofiados; ATZ = atrazina. Barra em A = 200µm.

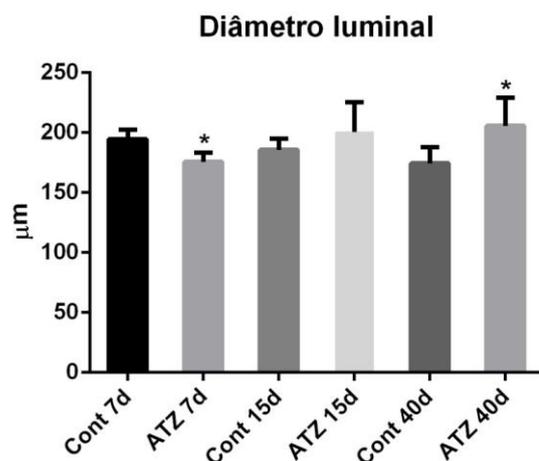


Figura 6: Diâmetro luminal de túbulos seminíferos. Cont = controle; ATZ= animais tratados com atrazina 200mg/Kg; * $P \leq 0,05$.

A análise quantitativa revelou que, após 15 dias de exposição a atrazina, 46% dos túbulos seminíferos apresentaram morfologia similar aos animais controle, 23% apresentaram dilatação luminal e 31% dos túbulos seminíferos apresentaram-se atrofiados (Fig.7). O tratamento crônico por 40 dias resultou em maior proporção de túbulos seminíferos dilatados (44%), além de túbulos seminíferos atrofiados (11%). Nos animais do grupo tratado com atrazina seguido de recuperação, a atrofia testicular atingiu 100% dos túbulos seminíferos (Fig. 7).

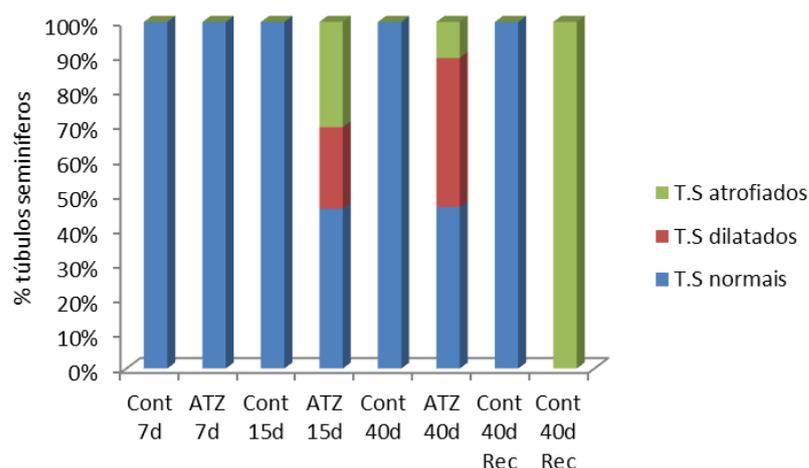


Figura 7: Proporção de túbulos seminíferos (T.S), normais, dilatados e atrofiados. Cont = animais controle; ATZ = animais tratados com atrazina 200mg/Kg.

3 Detecção de 3 β -HSD

Nos animais controle, a expressão de 3 β -HSD no testículo mostrou intensidade e distribuição homogênea no citoplasma das células de Leydig (Fig. 8). Nos animais tratados por 7 dias não houve diferença marcante na expressão de 3 β -HSD nas células de Leydig em relação aos animais controle, exceto por discreta redução na marcação em algumas células. Após 15 dias de exposição houve heterogeneidade na imunomarcação, sendo que, em animais com túbulos seminíferos pouco alterados, a intensidade de coloração apresentou-se similar aos controles, enquanto em animais com túbulos seminíferos dilatados ou atrofiados foi detectada redução na imunomarcação para 3 β -HSD. O tratamento mais prolongado resultou em redução mais marcante na expressão de 3 β -HSD nas células de Leydig (Fig. 8). Após o período de recuperação da exposição ao herbicida houve redução ainda mais drástica na imunorreatividade para 3 β -HSD. Por outro lado, foi detectada intensa imunorreatividade para 3 β -HSD em células com morfologia semelhante a macrófagos (Fig. 8).

Nos ensaios de Western blotting foram identificadas duas bandas de peso molecular 42,7 e 43,0 (Fig. 9), que correspondem, respectivamente, a 3 β -HSD tipo I e II, previamente descritas para ratos (Zhao et al, 1991). Corroborando os resultados dos ensaios de imunohistoquímica, houve diminuição na expressão de ambos subtipos de 3 β -HSD em todos os grupos experimentais. Redução mais acentuada foi encontrada após 40 dias de exposição, especialmente para a 3 β -HSD tipo I nos testículos pequenos e grandes.

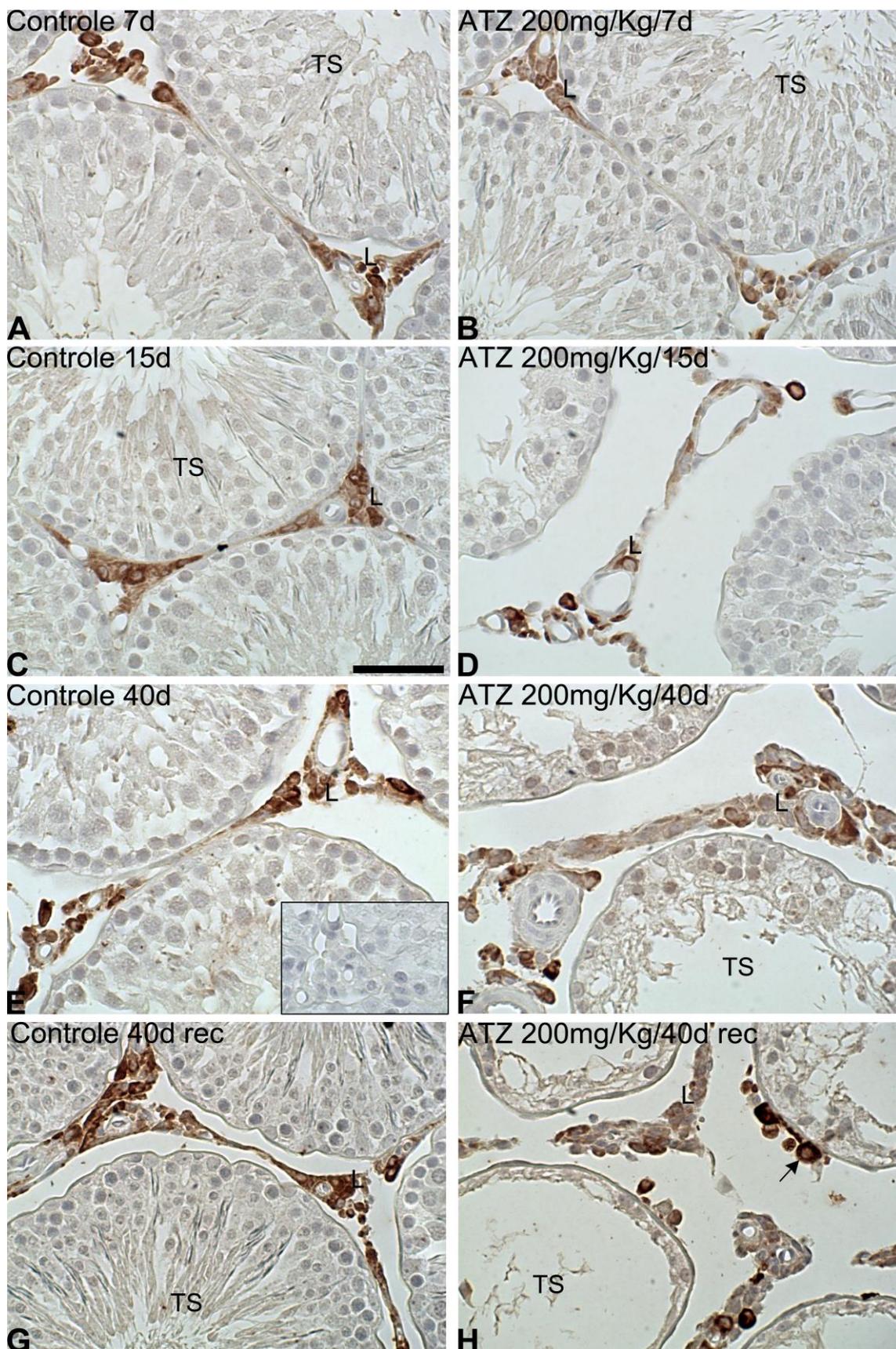


Figura 8: Imunolocalização de 3β -HSD nos testículos de ratos. (A, C, E, G) animais controle; (B, D, F, H) animais tratados com atrazina 200mg/Kg. Inseto em E = controle negativo. TS = Túbulos seminíferos; Células semelhantes à macrófagos (seta); L = Células de Leydig; ATZ = atrazina; Rec = recuperação. Barra em C = 100 μ m.

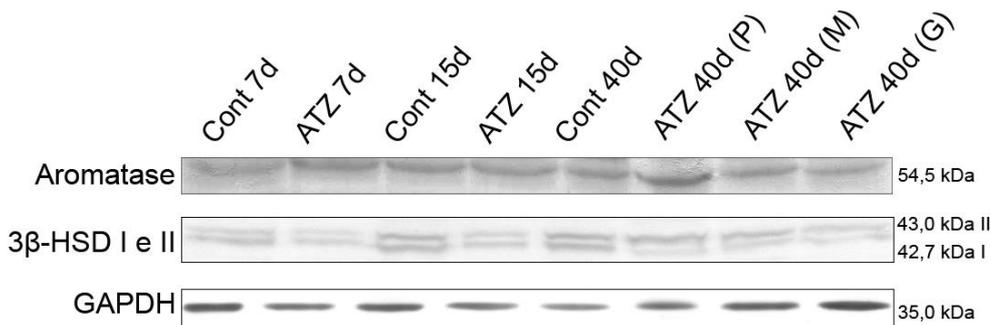


Figura 9: Ensaio de Western blotting para detecção das enzimas aromatase e 3 β -HSD nos testículos de ratos controles e tratados com atrazina 200mg/Kg. GAPDH foi usado como controle interno dos ensaios. Os respectivos pesos moleculares são mostrados à direita. Cont = controle; ATZ = atrazina; testículo pequeno (P), médio (M) e grande (G).

4 Detecção de Aromatase

A expressão de P450-aromatase nos testículos de animais controle foi positiva no citoplasma de espermatogônias, espermatócitos primários e espermátides alongadas nos túbulos seminíferos, além de células de Leydig no compartimento intertubular (Fig.10). Marcação mais intensa para a enzima foi detectada em espermatócitos, especialmente em túbulos nas fases 6-8 e 1 da ciclo do epitélio seminífero. Resultado similar foi observado para os animais expostos por 7 e 15 dias à atrazina 200mg/Kg. Após exposição à atrazina durante 40 dias foi observado aumento da imunomarcagem de aromatase nas células de Leydig. No grupo submetido à recuperação, a expressão de aromatase foi similar aos animais controle, mas reduzida quando comparada com animais tratados por 40 dias.

Os resultados foram confirmados através de ensaios de Western blotting, revelando bandas imunorreativas mais intensas após 40 dias de exposição a atrazina, especialmente nos testículos atrofiados (Fig. 9). O peso molecular detectado para a proteína foi de 54,5 kDa e está de acordo com o descrito na literatura (Osawa et al., 1987).

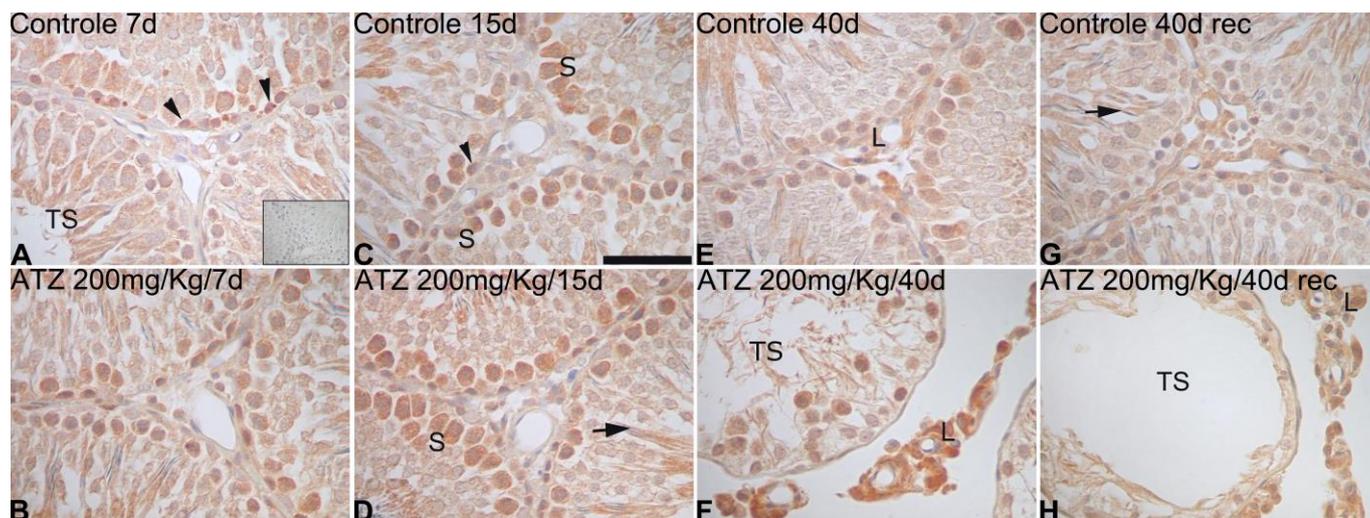


Figura 10: Imunolocalização de aromatase nos testículos de rato. **(A, C, E, G)** animais controle. **(B, D, F, H)** animais tratados com atrazina 200mg/Kg. Inseto em A = controle negativo; cabeça de seta = espermatogônias; S = espermatócitos primários; setas = espermátides; L = célula de Leydig; TS = túbulos seminíferos; Barra em C = 50µm.

V. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Discussão e Conclusões

O presente estudo acrescenta informações importantes sobre o efeito de atrazina ao longo do tempo, na morfologia e esteroidogênese testicular de ratos adultos. Foram evidenciadas alterações precoce na morfologia e expressão de 3β -HSD testicular após exposição à atrazina na dose de 200mg/Kg, enquanto as alterações na expressão de aromatase foram notadas mais tardiamente. As alterações incluíram aumento transitório do peso testicular, dilatação luminal e atrofia testicular. A atrofia testicular foi mais marcante após 75 dias de interrupção da exposição ao herbicida, sugerindo que os efeitos de atrazina nos testículos são prolongados e irreversíveis.

Houve redução do peso corporal nos animais tratados com atrazina, corroborando dados da literatura, onde doses superiores a 50mg/Kg do herbicida consistentemente resultam em redução do peso corporal de ratos (Kniewald et al., 2000; Trentacoste et al., 2001; Victor-Costa et al., 2010; Quignot et al., 2012a; Jin et al., 2013). Em contraste, no grupo tratado com atrazina seguido de período de recuperação, o peso corporal atingiu valores similares aos controles, indicando que o intervalo de tempo utilizado foi suficiente para a recuperação dos efeitos do herbicida sobre o peso corporal. Resultado similar foi recentemente descrito para ratos pré-púberes submetidos à mesma dosagem de atrazina (Quignot et al., 2012a).

A exposição ao herbicida por período superior a 7 dias resultou em peso testicular aumentado, paralelo ao aumento na proporção de túbulos seminíferos com lúmen dilatado. Aumento transitório do peso testicular relacionado ao acúmulo de fluido no testículo tem sido um achado frequente em estudos sobre compostos que afetam o balanço entre estradiol/testosterona (Hess, 1998; Oliveira et al., 2001; Victor-Costa et al., 2010). Em muitos casos, os efeitos testiculares são secundários à falha dos ductos eferentes em reabsorver o fluido proveniente dos testículos, que então se acumula nos túbulos seminíferos, induzindo degeneração do epitélio seminífero e atrofia testicular (Hess et al, 1997; Hess, 1998; Oliveira et al., 2001). De fato, as alterações na morfologia testicular foram heterogêneas entre os grupos e também entre animais de um mesmo grupo de tratamento, onde túbulos seminíferos normais colocalizaram com túbulos dilatados e atróficos, indicando

que os efeitos do tratamento são graduais e podem variar de acordo com a fisiologia de cada animal. Esses resultados apontam a necessidade de investigações também em segmentos extratesticulares do sistema genital masculino para permitir uma interpretação mais precisa se os efeitos testiculares do herbicida são primários ou secundários a alterações nas vias genitais.

Em contraste com os animais sacrificados imediatamente após a exposição crônica ao herbicida (40 dias), aqueles submetidos à recuperação apresentaram testículos com peso drasticamente reduzido, correlacionando com a totalidade dos túbulos seminíferos atrofiados. Os túbulos atróficos consistiam em sua maioria por epitélio seminífero composto apenas de células de Sertoli. Ocasionalmente foram observados túbulos atróficos com espermatogônias em mitose. Não obstante, não foram detectados espermatócitos no epitélio seminífero, indicando que apesar de ter havido uma tentativa de recuperação da espermatogênese, os efeitos provocados por atrazina foram tão drásticos que se tornaram irreversíveis dentro do período experimental investigado. Esses resultados corroboram dados da literatura, no qual o peso testicular de ratos pré-puberes não foi recuperado após interrupção da exposição à atrazina (Quignot et al., 2012a). Em conjunto esses dados revelam efeito prolongado da ação de atrazina sobre os testículos, cuja alteração na arquitetura do órgão, tanto em animais adultos quanto pré-púberes, não se refaz após interrupção da exposição, sugerindo que tais efeitos são permanentes.

Em relação à detecção da enzima 3β -HSD nas células de Leydig de animais tratados com atrazina, os dados presentes corroboram aqueles de Victor-Costa et al. (2010), indicando redução precoce da expressão dessa enzima chave na biossíntese de andrógenos, a partir de 07 dias de exposição. Esses dados corroboram a hipótese de que a redução na expressão de 3β -HSD possa representar um mecanismo alternativo através do qual atrazina, afeta a androgênese testicular, levando às alterações na espermatogênese (Victor-Costa et al., 2010). Evidências de que atrazina não afeta apenas as etapas finais no metabolismo de andrógenos vem se acumulando nos últimos anos. Nesse sentido já foi demonstrado redução de RNAm para várias proteínas envolvidas na biossíntese de andrógenos, incluindo StAR

(*steroidogenic acute regulatory protein*), SF1 (*steroidogenic factor 1*), TSPO (*translocator protein*), fosfodiesterase 4B, P450_{scc}, CYP17A1, 3 β -HSD e 17 β -HSD (Pogrmic et al., 2009; Tinfo et al., 2011; Jin et al., 2013). Não se conhece o ambiente hormonal dos testículos submetidos à recuperação da exposição a atrazina, mas esse dado seria interessante para auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos relacionados a desregulação endócrina promovida pelo herbicida.

Após exposição crônica a atrazina, foram detectadas ainda células semelhantes a macrófagos no espaço intersticial dos testículos, as quais foram fortemente marcadas pela enzima 3 β -HSD. Sabe-se que em condições normais macrófagos desempenham um importante papel no sistema genital masculino de mamíferos, estando relacionados com a estimulação da esteroidogênese pelas células de Leydig e com a manutenção do ambiente imunologicamente privilegiado dos testículos (Hutson, 1990; Nes et al., 2000; Lukyanenko et al., 2002; Chen et al., 2002; Khan e Rai, 2008). Alterações ultra-estruturais nas células de Leydig e macrófagos bem como na sua interação foram observadas em ratos adultos expostos ao herbicida atrazina (Victor-Costa et al., 2010). Dessa forma, existe a possibilidade de que essas células sejam alvo de alterações pela exposição ao herbicida.

Alteração nos níveis de aromatase só se confirmou nos testículos de animais adultos tratados com atrazina por longo período de tempo (40 dias), onde ocorreu aumento na imunomarcção da enzima. Esse resultado está em conformidade com dados da literatura, para diversos tipos celulares, que sugerem aumento na expressão e atividade da aromatase, mesmo que transitório, como mecanismo molecular plausível para justificar os efeitos adversos de atrazina (Crain et al., 1997; Sanderson et al., 2000, 2001, 2002, 2006; Hayes et al., 2002, 2006; Heneweer et al., 2004; Laville et al., 2006; Fan et al., 2007a, 2007b; Holloway et al., 2008; Quignot et al., 2012a, 2012b; Jin et al., 2013; Tinfo et al., 2011). No entanto, o aumento tardio na expressão da proteína contrasta com evidência indireta de sua maior atividade já com 15 dias de exposição a atrazina, revelada pelo aumento nos níveis testiculares e plasmáticos de estradiol e redução de testosterona, previamente detectados (Victor-Costa et al., 2010). Uma explicação possível é que a ativação de enzimas pré-existentes preceda a síntese proteica de aromatase. Tal ponto de

vista é corroborado por dados obtidos em camundongos peripuberais, nos quais os níveis de estradiol aumentaram em paralelo à atividade aromatase, sem, contudo, refletir nos níveis de RNAm da enzima, que permaneceram similares aos controles (Jin et al, 2013). Aumento da atividade aromatase induzida por atrazina sem afetar os níveis de RNAm em diversos experimentos *in vitro* é também conhecido (Laville et al., 2006; Tinfo et al., 2011). De forma similar, Holloway et al. (2008) detectaram aumento na atividade aromatase em células granulose luteínicas expostas *in vitro* a diversas dosagens de atrazina, embora os níveis protéicos da enzima permaneceram semelhantes. Em conjunto, esses dados indicam possível efeito pós-traducional de atrazina na atividade catalítica de aromatase.

Os presentes resultados para aromatase e 3 β -HSD, em conjunto com dados prévios sobre os níveis de andrógenos em ratos adultos expostos a atrazina (Victor-Costa et al., 2010), sugerem que alterações na enzima 3 β -HSD correlacionam melhor com os níveis reduzidos de testosterona e alterações adversas na estrutura testicular presentes desde os 15 dias de exposição a atrazina. Não se descarta, no entanto, a possibilidade de que o desequilíbrio em ambas as enzimas estejam contribuindo para os efeitos mais drásticos nos testículos de animais expostos cronicamente ao herbicida.

Por fim, as alterações testiculares encontradas no presente estudo sugerem desequilíbrio entre proliferação e morte celular, principalmente pela presença de células gigantes e multinucleadas com alta frequência de figuras de apoptose nos túbulos seminíferos, fato que se soma a resultados anteriores que indicam que atrazina afeta a homeostase tecidual (Manske et al., 2004; Lenkowski et al., 2008; Rey et al., 2009; Victor-Costa et al., 2010; Zhang et al., 2011; Jin et al., 2013).

Em conclusão, os resultados fornecem evidências de efeitos prolongados e irreversíveis de atrazina sobre a morfologia e esteroidogênese testicular de ratos adultos, confirmando os efeitos adversos desse herbicida como potente desregulador endócrino em vertebrados.

VI. PERSPECTIVAS

Perspectivas

Nossos dados mostram que atrazina leva a atrofia testicular e que os efeitos são prolongados após interrupção da exposição ao herbicida, tornando-se irreversíveis ao longo do tempo. Paralelo às alterações morfológicas houve redução precoce da enzima 3β -HSD, o que pode explicar a marcante redução dos níveis de testosterona em animais expostos ao herbicida. Ainda houve indução mais tardia da expressão da aromatase, o que corrobora dados *in vitro* da literatura e pode explicar o aumento dos níveis de estradiol em animais expostos a atrazina. Esses dados em conjunto confirmam atrazina como importante fator de risco para a desregulação endócrina de animais e sugerem que a inibição de 3β -HSD e indução de aromatase podem representar mecanismos através do qual esse herbicida afeta a esteroidogênese testicular, levando a infertilidade. No entanto, alguns pontos ainda merecem investigações mais profundas.

Primeiro, as alterações histopatológicas observadas nos testículos, como o aumento transitório de peso correlacionado com a dilatação dos túbulos seminíferos, seguido por grande redução no peso testicular em paralelo a uma completa atrofia do órgão podem estar relacionadas com distúrbios na fisiologia dos ductos eferentes, os quais são altamente sensíveis ao desequilíbrio nos níveis de estrógenos e seus receptores (Hess et al., 1997; Hess et al., 2000; Oliveira et al., 2001). Sabe-se que o distúrbio na reabsorção de fluido pelos ductos eferentes leva a acúmulo de fluido no lúmen e conseqüentemente no refluxo para o testículo, resultando na dilatação testicular seguida de atrofia (Hess et al., 1997). Desta forma, para melhor entender a ação da atrazina nos testículos seria de grande importância investigar as possíveis alterações morfológicas e moleculares nos ductos eferentes e epidídimos, para esclarecer se os efeitos testiculares a exposição à atrazina são primários ou decorrentes de disfunção nas vias genitais.

Ainda, após exposição crônica a atrazina, nos testículos foram detectadas células semelhantes a macrófagos no espaço intersticial, marcadas fortemente pela enzima 3β -HSD. Identificar e esclarecer a presença dessas células seria de grande relevância uma vez que elas podem estar envolvidas com o processo de fagocitose das células de Leydig que sofreram dano, sem,

no entanto, descartar a possibilidade de que as mesmas estejam engajadas na tentativa de recuperação da esteroidogênese que foi afetada.

Considerando que andrógenos têm papel central na biologia da próstata e que os estrógenos também apresentam papel importante na diferenciação e crescimento da mesma e que o desequilíbrio entre andrógenos/estrógenos pode levar a alterações histopatológicas marcantes, incluindo o desenvolvimento de neoplasias (McPherson et al., 2006; McPherson et al., 2008), pretendemos também investigar possíveis alterações na morfologia e esteroidogênese local, visando esclarecer se os efeitos de atrazina, por exemplo no níveis de aromatase e 3β -HSD, se estendem a outros órgãos do sistema genital masculino ou são restritos aos testículos.

Por fim, aprofundar as informações, esclarecendo os possíveis efeitos do herbicida sobre a proliferação e morte celular em órgãos chave, como os testículos, poderão adicionar conhecimentos sobre os possíveis mecanismos que levam aos efeitos adversos de atrazina em tecidos animais.

REFERÊNCIAS

1. Abarikwu SO, Adesiyan AC, Oyeloja TO, Oyeyemi MO, Farombi EO. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Arch Environ Contam Toxicol* 2010; 58:874-882.
2. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ÍNDICE MONOGRAFICO - A14 ATRAZINA, 1985:2.
3. Ashby J, Tinwell H, Stevens J, Pastoor T, Breckenridge CB. The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35:468-473.
4. Bardin CW, Musto N, Gunsalus G, Kotite N, Cheng SL, Larrea F, Becker R. Extracellular androgen binding proteins. *Annual review of physiology* 1981; 43:189-198.
5. Benotti MJ, Brownawell BJ. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ Pollut* 2009; 157:994-1002.
6. Betancourt M, Resendiz A, Fierro EC. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y 2006; 22:508-512.
7. Bilinska B, Schmalz-Fraczek B, Sadowska J, Carreau S. Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors alpha and beta in testicular cells--an immunohistochemical study of the bank vole. *Acta histochemica* 2000; 102:167-181.
8. Bustos-Obregon E. Ultrastructure and function of the lamina propria of mammalian seminiferous tubules. *Andrologia* 1976; 8:179-185.
9. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *The New England journal of medicine* 1997; 337:91-95.
10. Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 2010; 365:1517-1535.

11. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:35.
12. Castellano JM, Tena-Sempere M. Metabolic regulation of kisspeptin. *Advances in experimental medicine and biology*; 784:363-383.
13. Cheek AO, Vonier PM, Oberdorster E, Burow BC, McLachlan JA. Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. *Environmental health perspectives* 1998; 106 Suppl 1:5-10.
14. Chen JJ, Lukyanenko Y, Hutson JC. 25-hydroxycholesterol is produced by testicular macrophages during the early postnatal period and influences differentiation of Leydig cells in vitro. *Biology of reproduction* 2002; 66:1336-1341.
15. Christl HW. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia* 1990; 22:85-94.
16. Contreras L, Medina MH, Andrade S, Oppliger V, Correa JA. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). *Environ Pollut* 2007; 145:75-83.
17. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update* 2009; 15:213-227.
18. Crain DA, Guillette LJ, Jr., Rooney AA, Pickford DB. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental health perspectives* 1997; 105:528-533.
19. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives* 1998; 106 Suppl 1:11-56.
20. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:10972-10976.

21. Dos Santos LG, Lourencetti C, Pinto AA, Pignati WA, Dores EF. Validation and application of an analytical method for determining pesticides in the gas phase of ambient air. *Journal of environmental science and health. Part 2011*; 46:150-162.
22. Dym M. The mammalian rete testis--a morphological examination. *The Anatomical record* 1976; 186:493-523.
23. EPA USEPA. Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health (TEACH), 2006:12.
24. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochem Biophys Res Commun* 2007b; 355:1012-1018.
25. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental health perspectives* 2007a; 115:720-727.
26. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95:6965-6970.
27. Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *The Journal of endocrinology* 1997; 153:485-495.
28. Forgacs AL, D'Souza M, Huhtaniemi IT, Rahman NA, Zacharewski TR. Triazine Herbicides and Their Chlorometabolites Alter Steroidogenesis in BLTK1 Murine Leydig Cells. *Toxicol Sci* 2013.
29. Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of reproduction* 2003; 68:1554-1561.

30. Franca LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of reproduction* 1998; 59:1371-1377.
31. França, LR; Chiarini-Garcia, H. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF; Collares-Buzato CB. (Org.). *Células; uma abordagem multidisciplinar*. 1ed. Ed. Manole - Barueri - SP: Manole, 2005, v. cap.24, p. 302-324.
32. Franca LR, Parreira GG, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *Journal of andrology* 1998; 19:335-340; discussion 341-332.
33. Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, et al. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology* 2011; 24:144-159.
34. Garcia MA, Santaefemia M, Melgar MJ. Triazine residues in raw milk and infant formulas from Spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:503-510.
35. Graham-Lorence S, Khalil MW, Lorence MC, Mendelson CR, Simpson ER. Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P-450 using molecular modeling and site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266:11939-11946.
36. Haidan A, Bornstein SR, Liu Z, Walsh LP, Stocco DM, Ehrhart-Bornstein M. Expression of adrenocortical steroidogenic acute regulatory (StAR) protein is influenced by chromaffin cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2000; 165:25-32.
37. Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, de Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, Kestemont P, Kniewald J, Kniewald Z, Langlois VS, Luque EH, McCoy KA, et al. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2011; 127:64-73.
38. Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide

- atrazine at low ecologically relevant doses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99:5476-5480.
39. Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz D, Stueve T, Gallipeau S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010; 107:4612-4617.
 40. Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environmental health perspectives 2006; 114 Suppl 1:134-141.
 41. Heneweer M, van den Berg M, Sanderson JT. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. Toxicol Lett 2004; 146:183-194.
 42. Hess RA. Effects of environmental toxicants on the efferent ducts, epididymis and fertility. J Reprod Fertil Suppl 1998; 53:247-259.
 43. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1:52.
 44. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature 1997; 390:509-512.
 45. Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. Journal of andrology 2000; 21:107-121.
 46. Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Advances in experimental medicine and biology 2008; 636:1-15.
 47. Holloway AC, Anger DA, Crankshaw DJ, Wu M, Foster WG. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. J Appl Toxicol 2008; 28:260-270.

48. Hussain R, Mahmood F, Khan MZ, Khan A, Muhammad F. Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ecotoxicology (London, England)* 2010; 20:1-8.
49. Hutson JC. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biology of reproduction* 1990; 43:885-890.
50. Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *Journal of andrology* 1998; 19:65-71.
51. Janulis L, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janssen S, Asawa Y, Bahr JM. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *Journal of andrology* 1996; 17:111-116.
52. Jin Y, Wang L, Fu Z. Oral exposure to atrazine modulates hormone synthesis and the transcription of steroidogenic genes in male peripubertal mice. *General and comparative endocrinology* 2013; 184:120-127.
53. Kelch RP, Jenner MR, Weinstein R, Kaplan SL, Grumbach MM. Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *The Journal of clinical investigation* 1972; 51:824-830.
54. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, de KDM. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Elsevier, editor. *Knobil and Neill's - Physiology of Reproduction*. Third ed, 2006:827-947.
55. Khan UW, Rai U. Paracrine role of testicular macrophages in control of Leydig cell activities in the wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *General and comparative endocrinology* 2008; 156:44-50.
56. Knauer K, Leimgruber A, Hommen U, Knauert S. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 2009; 96:256-263.
57. Kniewald J, Jakominic M, Tomljenovic A, Simic B, Romac P, Vranesic D, Kniewald Z. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol* 2000; 20:61-68.

58. Laville N, Balaguer P, Brion F, Hinfray N, Casellas C, Porcher JM, Ait-Aissa S. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 2006; 228:98-108.
59. Lazaros L, Xita N, Kaponis A, Hatzi E, Plachouras N, Sofikitis N, Zikopoulos K, Georgiou I. The association of aromatase (CYP19) gene variants with sperm concentration and motility. *Asian journal of andrology* 2011; 13:292-297.
60. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters* 1999; 446:103-107.
61. Lenkowski JR, Reed JM, Deininger L, McLaughlin KA. Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental health perspectives* 2008; 116:223-230.
62. Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biology of reproduction* 1998; 58:919-926.
63. Li N, Lei L, Nian L, Zhang R, Wu S, Ren R, Wang Y, Zhang H, Yu A. A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. *Talanta* 2013; 105:219-228.
64. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986; 321:779-782.
65. Lonning PE, Geisler J. Aromatase inhibitors: assessment of biochemical efficacy measured by total body aromatase inhibition and tissue estrogen suppression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2008; 108:196-202.
66. Lukyanenko Y, Chen JJ, Hutson JC. Testosterone regulates 25-hydroxycholesterol production in testicular macrophages. *Biology of reproduction* 2002; 67:1435-1438.

67. Mann T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil* 1974; 37:179-188.
68. Manske MK, Beltz LA, Dhanwada KR. Low-level atrazine exposure decreases cell proliferation in human fibroblasts. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 46:438-444.
69. Marrian GF. Some Aspects of the Intermediary Metabolism of the Steroid Hormones: Harvey Lecture, October 20, 1938. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 1939; 15:27-42.
70. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*; 75:467-476.
71. McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 2008; 76:660-670.
72. McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2007; 148:566-574.
73. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of reproduction* 2001; 65:660-671.
74. Moss GP. NOMENCLATURE OF STEROIDS (Recommendations 1989). *Pure&App/. Chern* 1989; 61:1783-1822,.
75. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276:28969-28975.
76. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004; 145:4565-4574.

77. Nes WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quideau S, Howald WN, Pratum TK, West RR, Hutson JC. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 2000; 141:953-958.
78. Nwani CD, Lakra WS, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Srivastava SK. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *International journal of environmental research and public health*; 7:3298-3312.
79. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews* 2001; 22:289-318.
80. Oliveira CA, Carnes K, Franca LR, Hess RA. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biology of reproduction* 2001; 65:913-920.
81. Oliveira RL, Oliveira AG, Mahecha GA, Nogueira JC, Oliveira CA. Distribution of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. *General and comparative endocrinology* 2009; 161:283-292.
82. Osawa Y, Yoshida N, Fronckowiak M, Kitawaki J. Immunoaffinity purification of aromatase cytochrome P-450 from human placental microsomes, metabolic switching from aromatization to 1 beta and 2 beta-monohydroxylation, and recognition of aromatase isozymes. *Steroids* 1987; 50:11-28.
83. Papadopoulos V, Carreau S, Szerman-Joly E, Drosdowsky MA, Dehennin L, Scholler R. Rat testis 17 beta-estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *Journal of steroid biochemistry* 1986; 24:1211-1216.
84. Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, Franca LR, Brinster RL, Russell LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biology of reproduction* 1998; 59:1360-1370.
85. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of reproduction* 1995; 52:217-225.

86. Pelletier G, Dupont E, Simard J, Luu-The V, Belanger A, Labrie F. Ontogeny and subcellular localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) in the human and rat adrenal, ovary and testis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1992; 43:451-467.
87. Pogrmic K, Fa S, Dakic V, Kaisarevic S, Kovacevic R. Atrazine oral exposure of peripubertal male rats downregulates steroidogenesis gene expression in Leydig cells. *Toxicol Sci* 2009; 111:189-197.
88. Quignot N, Arnaud M, Robidel F, Lecomte A, Tournier M, Cren-Olive C, Barouki R, Lemazurier E. Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. *Reproductive toxicology*. Elmsford, N.Y 2012a; 33:339-352.
89. Quignot N, Desmots S, Barouki R, Lemazurier E. A comparison of two human cell lines and two rat gonadal cell primary cultures as in vitro screening tools for aromatase modulation. *Toxicol In Vitro* 2012b; 26:107-118.
90. Rey F, Gonzalez M, Zayas MA, Stoker C, Durando M, Luque EH, Munoz-de-Toro M. Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male Caiman latirostris. *General and comparative endocrinology* 2009; 162:286-292.
91. Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 2009; 30:57-66.
92. Robertson DM, de Vos FL, Foulds LM, McLachlan RI, Burger HG, Morgan FJ, Hearn MT, de Kretser DM. Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid. *Molecular and cellular endocrinology* 1986; 44:271-277.
93. Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, MacGregor GR. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 1998; 18:251-256.
94. RUSSEL LD, Ettlín, R. A., Hikim, A. P. S., Clegg, E. D. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1 ed. United States, 1990.
95. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annual review of biochemistry* 1994; 63:25-61.

96. Russell LD, Corbin TJ, Borg KE, De Franca LR, Grasso P, Bartke A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 1993; 133:2062-2070.
97. Russell LD, de Franca LR. Building a testis. *Tissue & cell* 1995; 27:129-147.
98. Russell LD, Kershaw M, Borg KE, El Shennawy A, Rulli SS, Gates RJ, Calandra RS. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *Journal of andrology* 1998; 19:308-319; discussion 341-302.
99. Sadowska J. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y 2010; 29:323-331.
100. Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GW, van den Berg M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182:44-54.
101. Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GW, van den Berg M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182:44-54.
102. Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, van den Berg M. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental health perspectives* 2001; 109:1027-1031.
103. Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, van den Berg M. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol Sci* 2000; 54:121-127.
104. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR. Differential expression of oestrogen receptor alpha and

- beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular human reproduction* 2001; 7:227-236.
105. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* 2003; 349:1614-1627.
 106. Setchell WGBaBP. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: Elsevier, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition ed. Australia, 2006.
 107. Sharpe RM. Local control of testicular function. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)* 1983; 68:265-287.
 108. Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental health perspectives* 1995; 103:1136-1143.
 109. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertility and sterility* 2008; 89:e33-38.
 110. Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal NR. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). *Steroids* 1998; 63:414-420.
 111. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocrine reviews* 2005; 26:525-582.
 112. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine reviews* 1994; 15:342-355.
 113. Skinner MK, Anway MD. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1061:18-32.

114. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005; 146:2976-2984.
115. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2008; 109:323-330.
116. Solomon Krb, David B. R; Richards, Peter; Dixon, Kenneth R; , Klaine Sjlj, Thomas W.; Kendall, Ronald J.; , Weisskopf Cpg, Jeffrey M.; Giesy, John P.; Hall J, Lenwood; W.Williams, W. Marty. . *Ecological Risk Assessment Of Atrazine In North American Surface Waters. Environmental Toxicology and Chemistry* 1996; 15:46.
117. Stanko JP, Enoch RR, Rayner JL, Davis CC, Wolf DC, Malarkey DE, Fenton SE. Effects of prenatal exposure to a low dose atrazine metabolite mixture on pubertal timing and prostate development of male Long-Evans rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y)* 2010; 30:540-549.
118. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *The Journal of endocrinology* 2000; 164:247-253.
119. Stocco DMaM, Michael J. *Physiology of Testicular Steroidogenesis*. In: Elsevier, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third Edition ed, 2006:40.
120. Stoker TE, Guidici DL, Laws SC, Cooper RL. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 2002; 67:198-206.
121. Stoker TE, Laws SC, Guidici DL, Cooper RL. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci* 2000; 58:50-59.
122. Suzawa M, Ingraham HA. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS One* 2008; 3:e2117.

123. Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl* 2006; 29:62-68; discussion 105-108.
124. Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environ Toxicol Chem* 2002; 21:1264-1267.
125. Tillitt DE, Papoulias DM, Whyte JJ, Richter CA. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 2010; 99:149-159.
126. Tinfo NS, Hotchkiss MG, Buckalew AR, Zorrilla LM, Cooper RL, Laws SC. Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells. *Reproductive toxicology. Elmsford, N.Y* 2011; 31:184-193.
127. Toppari J. Environmental endocrine disrupters. *Sex Dev* 2008; 2:260-267.
128. Trentacoste SV, Friedmann AS, Youker RT, Breckenridge CB, Zirkin BR. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *Journal of andrology* 2001; 22:142-148.
129. Victor-Costa AB, Bandeira SM, Oliveira AG, Mahecha GA, Oliveira CA. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive toxicology. Elmsford, N.Y* 2010; 29:323-331.
130. Zhang X, Wang M, Gao S, Ren R, Zheng J, Zhang Y. Atrazine-induced apoptosis of splenocytes in BALB/C mice. *BMC Med* 2011; 9:117.
131. Zhao HF, Labrie C, Simard J, de Launoit Y, Trudel C, Martel C, Rheaume E, Dupont E, Luu-The V, Pelletier G, et al. Characterization of rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266:583-593.

ANEXO A - CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 287/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Perfil hormonal, apoptótico e morfológico do sêmen, testículo e demais órgãos genitais de ratos adultos expostos a Atrazina**", que tem como responsável(is) **Cleida Aparecida de Oliveira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **15/ 04/2009**.

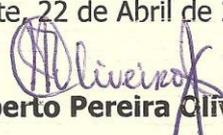
Este certificado expira-se em **15/ 04/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 287/2008**, related to the project entitled "**Hormonal, apoptotic and morphological profile of sperm, testis and other genital organs of rats exposed to Atrazine**", under the supervisors of **Cleida Aparecida de Oliveira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 15, 2009**.

This certificate expires in **April 15, 2014**.

Belo Horizonte, 22 de Abril de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br