

ANTÔNIO FRANCISCO DA SILVA LISBOA NETO

Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina

São Paulo

2020

ANTÔNIO FRANCISCO DA SILVA LISBOA NETO

Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3929
FMVZ

Lisboa Neto, Antônio Francisco da Silva
Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina / Antônio
Francisco da Silva Lisboa Neto. – 2020.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Avaliação seminal. 2. CYP19. 3. Estradiol. 4. Imunohistoquímica. 5. PCR em tempo
real. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina", protocolada sob o CEUA nº 7512260617 (ID 003941), sob a responsabilidade de **Antônio Chaves de Assis Neto e equipe; Antônio Francisco da Silva Lisboa Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2017.

We certify that the proposal "Effect of Letrozol on reproduction of male ovine species", utilizing 21 Ovines (21 males), protocol number CEUA 7512260617 (ID 003941), under the responsibility of **Antônio Chaves de Assis Neto and team; Antônio Francisco da Silva Lisboa Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [11/2017](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Ovinos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [10 a 18 meses](#)

N: [21](#)

Linhagem: [Santa Inês e Dorper](#)

Peso: [40 a 60 kg](#)

Local do experimento: O material biológico será coletado na propriedade

São Paulo, 31 de dezembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LISBOA NETO, Antônio Francisco da Silva

Título: **Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô Antônio Francisco Lisboa (in memoriam).

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos concedidas até aqui, por me proteger em vários momentos de angústia e desânimo. Deus é bom o tempo todo!

Aos meus pais Nilo Francisco Lisboa e Maria Diva da Silva Lisboa, pelo estímulo incansável, conselhos e amor incondicional. Vocês são a minha base.

Aos meus irmãos Danilo da Silva Lisboa, Daniela da Silva Lisboa, Nilo Francisco Lisboa, Douglas de Sousa Rodrigues e Ricardo Tavares.

À minha companheira Loren D'Aprile por todo amor, carinho, paciência, palavras de incentivo e conforto. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grato a Deus por ter te conhecido. Muito obrigado por tudo!

Ao meu cunhado Everson Júlio Pulgatti que abriu as portas da sua fazenda e cedeu os animais para a realização de uma parte pesquisa.

Aos meus tios e primos que acreditaram que esse sonho pudesse virar realidade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Antônio Chaves de Assis Neto que aceitou me orientar, por ter sido meu amigo, por cuidar de mim, por ter me protegido, me guiado para o caminho correto em momentos difíceis da pós-graduação e por ter acreditado em meu potencial. Obrigado por tudo professor!

Ao meu supervisor de campo, professor Dr. Antonio de Sousa Júnior por toda a dedicação e empenho em realizar as etapas de coletas de dados, pelos conselhos e palavras de incentivo.

À professora Isolda pela ajuda na coleta de dados.

Aos amigos do Colégio Técnico de Teresina, em especial Marcos Vicente, Marcelo Lopes, Clarice, Madalena Martins, Ana Clara, Edinaldo, Bárbara, Gabriel Sávio e Macarrão.

Aos colaboradores da fazenda Arraial Sr. Valdir, Sr. Zé Budega, Eduardo, Roca e Joíres.

Aos Técnicos do Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia Ronaldo Agostinho e Diogo Nader Palermo pela amizade construída durante esses anos e por todo apoio com o processamento do material do meu doutorado e colaboração com a execução das técnicas microscópicas.

À Técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos Maria Dolores S. Ferreira

(Tuca) pela contribuição com o processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos da anatomia Amilton César dos Santos, Maria Angélica Machado Arroyo, Erick Eduardo da Silveira, Helton Carlos Sabino Pereira, Túlio Teruo Yoshinaga, Rennan Lopes Olio, Poliana Garcia Corrêa, Anita Jovelina Brito de Jesus, Cristiano Batista Ribas, Arthur Martins, Antonio Alexandre Speri, Lina Castelo Branco e Bruna Koga. Construimos uma amizade forte e verdadeira, obrigado por tudo!

À farmácia de manipulação *Pharmacom* da minha prima Ludmila Elvas, que manipulou os medicamentos para o experimento.

Às secretárias do departamento Daura Vaz e Jaqueline Santana pela amizade por todos os momentos de alegria e conselhos prestados durante todo esse tempo que passei aqui.

Aos meus Professores da Universidade Federal do Piauí Prof. Dr. Augusto Augusto Nascimento Machado Júnior e Prof. Dr. Manoel Lopes da Silva Filho por manter essa amizade que mesmo de longe se torna cada vez mais forte.

Ao Prof. Dr. Marcílio Nichi e seus alunos Dr. João Diego de Agostini Losano, Raphaela Gabrielle Brito Sousa e Roberta Ferreira Leite pela contribuição com as análises seminais.

Ao amigo Me. Homero Batista da Rocha pela colaboração com a coleta de dados.

Aos colaboradores da Fazenda Malhada Vermelha: Sr. Oscar Frota, Sr. Natan Frota e família, Sr. França, Sr. Zé Maria e família, Sr. João Pedim e família, Ramon, Cabeludo, Ronaldo, Sr. Caboquim e família, Sr. Francinete e família e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram em algum momento com a minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas tu não serás atingido.”

Salmo 91:7

RESUMO

LISBOA NETO, A. F. S. **Efeito do Letrozol sobre a reprodução de machos da espécie ovina**. 2020. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito de um inibidor de aromatase não esteroide (letrozol) sobre os níveis séricos de testosterona e estradiol, circunferência escrotal, morfologia testicular, qualidade seminal, imunolocalização e expressão da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros adultos. Para isso 12 animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: G1: controle de 30 dias, G2: controle de 60 dias, G3: tratado de 30 dias e G4: tratado de 60 dias. O experimento foi dividido em duas etapas: na primeira etapa 9 carneiros adultos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, cada um contendo 3 animais. Cada grupo tomou por via oral uma dose de 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg de letrozol, respectivamente. Antes da aplicação das doses, uma amostra de sangue foi coletada através de punção da veia jugular e após 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, e 144h da administração do medicamento. A dosagem dos hormônios foi feita por radioimunoensaio. No segundo experimento a dose de 0,5 mg/kg foi administrada para os grupos diariamente por via oral e os grupos controles receberam placebo também por via oral. Foram feitas medidas de circunferência escrotal e coleta de sêmen antes do início do experimento, bem como aos 30 e 60 dias após aplicação diária do letrozol. As amostras de testículos foram submetidas ao processamento para imunohistoquímica, histologia, microscopia eletrônica de transmissão e extração de RNA para realização de PCR em tempo real e o sêmen foi avaliado por meio de testes convencionais, funcionais e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a aplicação de apenas uma dose do inibidor da aromatase por via oral causou modificações significativas nos níveis séricos de estradiol. A circunferência escrotal foi aumentada com o tratamento, bem como o diâmetro dos túbulos seminíferos. Não foram observadas alterações nos parâmetros de cinética espermática e nem alterações ultraestruturais. A imunolocalização da P450 arom nos testículos dos animais tratados com letrozol foi mais forte nas células de Leydig e nos espermatozoides. A expressão do gene CYP19 aumentou aos 30 dias de tratamento e aos 60 dias os níveis relativos de expressão da aromatase tiveram uma diminuição. Conclui-se com base nos resultados

encontrados na presente pesquisa que o tratamento com o inibidor de aromatase não esteroidal (letrozol) por via oral causa modificações nos níveis séricos de estradiol, aumenta os parâmetros de circunferência escrotal, aumenta o diâmetro dos túbulos seminíferos, causa modificações na expressão do gene CYP19, mantém ativos os sítios de imunolocalização da aromatase nos testículos, não interferindo na qualidade seminal de carneiros adultos tratados com 0,5mg/kg.

Palavras-chave: Avaliação seminal. CYP19. Estradiol. Imunohistoquímica. PCR em tempo real.

ABSTRACT

LISBOA NETO, A. F. S. **Effect of letrozole on the reproduction of males of the sheep species.** 2020. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Positive immunolocalization and expression of the enzyme P450 aromatase (P450 arom) in the testicles is indicative of local estradiol synthesis. The aim of this research was to evaluate the effect of a nonsteroidal aromatase inhibitor (letrozole) on serum testosterone and estradiol levels, scrotal circumference, testicular morphology, seminal quality, immunolocalization and expression of the enzyme P450 aromatase in adult sheep testicles. For this 12 animals were randomly divided into four groups: G1: control of 30 days, G2: control of 60 days, G3: treated of 30 days and G4: treated of 60 days. The experiment was divided into two stages: in the first stage 9 adult sheep were randomly divided into 3 groups, each containing 3 animals. Each group took orally a dose of 0.1mg/kg, 0.5mg/kg and 1.0mg/kg of letrozole, respectively. Before the application of doses, a blood sample was collected through puncture of the jugular vein and after 30 minutes, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10am, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, and 144h after. The dosage of hormones was performed by radioimmunoassay. In the second experiment the dose administered to the groups was 0.5 mg/kg daily orally and the control groups received placebo also orally. Measurements of scrotal circumference were taken before the beginning of the experiment and semen collection, as well as at 30 and 60 days of daily application of letrozole. Test samples were submitted to processing for immunohistochemistry, transmission electron microscopy and RNA extraction for real-time PCR and semen was evaluated by conventional and functional tests and transmission electron microscopy. The results showed that the application of only one dose of the aromatase inhibitor orally caused significant changes in serum estradiol levels. The scrotal circumference was increased with treatment, as well as the diameter of the seminiferous tubules, however, no alterations in the parameters of sperm kinetics were observed. The immunolocalization of P450 arom in the testicles of animals treated with letrozole was stronger in Leydig cells and spermatocytes. Cyp19 gene expression increased at 30 days of treatment, but at 60 days the relative levels of aromatase expression decreased. It is concluded based on the results found in the present research that treatment with nonsteroidal aromatase inhibitor (letrozole) orally causes changes in serum estradiol levels,

increases the parameters of scrotal circumference, increases the diameter of the seminiferous tubules, causes changes in the expression of the CYP19 gene, keeps active the immunolocalization sites of aromatase in the testicles, not interfering in the seminal quality of adult sheep treated with 0.5mg/kg.

Keywords: Seminal evaluation. CYP19. Estradiol. Immunohistochemistry. REAL-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Pesagem dos animais (A), coleta de sangue (B), centrífuga utilizada para separar o soro (C) e separação do soro para estocagem (D)42
- Figura 2 - Administração por via oral de dose do Letrozol nos ovinos (*Ovis aries*)... 43
- Figura 3 - Delineamento para a primeira etapa do experimento, com o tempo de aplicação do letrozol e das coletas de sangue44
- Figura 4 - Treinamento para o condicionamento e coleta de sêmen utilizando vagina artificial46
- Figura 5 - Dosagem da concentração sérica de estradiol em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral. A – grupo que recebeu 0,1mg/kg; B – grupo que recebeu 0,5mg/mg; C – grupo que recebeu 1,0mg/kg. * difere estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet55
- Figura 6 - Médias das concentrações séricas de estradiol em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral nos momentos 0, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Os gráficos mostram a comparação entre as doses 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.....57
- Figura 7 - Dosagem da concentração sérica de testosterona em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral. A – grupo que recebeu 0,1mg/kg; B – grupo que recebeu 0,5mg/mg; C – grupo que recebeu 1,0mg/kg. * difere estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.....58
- Figura 8 - Médias das concentrações séricas de testosterona em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral nos momentos 0, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Os gráficos mostram a comparação entre as doses 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente a 5%.....59
- Figura 9 - Médias de circunferência escrotal (cm) de carneiros do grupo controle e tratamento nos momentos: antes do início do experimento (A), 30 dias após o início do tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (B) e 60 dias após o início do tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (C). (*) difere estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.....63

- Figura 10 - Dosagem dos hormônios estradiol (A) e testosterona (B) de carneiros tratados com 0,5mg/kg de letrozol por via oral durante 30 e 60 dias 64
- Figura 11 - Médias da área dos túbulos seminíferos (μm^2) dos três grupos estudados. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade 65
- Figura 12 - Morfometria dos testículos de carneiros do grupo controle (A e B), 30 dias de tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (C e D) e 60 dias de tratamento com 0,5mg/kg letrozol por via oral (E e F) 66
- Figura 13 - Ultraestrutura dos testículos dos animais dos grupos controles. (A): S: Célula de Sertoli; Pq: espermatócito em paquíteno. (B): S: Célula de Sertoli. (C): n: núcleo da célula de Sertoli. (D): Zg: espermatócito em zigóteno. (E): n: núcleo da espermatíde arredondada; seta: acrossomo em formação. (F): e: espermatíde alongada; seta: corpos residuais. Eletromicrografia, método MET 68
- Figura 14 - Ultraestrutura dos testículos de carneiros que receberam 0,5mg/kg de letrozol por via oral diariamente durante 30 dias. (A): Zg: Espermatócito em zigóteno. (B): a: espermatíde arredondada; e: espermatíde alongada. (C): a: espermatíde arredondada; seta: acrossomo. (D): n: núcleo da espermatíde; e: espermatíde arredondada. (E): s: célula de Sertoli; seta: núcleo da célula de Sertoli. (F): s: célula de Sertoli; a: espermatíde alongada; e: espermatíde arredondada. Eletromicrografia, método MET 69
- Figura 15 - Ultraestrutura dos testículos de carneiros que receberam 0,5mg/kg de letrozol por via oral diariamente durante 60 dias. (A): e: Espermatogônia. (B): a: espermatíde alongada. (C): n: núcleo da espermatíde; seta: acrossomo. (D): e: espermatíde arredondada; seta branca: complexo de Golgi. (E): c: cauda do espermatozoide; r: corpo residual. (F): Pq: espermatócito em paquíteno. Eletromicrografia, método MET 70
- Figura 16 - Ultraestrutura dos espermatozoides de carneiros. (A): Grupo controle: setas: mitocôndria. (B): Grupo controle: m: mitocôndria. (C): Grupo 30 dias. (D): Grupo 30 dias: n: núcleo do espermatozoide; seta: mitocôndria. (E e F): Grupo 60 dias. Eletromicrografia, método MET 71

| | |
|---|----|
| Figura 17 - Imunolocalização da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros. | 72 |
| Figura 18 - Expressão do gene CYP19 nos testículos de carneiros entre os grupos controle (A), grupos tratamentos (B), controle e tratamento por 30 dias (C) e controle e tratamento por 60 dias (D) | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Delineamento do tratamento com três doses de Letrozol (0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg), aplicados por via oral em ovinos (<i>Ovis aries</i>) | 43 |
| Tabela 2 - <i>Primers</i> com as respectivas sequências utilizadas para qRT-PCR | 54 |
| Tabela 3 - Efeito do letrozol sobre avaliação funcional de sêmen criopreservado de carneiros (<i>Ovis aries</i>) em função do tempo..... | 60 |
| Tabela 4 - Efeito do letrozol sobre as variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de carneiros (<i>Ovis aries</i>) em função do tempo | 62 |
| Tabela 5 - Efeito do letrozol sobre a morfologia espermática em sêmen criopreservado de carneiros (<i>Ovis aries</i>) em função do tempo..... | 62 |
| Tabela 6 - Imunolocalização da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros do grupo controle e tratados com letrozol durante 30 e 60 dias | 74 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados | 48 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 26 |
| 2.1 REVISÃO ANATÔMICA..... | 26 |
| 2.2 CONTROLE DA ESPERMATOGÊNESE..... | 28 |
| 2.3 ATUAÇÃO DOS INIBIDORES DE AROMATASE SOBRE OS TESTÍCULOS..... | 30 |
| 2.4 AÇÃO DOS INIBIDORES DE AROMATASE NO CÉREBRO..... | 35 |
| 3 HIPÓTESE..... | 39 |
| 4 OBJETIVO..... | 40 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODO..... | 41 |
| 5.1 ETAPAS DA PESQUISA..... | 41 |
| 5.1.1 Primeira etapa (I)..... | 41 |
| 5.1.1 Segunda etapa (II)..... | 45 |
| 5.1.2.1 Treinamento para as coletas de sêmen..... | 45 |
| 5.1.2.2 Coleta de sêmen..... | 46 |
| 5.1.2.2.1 Avaliação do sêmen..... | 47 |
| 5.1.2.2.1.1 Testes convencionais..... | 47 |
| 5.1.2.2.1.1.1 Análise computadorizada da motilidade (CASA)..... | 48 |
| 5.1.2.2.1.2 Testes funcionais..... | 48 |
| 5.1.2.2.1.2.1 Integridade acrossomal..... | 48 |
| 5.1.2.2.1.2.2 Integridade de membrana plasmática..... | 49 |
| 5.1.2.2.1.2.3 Atividade mitocondrial..... | 49 |
| 5.1.2.2.1.2.4 Resistência do espermatozoide ao estresse oxidativo..... | 50 |
| 5.1.2.3 Circunferência escrotal..... | 51 |
| 5.1.2.4 Dosagem hormonal..... | 51 |
| 5.1.2.5 Avaliação histológica..... | 51 |
| 5.1.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão..... | 53 |
| 5.1.2.7 Imunohistoquímica..... | 53 |
| 5.1.2.8 PCR em tempo real..... | 54 |
| 5.1.2.8.1 Análise estatística..... | 54 |
| 6 RESULTADOS..... | 55 |
| 6.1 PRIMEIRA ETAPA (I) – DOSAGEM HORMONAL..... | 55 |

| | |
|--|------------|
| 6.2 SEGUNDA ETAPA (II) – COLETA DE SÊMEN..... | 59 |
| 6.2.1 Avaliação do sêmen..... | 60 |
| 6.3 SEGUNDA ETAPA (II) – CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL..... | 63 |
| 6.4 SEGUNDA ETAPA (II) – DOSAGEM HORMONAL..... | 63 |
| 6.5 SEGUNDA ETAPA (II) – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA..... | 64 |
| 6.6 SEGUNDA ETAPA (II) - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.. | 67 |
| 6.7 SEGUNDA ETAPA (II) – IMUNOHISTOQUÍMICA..... | 72 |
| 6.8 SEGUNDA ETAPA (II) – PCR EM TEMPO REAL..... | 74 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 78 |
| 8 CONCLUSÕES..... | 86 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |
| APÊNDICES | 102 |

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal contribuíram com o avanço do melhoramento genético de rebanhos destinados à produção. Nesse sentido, a ovinocultura vem se destacando em todos os continentes, com exceção da Antártida, principalmente por apresentarem facilidade de adaptação aos diferentes tipos de relevo, clima e vegetações (VIANA, 2008; LISBOA NETO, 2015). Apesar da evolução de biotecnologias relacionadas à inseminação artificial em animais domésticos nos últimos anos, essa técnica ainda é pouco difundida nos pequenos ruminantes (MAIA, 2015).

A seleção do reprodutor é feita através da determinação da libido e de sua capacidade fecundante, características seminais e conseqüentemente a viabilidade espermática. Os órgãos do sistema reprodutor masculino incluem um par de gônadas, os testículos, responsáveis pela espermatogênese e esteroidogênese (GABALDI e WOLF, 2002); o epidídimo que possui a função de armazenamento, transporte e maturação dos espermatozoides; o ducto deferente e as glândulas genitais acessórias; a uretra que transporta tanto o sêmen quanto a urina; e o pênis (ELLENPORT, 1986; DYCE et al., 2004). No testículo ocorre a produção, armazenamento e transporte de espermatozoides, configurando sua função exócrina; e a produção dos hormônios andrógenos regulados por uma atividade endócrina, (MURTA et al., 2013).

A espermatogênese é um processo complexo de extrema importância para a fertilidade masculina (SCHLATT et al., 2016), envolvendo interações entre os elementos estruturais dos testículos e o sistema endócrino (MCLACHLAN, 2000), em que as espermatogônias sofrem mitose, meiose e espermiogênese (SURESH et al., 2015). Esse processo é mediado por hormônios que interagem com o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, tendo seu início na vida pré-natal e continua na puberdade até a vida adulta (MCLACHLAN, 2000). Um hormônio é uma substância química orgânica, produzido pelo tecido glandular endócrino em parte do corpo ou em um órgão e transferido pelo sangue, linfa ou fibras nervosas a uma distância de seu local de ação para outra parte do corpo ou para outro órgão que ele excita ou inibe (VENZKE, 1986; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O desenvolvimento reprodutivo normal em mamíferos é criticamente dependente de propriedades reguladas pela biossíntese dos hormônios esteroides, sendo que o balanço entre a produção de andrógenos e estrógenos, além de estar relacionado com esse desenvolvimento, relaciona-se diretamente com o estado fisiológico e bem-estar em ambos os sexos (CONLEY e HINSHELWOOD, 2001).

O colesterol é o precursor dos hormônios esteroides sexuais (SANTOS et al., 2015). Os andrógenos e estrógenos são sintetizados pelas enzimas microssomais 17 α -hidroxilase/17,20-liase (P450c17) e aromatase citocromo P450 (P450arom), respectivamente (PRAPORSKI et al., 2009). Uma possível falha nesse balanço pode causar alterações no desenvolvimento normal levando a várias alterações no desenvolvimento da genitália externa (YANG et al., 2010).

A maioria das enzimas esteroidogênicas são membros do grupo oxidase citocromo P450, que são enzimas oxidativas, possuindo cerca de 500 aminoácidos e contém um único grupo heme (MILLER, 2009). A P450 arom está presente no retículo endoplasmático de grande parte dos tecidos do corpo. Estudos em seres humanos, tem enfatizado seu papel no processo de diferenciação sexual, na formação da estrutura óssea e no metabolismo lipídico (CARREAU et al., 2006). Em adição, a P450 arom é um complexo enzimático que catalisa a síntese de estrógenos a partir de andrógenos, tendo um potencial único que influencia o equilíbrio entre hormônios esteroides sexuais (CONLEY e WINSHELWOOD, 2001).

Nas gônadas masculinas a P450 arom desempenha um papel importante na conversão de andrógenos em estrógenos. Esse processo é crucial para a manifestação do potencial de fecundação dos espermatozoides. Carreau et al. (2012) estudaram o papel da síntese de estrógeno sobre a fertilidade do macho e relataram o papel da P450 arom no processo espermatogênese e na qualidade do sêmen. Além disso, a biossíntese de estrógenos em espermatozoides ejaculados é um processo autônomo que pode influenciar a função espermática (SAID et al., 2014).

Durante muito tempo os estrógenos foram considerados hormônios exclusivos do sexo feminino, entretanto seu papel na diferenciação, espermatogênese e esteroidogênese é apoiado por investigações feitas em humanos e roedores, sendo necessários para a realização das funções testiculares normais (LARDONE et al., 2010).

Os estrógenos possuem 18 átomos de carbono e são substâncias que podem ser produzidas a partir de andrógenos em células da camada granular do folículo

ovariano. Além disso, podem ser sintetizados a partir dos testículos por intermédio da aromatase (SIMPSON et al., 2002), nos túbulos seminíferos e células germinativas (HESS, 2003; SIMPSON et al., 2005; CARREAU et al., 2006).

O estudo pioneiro sobre a presença de estrógenos em machos foi documentado por Zondek em 1934, mostrando a presença de estrógenos na urina de garanhões (CARREAU et al., 1999).

Através da diminuição dos níveis de estrógeno endógeno no intervalo pós-natal, é possível aumentar o número de células de Sertoli e conseqüentemente a capacidade de produção de espermatozoides pelos testículos (BERGER e CONLEY, 2014). Esses efeitos podem ser obtidos através da utilização de agentes que bloqueiam a biossíntese de estrógeno pela supressão da atividade da aromatase (BUZDAR et al., 2006). Os inibidores da aromatase têm sido utilizados em experimentos para avaliar os efeitos do estradiol no organismo (BERTELLI, 2005). Eles foram primariamente desenvolvidos como uma estratégia comprovadamente eficaz, no sentido de reduzir os níveis séricos de estrógenos em mulheres após a menopausa. Eles impedem a aromatização dos andrógenos em estrógenos, especificamente a conversão de testosterona e androstenediona em estradiol e estrona, respectivamente (SAAD et al., 2002).

O primeiro inibidor de aromatase utilizado em estudos clínicos foi a aminoglutetimida, desenvolvida inicialmente para tratar mulheres com câncer de mama (MASAMURA et al., 1995). Estudos realizados por Haynes et al. (2003); Lonning (2003) e Bhatnagar (2007), comparando os diversos inibidores de aromatase demonstraram que o letrozol é o mais potente, atuando de forma seletiva e impedindo a síntese de estrógeno intracelular, podendo reduzir seus níveis em até 99%. O letrozol inibe a síntese de estrógenos por meio do bloqueio da P450 arom de forma seletiva, não afetando outras vias esteroidogênicas e pode reduzir significativamente esses níveis hormonais (BHATNAGAR, 2007).

Apesar da existência de trabalhos testando a ação do letrozol sobre a esteroidogênese e espermatogênese em suínos (RAMESH et al., 2007; BERGER et al., 2013; ZAMARATSKAIA e BERGER, 2014), garanhões (STEIN et al., 2002), peixes (SHEN et al., 2013) e seres humanos (RONDE e JONG, 2011), os estudos envolvendo a atuação desse inibidor da aromatase sobre aspectos reprodutivos em ovinos não foram encontrados na literatura. Dessa forma, a presente pesquisa mostra, pela primeira vez, o efeito do letrozol sobre os parâmetros reprodutivos, tais como

circunferência escrotal, microscopia de luz e eletrônica de transmissão, cinética espermática, imunolocalização e expressão da P450 arom nos testículos de machos da espécie ovina, além de um estudo sobre a atuação desse medicamento sobre os níveis séricos de testosterona e estradiol.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REVISÃO ANATÔMICA

A reprodução dos mamíferos é regulada e controlada pelos sistemas nervoso e endócrino que se relacionam com o hipotálamo, formando o eixo porta-hipotálamo-hipofisário, coordenando a função das gônadas. Assim estes sistemas funcionam no sentido de iniciar, coordenar ou regular as funções do sistema reprodutivo. O hipotálamo compreende a região do terceiro ventrículo cerebral, estendendo desde o quiasma óptico aos corpos mamilares. As conexões neurais existentes nesta região são responsáveis pela comunicação entre o hipotálamo e o lobo posterior através do trato hipotálamo-hipofisário e conexões vasculares entre o hipotálamo e o lobo anterior da hipófise (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A hipófise é uma glândula pequena, presente em todos os vertebrados. Ocupa a fossa hipofisária da sella túrcica no corpo do osso basisfenoide. Sua parte distal secreta somatotropina, tirotropina, adrenocorticotropina, prolactina e gonadotropinas, que exercem efeitos sobre as gônadas, regulando a espermatogênese e a esteroidogênese (VENZKE, 1986).

Os órgãos genitais masculinos compreendem os testículos, epidídimo, ducto deferente, glândulas acessórias, pênis e as modificações cutâneas escroto e prepúcio. Os testículos são responsáveis pela formação dos espermatozoides e pela síntese de hormônios esteroides sexuais. O epidídimo realiza a maturação espermática. Enquanto o ducto deferente é encarregado pelo transporte dos espermatozoides prontos até a uretra. As glândulas acessórias secretam os fluidos seminais e o pênis desempenha a função de órgão copulador.

Do ponto de vista morfofuncional, os testículos são divididos em dois compartimentos (MARTINS, 2006): no parênquima testicular localizam-se os túbulos seminíferos que contém o epitélio germinativo, que ocupa 77 a 86% do volume testicular (QUEIROZ e CARDOSO, 1989; WROBEL et al., 1995), e o tecido intersticial, formado por tecido conjuntivo ou espaço interlobular onde se localizam as células de Leydig produtoras de andrógenos (EVANS e MAXWEL, 1990).

O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda, com função de transporte, maturação e estocagem de espermatozoides. A estocagem acontece na cauda, sendo que o transporte é feito pelo epitélio ciliado dos ductos eferentes e das contrações do ducto epididimário. A maturação acontece durante a passagem no epidídimo e a motilidade vai aumentando à medida que os espermatozoides entram no corpo e a capacidade de fertilização aumenta quando entram em contato com o ambiente da cauda do epidídimo e só termina quando os espermatozoides alcançam o trato genital feminino (EVANS e MAXWEL, 1990; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Durante o processo de maturação os espermatozoides sofrem reações bioquímicas, além da troca e reabsorção de fluidos, favorecendo a maturação e capacitação (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

As glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais são as glândulas sexuais acessórias (CAMPOS et al., 2003). Juntas formam o plasma seminal, sendo este um fluido de extrema importância para a qualidade seminal. As ampolas dos ductos deferentes são dilatações na sua extremidade uretral, que também possuem a função de armazenar os espermatozoides antes da ejaculação (BARIL et al., 1993).

O órgão copulador do macho é o pênis. Ele pode ser do tipo musculocavernoso em carnívoros e equídeos ou fibroelástico em suínos e ruminantes (ELLENPORT, 1986), de aspecto cilíndrico, estendendo-se desde o arco isquiático até a região umbilical. Em pequenos ruminantes seu tamanho pode variar de 30 a 40 cm e parte do seu corpo forma uma estrutura chamada flexura sigmoide (NUÑEZ, 1993). O pênis possui grande inervação e é cheio de fibras sensoriais. Sua extremidade possui uma estrutura denominada apêndice filiforme ou processo uretral, presente apenas nos pequenos ruminantes. No momento da ejaculação o processo uretral gira rapidamente projetando e aspergindo o sêmen na parte anterior da vagina (EVANS e MAXWELL, 1990).

2.2 CONTROLE DA ESPERMATOGÊNESE

O controle da espermatogênese se dá em três níveis: 1) fatores reguladores hipotalâmicos, que alcançam a hipófise anterior através do sistema de vasos porta-hipofisários, começando com a ação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH); 2) os hormônios secretados pela hipófise: Hormônio Luteinizante (LH) e o Hormônio folículo-estimulante (FSH). Estes hormônios estimulam as células de Leydig a secretarem testosterona e, assim, regular a espermatogênese, respectivamente; 3) hormônios sexuais secretados pelos testículos, que são coletivamente chamados de androgênios, como a testosterona em maior quantidade, diidrotestosterona e androstenediona (GONÇALVES et al., 2008). O processo de formação dos gametas masculinos que são os espermatozoides é dividido em três etapas: a espermatogoniogênese, a espermatocitogênese e a espermiogênese. A espermatogoniogênese ocorre ainda durante a fase embrionária, onde certas células são selecionadas como progenitoras de gametas. Nesta fase as células, que são diploides e indiferenciadas, começam a se multiplicar por sucessivas mitoses originando as espermatogônias. A primeira divisão origina duas outras espermatogônias também diploides, sendo que uma delas permanecerá de reserva substituindo a espermatogônia que iniciou o processo, chamada de espermatogônia tronco. A outra espermatogônia (do tipo A) sofrerá várias transformações, até o tipo intermediária e espermatogônia do tipo B (GONÇALVES et al., 2008).

Na fase de espermatocitogênese, os espermatócitos primários resultantes da divisão das espermatogônias do tipo B entram em meiose, que se inicia a partir da puberdade (GONÇALVES et al., 2008). Os espermatócitos primários duplicam seu DNA e passam por progressivas modificações nucleares da prófase meiótica que se subdivide em cinco fases denominadas de pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno antes da divisão para formar os espermatócitos secundários. Esses espermatócitos secundários se dividem para formar as espermatídes, que são células haploides (GONÇALVES et al., 2008; HAFEZ e HAFEZ, 2004; O'DONNELL et al., 2001; GRIER et al., 2000).

Na espermiogênese, as espermatídes arredondadas são transformadas em espermatozoides por meio de uma série de transformações morfológicas

progressivas, incluindo a condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozoide e desenvolvimento do acrossoma (HAFEZ e HAFEZ, 2004), remodelação e alongamento do núcleo e a remoção do citoplasma antes do lançamento da espermátides durante a espermição (LEBLOND e CLERMONT, 1952).

A espermição consiste na liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (RUSSELL, 1993). Após a liberação dos espermatozoides, os resíduos são fagocitados pelas células de Sertoli, reciclando os componentes protoplasmáticos. Este evento garante a constante liberação e transporte de espermatozoides (HAFEZ e HAFEZ, 2004; JOHNSON, 1991).

Assim, a espermatogênese ocorre em ciclos divididos em diferentes segmentos do epitélio seminífero, sendo que é possível constatar a presença da mesma associação celular em um dado segmento do epitélio seminífero, ocorrendo dessa forma, pelo menos um ciclo espermatogênico completo em cada segmento. O processo completo da espermatogênese varia de acordo com a espécie (GONÇALVES et al., 2008).

O controle da espermatogênese é feito de modo endócrino ou parácrino. A secreção de GnRH pelo hipotálamo estimula a hipófise a sintetizar FSH e LH e uma ação da testosterona, produzida pelas células de Leydig nos testículos (KRETZER et al., 1998). Esses hormônios são responsáveis pela diferenciação sexual, ciclo reprodutivo dos mamíferos (SANTOS et al., 2015) e pelos mecanismos de feedback positivo e negativo entre as gônadas e o eixo hipotalâmico-hipofisário (COSTANZO, 1998; NORMAN e LITWACK, 1997).

Assim, para o início e manutenção da espermatogênese é necessária a secreção de gonadotrofinas provenientes da hipófise, sendo que o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular faz parte desse mecanismo (O'DONNELL et al., 2001). A testosterona é produzida pelas células de Leydig em resposta à estimulação pelo hormônio luteinizante (LH) e atua como um fator parácrino que se difunde para dentro dos túbulos seminíferos. De forma contrária, a testosterona que é necessária para a manutenção da espermatogênese e fertilidade dos machos (SMITH e WALKER, 2014), envia um feedback negativo sobre o hipotálamo e a hipófise, regulando a secreção de gonadotrofinas (O'DONNELL et al., 2001). A inibina, produzida pelas células de Sertoli, exerce feedback negativo para a produção de FSH, bloqueando sua produção pela hipófise (STANBENFELD e EDQVIST, 1996).

2.3 ATUAÇÃO DOS INIBIDORES DE AROMATASE SOBRE OS TESTÍCULOS

Os testículos de adultos possuem dois papéis importantes que são a produção de espermatozoides e a secreção de testosterona, que é necessária também para a expressão das características sexuais secundárias. Essas funções são dependentes de um estímulo produzido pelas gonadotrofinas, que são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH) produzidos pela hipófise, estimulados pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), produzido pelo hipotálamo. Dessa forma, em machos vertebrados, a testosterona que é secretada pelas células de Leydig induzida pelo estímulo de LH, é crítica para a espermatogênese e estimula outros traços reprodutivos (MCLACHLAN et al., 1996).

Dentre as várias características importantes que esse hormônio exerce sobre o corpo, desde a manifestação das características sexuais secundárias, a testosterona possui papel importante na manutenção da barreira hemato-testicular (MENG et al., 2005), induz a meiose e o desenvolvimento pós-meiótico de células germinativas (DOHLE et al., 2003) e inibe a apoptose de células germinativas (SINGH et al., 1995).

A aromatase é uma enzima que catalisa a etapa final da biossíntese de estrógenos (BHATNAGAR, 2007) e está presente no retículo endoplasmático de grande parte dos tecidos do corpo (CARREAU et al., 2006), incluindo as gônadas masculinas (CARREAU et al., 2012), tendo um potencial único que influencia o equilíbrio entre os hormônios esteroides (CONLEY e WINSHELWOOD, 2001), responsáveis pelo mecanismo de feedback positivo e negativo entre as gônadas e o eixo hipotalâmico-hipofisário (COSTANZO, 1998).

Os hormônios esteroides são substâncias essenciais no controle endócrino e estão envolvidos na diferenciação sexual e nos processos reprodutivos em mamíferos (CONLEY e HINSHELWOOD, 2001), podendo ser produzidos pelas gônadas masculinas e femininas, glândulas adrenais, e durante a gestação pela placenta (SANTOS et al., 2015). Esses hormônios são responsáveis pelo mecanismo de feedback positivo e negativo existente entre as gônadas e o eixo hipotalâmico-hipofisário (COSTANZO, 1998).

Os testículos são compostos pelos túbulos seminíferos e o espaço intersticial, situado entre os túbulos. As células germinativas são rodeadas e nutridas pelo

citoplasma das células de Sertoli nos túbulos seminíferos. As células de Leydig que sintetizam testosterona estão presentes somente no espaço intersticial. A enzima primária envolvida na esteroidogênese testicular, a 3 β -HSD (hydroxysteroid dehydrogenase), é um marcador para a capacidade funcional das células de Leydig. No entanto, é tradicionalmente bem aceito que em machos adultos as células de Leydig também sintetizam estrógenos, no entanto em animais imaturos, as células de Sertoli são as responsáveis pela síntese de estrógenos (TSAI-MORRIS et al., 1985).

Dentro dos testículos de ratos, as células de Leydig expressam aromatase, bem como células de Sertoli imaturas. As células de Leydig são o maior sítio de síntese de estrógenos em testículos de ratos adultos, contudo em ratos jovens existe baixa atividade de aromatase nessas células (TSAI-MORRIS et al., 1985).

No entanto, muitos estudos envolvendo a inibição da aromatização tem mostrado um consistente e rápido aumento nas concentrações de testosterona, com aproximadamente 50% em humanos (BHATNAGAR et al., 1992; TRUNET et al. 1993; HAYES et al., 1999), primatas (ELLINWOOD et al., 1984; SHETTY et al., 1998) e cães (JUNIEWICZ et al., 1988).

O primeiro inibidor de aromatase utilizado em estudos clínicos foi a aminoglutetimida, que foi desenvolvida inicialmente para tratar mulheres com câncer de mama (MASAMURA et al., 1995), contudo esse medicamento mostrou pouca seletividade para o bloqueio da aromatase (HAUSLER et al., 1989), inibindo a síntese de cortisol, aldosterona e hormônio tireoide (PITTMAN e BROWN, 1966) e induzindo a síntese de enzimas hepáticas (MURRAY et al., 1993).

A segunda geração de inibidores de aromatase inclui o inibidor não esteroide fadrozole e o inibidor esteroide formestano (BHATNAGAR, 2007). O fadrozole foi considerado superior à aminoglutetimida em termos de potência, seletividade e segurança (SANTEN et al., 1991).

Winter et al. (1983) estudaram a importância da conversão da testosterona em estradiol sobre o controle da secreção de gonadotrofinas em cães usando o inibidor de aromatase aminoglutetimida. Os autores perceberam que a aromatização da testosterona em estradiol é um passo necessário para a regulação dos níveis de LH.

Os níveis da relação testosterona-estradiol melhoram em homens inférteis durante o tratamento com inibidores de aromatase. Um estudo realizado em homens inférteis, testou os efeitos do inibidor de aromatase anastrozole e testolactona sobre os parâmetros seminais e perfis hormonais com relação testosterona-estradiol

anormais. Os resultados mostraram um aumento na concentração espermática, índice de motilidade dos espermatozoides. Além disso, um melhoramento nos parâmetros hormonais também foi notado. Essas mudanças sugerem que homens inférteis com uma baixa relação testosterona-estradiol sérica podem ser tratados com inibidores de aromatase, como anastrozole e testolactona (RAMAN e SCHLEGEL, 2002).

Em peixes o sexo pode ser revertido na fase indiferenciada pela administração de estrógeno exógeno ou bloqueio da síntese de estrogênio endógeno com inibidores de aromatase. Isso pode ser amplamente utilizado para o controle do sexo na aquicultura (LI et al., 2018).

Homens com defeitos na produção espermática possuem excesso de atividade de aromatase, refletida por baixa concentração de testosterona e elevados níveis de estradiol sérico. Dessa forma os inibidores de aromatase podem aumentar a produção de testosterona endógena e níveis de testosterona sérica (SCHLEGEL, 2012).

Estudos envolvendo a inibição crônica da aromatização em ratos, cães ou primatas tiveram resultados diferentes. A administração de letrozol em ratos machos adultos por 6 meses foi relatada não ter efeitos sobre os testículos, mas o tratamento de cães por 3 meses resultou em hiperplasia/hipertrofia das células de Leydig e bloqueio da espermatogênese (JUNKER WALKER e NOGUES, 1994). Isto está em contraste com o tratamento de cães com fadrozole por 6 meses, em que não teve efeito sobre a contagem espermática ou morfologia testicular (JUNIEWICZ et al., 1988). Tratamento de macacos adultos a longo prazo com um análogo do letrozol resultou em uma redução de 90% na produção espermática depois de um tratamento por 55 dias; a análise de citometria de fluxo demonstrou uma redução no número de espermátides alongadas e arredondadas, implicando um defeito na espermiogênese (SHETTY et al., 1998).

No estudo de Turner et al. (2000), o tratamento com anastrozole em ratos adultos induziu um aumento de 50% nas concentrações de testosterona, o que é similar ao observado em cães, primatas e humanos, sugerindo que o rato macho não difere dessas espécies nesse aspecto. O peso dos testículos foi significativamente aumentado pelo tratamento crônico com anastrozole, no entanto, para a maioria dos animais, não foi observada deficiência na espermatogênese. Ocasionalmente foram observadas anormalidades nos túbulos seminíferos depois do tratamento por 10 ou 19 semanas e 1 ano, mas em geral a espermatogênese permaneceu normal na maioria dos animais tratados.

Outros estudos foram incapazes de demonstrar um efeito sobre a secreção de testosterona em ratos adultos depois da administração de inibidores de aromatase, incluindo anastrozole e fadrozole, por 1 ou 2 semanas (BHATNAGAR et al., 1992; PLOURDE et al., 1994). O tratamento com fadrozole em ratos púberes por 60 dias seguidos de um período de recuperação de 30 dias, não teve efeito subsequente sobre a fertilidade (NUNEZ et al., 1996).

Mensurações das concentrações de testosterona na veia testicular de ratos tratados por 19 semanas com anastrozole demonstraram que a concentração de testosterona intratesticular foram também significativamente aumentadas em comparação com os animais do grupo controle (TURNER et al., 2000).

Em Javalis, a administração do letrozol no começo do período neonatal promove a proliferação de células de Sertoli em 25% e aumento da produção espermática (BERGER e CONLEY, 2014).

Para avaliar os efeitos sobre a espermatogênese em galos, Adeldust et al. (2017) fizeram um estudo randomizado utilizando letrozol, extrato vegetal à base de *Tribulus*, *Cinnamomum*, *Zingiber* e *Sativus* ou a combinação do inibidor de aromatase e o extrato vegetal. Os resultados do estudo mostraram que apesar do peso corporal não ter sido afetado pelo tratamento, os testículos dos animais tratados com a combinação do letrozol e extrato vegetal foram mais pesados do que aqueles do grupo controle. Em adição, os animais tratados com letrozol, ou extrato vegetal ou a combinação destes, mostraram um aumento significante no número de células espermáticas dentro dos túbulos seminíferos e epidídimos do que os animais do grupo controle, concluindo que, tanto o letrozol como o extrato vegetal podem melhorar a produção de células espermáticas em galos adultos.

O primeiro caso de indução da espermatogênese em homens com azoospermia não obstrutiva usando letrozol foi relatado por Patry et al. (2009). O tratamento foi feito durante quatro meses e teve como resultado o aumento do número de espermatozoides nesse paciente.

Cavallini et al. (2011) avaliaram se o tratamento com letrozol melhora a contagem espermática em homens com azoospermia não obstrutiva, tratados diariamente durante 3 meses. Os resultados mostraram que todos os pacientes apresentaram espermatozoides no ejaculado, aumentando os níveis séricos de gonadotropinas e testosterona, diminuindo os níveis de estradiol. Os autores

concluíram que o tratamento com letrozol pode melhorar a contagem espermática em pacientes com azoospermia não obstrutiva.

Um estudo realizado com o objetivo de examinar se o letrozol pode normalizar os níveis séricos de testosterona em homens severamente obesos com hipogonadismo gonadotrópico mostrou que após seis semanas de tratamento os níveis de estradiol diminuíram e os níveis de LH e testosterona aumentaram (BOER et al., 2004). Além disso, o uso do letrozol em homens inférteis com baixa relação testosterona-estradiol pode aumentar a contagem espermática no ejaculado e o índice de massa corpórea (SAYLAM et al., 2011). Contudo, não houve uma melhora nos parâmetros seminais como volume e motilidade em homens azoospermicos, criptozoospermicos ou normozoospermicos quando tratados com anastrozole, apesar de mostrarem um aumento nas concentrações de testosterona e uma diminuição nas concentrações de estradiol (SHOSHANY et al., 2017).

2.4 AÇÃO DOS INIBIDORES DE AROMATASE NO CÉREBRO

Os testículos são órgãos reprodutivos multifacetados que exercem funções endócrinas e exócrinas, notavelmente espermatogênese e esteroidogênese. Ambas as funções interagem intimamente para manter a fertilidade. A produção de espermatozoides está sob regulação hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal: a atividade testicular está sob controle do LH e FSH, que por sua vez estão sob o controle do GnRH, com diferentes ciclos de retroalimentação entre os sistemas endócrinos envolvidos (MENAD et al., 2017). Este sistema regulatório complexo permite que os organismos ajustem seu esforço reprodutivo (por exemplo, produção de espermatozoides, desenvolvimento das características sexuais secundárias, comportamentos sexuais) às condições ambientais e ao seu estado fisiológico (WILLMER et al., 2005).

A esteroidogênese também ocorre no cérebro, sendo os produtos desse processo chamados de neuroesteroides. Os estrógenos e a aromatase são expressos em muitas regiões do cérebro, incluindo hipotálamo e área preóptica, que estão envolvidas no controle reprodutivo (TSUTSUI et al., 2000). A aromatase cerebral está envolvida em várias funções neurofisiológicas e comportamentais, incluindo o comportamento sexual, cognição, agressão e neuroproteção (BIEGON et al., 2010).

A aromatase é a enzima chave para a reprodução de vertebrados e desenvolvimento cerebral (MASSARI et al., 2010), que catalisa a última etapa da biossíntese de estrógeno. Segundo Coumilleau e Kah (2015), a aromatase é o produto do gene CYP19, que se expressa no cérebro resultando em uma produção local de estrógeno considerada importante, não somente pelo controle de eventos relacionados ao comportamento sexual, mas também a regulação do desenvolvimento neural, plasticidade sináptica e sobrevivência celular.

Os estrógenos, possuem um papel importante na fertilidade do macho, no entanto, quando em altas concentrações podem prejudicar a espermatogênese (CARREAU et al., 2012), exercendo feedback negativo sobre o hipotálamo e hipófise, diminuindo as concentrações de FSH e LH, resultando em diminuição da espermatogênese (ROBERTSON et al., 1999). Estudos realizados por Hess et al. (2003) revelam a importância do estradiol sobre a função dos epidídimos, mas esse hormônio também influencia o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e a produção

espermática através da modulação da atividade das células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas.

Apesar do estradiol inibir a liberação de gonadotrofinas na hipófise, os níveis periféricos desse hormônio podem não refletir as concentrações cerebrais de estradiol. Esse hormônio possui efeito inibitório sobre a hipófise, diminuindo a secreção de LH. Contudo, a utilização de inibidores de aromatase podem diminuir os níveis de estradiol em até 56%, sendo essa diminuição dose-dependente (RAVEN et al., 2006).

De acordo com Veldhuis e Iranmanesh (2005), a administração de um antagonista da aromatase potente e seletivo reduz os níveis de estradiol e eleva as concentrações médias de LH de forma equivalente e a secreção de gonadotrofinas pode ser potencialmente estimulada.

Antiestrógenos já foram usados para tratamento de homens com oligozoospermia idiopática e/ou astenozoospermia na ausência de alguma endocrinopatia. A justificativa sugerida foi que essas substâncias interferem no mecanismo de feedback negativo normal que controla a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas no hipotálamo e secreção de FSH e LH na hipófise, aumentando seus níveis, estimulando assim a espermatogênese (GHANEM et al., 2010).

Os inibidores de aromatase reduzem as concentrações séricas de estrógenos através do bloqueio da conversão de testosterona, reduzindo o feedback negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise, resultando num aumento dos níveis séricos de FSH, que por sua vez pode ter um impacto positivo na espermatogênese (PATRY et al., 2009). Dessa forma, os elevados estímulos pulsáteis de hormônio gonadotrófico estimulam a hipófise a produzir mais FSH, estimulando as células de Sertoli, impactando positivamente na espermatogênese (COLE e ROBINSON, 1990).

Sendo assim, quando a ação do estrógeno endógeno é suprimida, as concentrações de LH e FSH aumentam, em resposta às altas concentrações de andrógenos (DUNKEL, 2006).

Raven et al. (2006) avaliaram se a aromatização local de testosterona no hipotálamo e hipófise possui importância sobre o efeito do estradiol sobre a secreção de gonadotrofinas. Quando o inibidor de aromatase letrozol foi aplicado em homens jovens e saudáveis, os níveis de estradiol diminuíram em 56%, sendo associada ao aumento sérico dos níveis de gonadotrofinas e testosterona.

O uso clínico de inibidores de aromatase tem sido aplicado em casos de infertilidade idiopática, com o objetivo de reduzir os efeitos estrogênicos sobre o sistema reprodutivo masculino, especialmente reduzindo a inibição do feedback negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (SCHLEGEL, 2012). Sendo assim, a inibição da produção de estrógenos pelos inibidores de aromatase pode ser um potente estimulante para o aumento da produção de LH, e conseqüentemente os níveis circulantes e intratesticulares de testosterona (SANTEN, 1981).

Em ovinos, as variações sazonais no comportamento reprodutivo são acompanhadas de outras características, tais como a secreção de gonadotrofinas e testosterona, tamanho testicular e produção espermática. Entretanto, apesar dessas variações sazonais, os carneiros mostram-se capazes de acasalar em qualquer época do ano, desde que as ovelhas estejam em estro (TILBROOK e CAMERON, 1990).

Em pássaros, a aromatase é expressa em altos níveis em diferentes regiões do cérebro (CORFIELD et al., 2012). Dentre as áreas cerebrais de expressão da aromatase, o hipotálamo é uma das regiões de maior síntese de estrógenos (COUMAILLEAU e KAH, 2014).

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

O tratamento com o inibidor de aromatase não esteroide (letrozol), administrado por via oral, melhora a performance dos parâmetros reprodutivos de carneiros adultos criados sob condições intensivas de manejo no Nordeste brasileiro.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com um inibidor de aromatase não esteroide (letrozol), administrado por via oral sobre os níveis séricos de testosterona e estradiol, avaliar a circunferência escrotal, o diâmetro dos túbulos seminíferos, ultraestrutura testicular e espermática, a qualidade seminal, a imunolocalização e a expressão gênica da enzima P450 aromatase nos testículos de carneiros adultos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ETAPAS DA PESQUISA

O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira etapa (I) consistiu em um estudo para determinar a dose ideal do letrozol. Nesta etapa verificou-se o efeito do letrozol sobre as concentrações séricas de testosterona e estradiol. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular, nos seguintes momentos: (I.1) antes da administração do medicamento, para obter os níveis basais dos hormônios testosterona e estradiol, e (I.2) em vários momentos após, para avaliar o tempo que o medicamento levou para induzir alterações nas concentrações séricas desses hormônios. As doses do letrozol foram administradas por via oral.

A segunda etapa (II) foi executada com aplicações diárias da dose escolhida após a execução da primeira etapa. Os dados coletados na segunda etapa do experimento foram: (II.1) medidas de circunferência escrotal (cm), (II.2) amostras de sangue, (II.3) sêmen e (II.4) testículos. As medidas de circunferência escrotal e as amostras de sêmen foram coletadas antes do início da segunda etapa, aos 30 dias e aos 60 dias do início do experimento, quando os animais foram castrados. As amostras de testículos foram acondicionadas em frascos contendo solução de Bouin ou RNA Later, para realizar as análises histológicas, imunohistoquímicas e PCR em tempo real. As amostras de sangue foram coletadas aos 30 e 60 dias de tratamento.

5.1.1 Primeira etapa (I)

Nove ovinos machos da raça Dorper, com idade entre nove e doze meses foram aleatoriamente divididos em três grupos, cada um contendo três animais. Antes da aplicação do medicamento, os animais foram individualmente pesados com balança digital (Figura 1A) para o cálculo da dose a ser administrada. Em seguida, amostras de 4mL de sangue foram coletadas via punção da veia jugular (Figura 1B), utilizando-

se tubos a vácuo. As amostras, foram posteriormente centrifugados a 3000g x 10 minutos (Figura 1C).

Figura 1 - Pesagem dos animais (A), coleta de sangue (B), centrífuga utilizada para separar o soro (C) e separação do soro para estocagem (D).



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

As doses de letrozol testadas foram 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg, administradas por via oral apenas uma vez (Tabela 1).

Tabela 1 - Delineamento do tratamento com três doses do letrozol (0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg), aplicados por via oral em ovinos (*Ovis aries*).

| DOSE | ANIMAL |
|----------|--------|
| 0,1mg/kg | 1 |
| | 2 |
| | 3 |
| 0,5mg/kg | 4 |
| | 5 |
| | 6 |
| 1,0mg/kg | 7 |
| | 8 |
| | 9 |

Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Para isso, o medicamento foi macerado e diluído em 5mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%), homogeneizado e administrado individualmente por via oral utilizando uma seringa de 10mL (Fig. 2).

Figura 2 - Administração por via oral de dose do letrozol nos ovinos (*Ovis aries*).

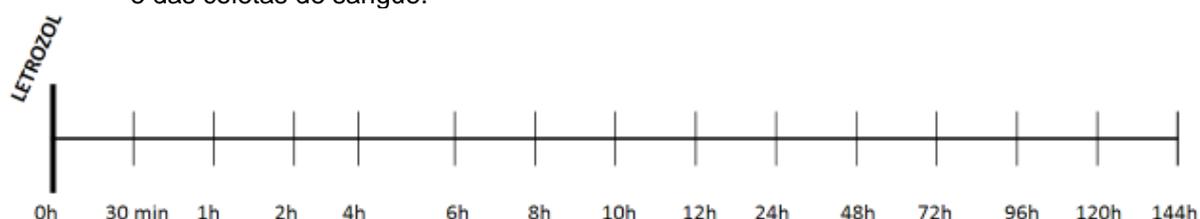


Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

As coletas foram realizadas conforme o esquema da Figura 3, aos 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h após a administração do letrozol para determinação do

tempo em que as concentrações de testosterona e estradiol fossem alteradas. As amostras de sangue ainda foram coletadas 48h, 72h, 96h, 120h e 144h para determinar a duração do tempo que o letrozol continuou induzindo alterações nos níveis desses hormônios.

Figura 3 - Delineamento para a primeira etapa (I) do experimento, com o tempo de aplicação do letrozol e das coletas de sangue.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

O soro foi separado em *eppendorfs* de 1,5mL (Figura 1D) e estocado a -20°C para realização da dosagem de testosterona e estradiol séricos, através da técnica de radioimunoensaio. As concentrações de testosterona foram medidas em ng/mL e estradiol em pg/mL. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Dunnet a 5% de probabilidade, para comparação das médias entre os grupos controle (comparando o valor de referência, que foi o momento antes da administração do letrozol) e os momentos após a aplicação do medicamento. Além disso, com as médias das concentrações foram comparadas entre os grupos utilizando a ANOVA e o teste t a 5% de probabilidade.

5.1.2 Segunda etapa (II)

Foram utilizados 12 carneiros adultos da raça Dorper, criados em sistema de confinamento, localizados no Estado do Piauí a 4° 30' 57" de latitude Sul e 42° 37' 30" de longitude Oeste, com idade entre 12 e 14 meses, divididos aleatoriamente em quatro grupos: G1: controle de 30 dias, G2: controle de 60 dias, G3: tratado por 30 dias e G4: tratado por 60 dias. Os animais dos grupos controles tomaram um placebo por via oral durante o período do experimento, enquanto os animais do grupo de 30 e 60 dias tomaram doses diárias de 0,5mg/kg de Letrozol por via oral durante os respectivos períodos.

Ao final de cada período, os animais foram castrados e os testículos acondicionados em frascos contendo solução de Bouin e RNA Later.

Antes do início do experimento os animais passaram por uma fase de condicionamento para coleta de sêmen com vagina artificial e foram registradas informações sobre a circunferência escrotal. As amostras de sêmen foram coletadas e congeladas para avaliação posterior e comparação com os momentos de 30 e 60 dias após a administração do inibidor de aromatase. Ainda aos 30 e 60 dias de administração do letrozol, amostras de sangue foram coletadas nos grupos tratamento e controle para comparação dos níveis de testosterona e estradiol.

Os dados de circunferência escrotal, foram submetidos ao teste t a 5% de probabilidade comparando as médias antes da administração, aos 30 dias e aos 60 dias nos animais dos grupos tratamento e grupos controle.

5.1.2.1 Treinamento dos animais para as coletas de sêmen

Antes do início da segunda etapa, amostras de sêmen foram coletadas por intermédio de vagina artificial. Para isso, os animais precisaram de treinamentos diários por um período de 20 dias para o condicionamento dos mesmos durante as coletas (Fig. 4).

Figura 4 - Treinamento para o condicionamento e coleta de sêmen utilizando vagina artificial.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

5.1.2.2 Coleta de sêmen

Determinada a dose do medicamento, foram administrados 0,5 mg/kg por via oral. Antes do início do experimento, 30 e 60 dias após a administração do letrozol, o sêmen também foi coletado utilizando vagina artificial (Fig. 4) na presença de uma fêmea com cio induzido com aplicação intramuscular de 5mL de Cipionato de Estradiol (ECP®).

Em todas as coletas, uma alíquota do sêmen foi diluída em tris gema, inserida palhetas de 0,5mL, lacrada, resfriada utilizando o TK 3000® e acondicionada em

botijão de nitrogênio líquido a -196°C para análise dos efeitos do letrozol sobre os parâmetros seminais de amostras congeladas e descongeladas.

Logo após a coleta de sêmen os animais foram anestesiados com cloridrato de lidocaína 5mg/kg. Os testículos foram removidos, cortados em fragmentos de 3 a 5 mm de espessura e colocados em recipientes contendo solução de Bouin e RNA later. As amostras em RNA Later foram acondicionadas em criotubos e colocadas em botijão contendo nitrogênio líquido. As amostras em solução de Bouin foram acondicionadas em tubos falcon de 15mL e transportadas em gelo seco, juntamente com o material no botijão de nitrogênio líquido até a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia para a realização das técnicas de avaliação histológica, imunohistoquímica e PCR em tempo real.

5.1.2.2.1 Avaliação do sêmen

Para a avaliação do sêmen foram utilizados testes funcionais e testes convencionais. Duas alíquotas criopreservadas foram descongeladas por imersão em água a 37°C por 30 segundos e após esse período, as palhetas foram retiradas, secas com auxílio de papel toalha, seccionadas na extremidade em que foram vedadas e as análises foram feitas.

5.1.2.2.1.1 Testes convencionais

A avaliação da motilidade total e progressiva, assim como a concentração espermática (avaliada em milhões de espermatozoides por mL) foram feitos através do Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA-Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Throne). Para estas avaliações foi colocada uma alíquota de sêmen contendo 6 μL em uma câmara de contagem específica para o aparelho (Leja 4, Hamilton Throne, USA).

Para avaliação da morfologia espermática, foi colocada uma alíquota de sêmen em um tubo de microcentrifuga contendo formol salino aquecido a 37°C , sendo que a diluição para essa avaliação foi variável dependendo do aspecto do sêmen. Posteriormente uma gota do sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula (câmara úmida) e a avaliação morfológica foi realizada em um microscópio de contraste de fases em um aumento de 1000x em óleo de imersão. Os espermatozoides foram

classificados como normais, com defeitos menores ou defeitos maiores (FRESHMAN, 2002).

5.1.2.2.1.1.1 Análise computadorizada da motilidade (CASA)

Além da motilidade total e progressiva que foram avaliados pelo sistema computadorizado da motilidade (CASA-Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Throne), outros parâmetros de movimento espermático foram avaliados e estão descritos no quadro abaixo:

Quadro 1 - Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados

| SIGLA | TERMINOLOGIA | SIGNIFICADO |
|--------------|--|---|
| VAP | Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$) | Velocidade média do espermatozoide considerando-se um caminho suavizado |
| VSL | Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$) | Velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide |
| VCL | Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$) | Velocidade da trajetória real do espermatozoide |
| ALH | Amplitude do movimento lateral da cabeça (μm) | Amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real |
| BCF | Frequência de batimento cruzado (Hz) | Número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento |
| STR | Retilinearidade (VSL/VAP, %) | Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido |
| LIN | Linearidade (VSL/VCL, %) | Qualidade do movimento retilíneo real percorrido |

Fonte: Versteegen et al. (2002) e Goovaerts et al. (2006)

Os espermatozoides também foram classificados em quatro grupos baseando-se nas velocidades: Rápidos (RAPID; VAP $>50 \mu\text{m/s}$; %), Médios (MEDIUM, $30 \mu\text{m/s} < \text{VAP} < 50 \mu\text{m/s}$; %), Lentos (SLOW; VAP $< 30 \mu\text{m/s}$ ou VSL $< 15 \mu\text{m/s}$; %) e espermatozoides imóveis (STATIC; %).

5.1.2.2.1.2 Testes funcionais

Os testes funcionais utilizados nessa pesquisa foram a avaliação da integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial.

5.1.2.2.1.2.1 Integridade acrossomal

A coloração simples Fast-Green/Rosa-bengala foi utilizada para avaliar a atividade acrossomal (POPE et al., 1991). Para isso, uma alíquota de cada amostra (5 μ L) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 μ L) e a mistura foi incubada durante 60 segundos em mesa aquecida a 37°C. Os esfregaços sobre lâminas de microscopia foram preparados após a incubação e analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Um total de 200 células foram contadas em cada lâminas e classificadas como:

- Acrossomo íntegro: região acrossomal de coloração lilás a roxa, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;
- Acrossomo não-integro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

5.1.2.2.1.2.2 Integridade de membrana plasmática

Foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) para a avaliação da integridade da membrana plasmática, segundo a técnica descrita por Barth e Oko (1989). A técnica consiste no fato da eosina penetrar nas células e corando-as de rosa, quando existem alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. O procedimento foi realizado utilizando uma alíquota de 5 μ L de sêmen que foi misturada ao corante, na proporção de 1:1 e esfregaços sobre lâminas de microscopia foram realizados. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Para essa técnica foram contadas 200 células por lâminas, classificadas como células de membrana íntegra (não coradas) e membrana não-íntegra (coradas).

5.1.2.2.1.2.3 Atividade mitocondrial

O teste DAB (diaminobenzidina) foi utilizado para avaliar a atividade mitocondrial. Uma alíquota de 25 μ L de amostra foi incubada com 25 μ L de DAB (1mg/mL de PBS) a 37°C, por uma hora. Após a incubação, foram feitos esfregaços

em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% durante 10 minutos. As lâminas foram lavadas e secas ao ar livre sob proteção da luz. A atividade citoquímica da mitocôndria foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Hrudka (1987). As lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em quatro classes:

Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DABI);

Classe II: Células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II);

Classe III: Células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial (DAB III);

Classe IV: Células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

5.1.2.2.1.2.4 Resistência do espermatozoide ao estresse oxidativo

A avaliação da resistência ao estresse oxidativo foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Ohkawa et al. (1979), comumente chamado de "TBARS induzido". A peroxidação lipídica das amostras é induzida nesse teste no intuito de avaliar qual dos grupos estudados é mais susceptível a sofrer o estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica das amostras foi induzida por incubação em 50µL de ácido ascórbico (20mM) e 50µL de sulfato de ferro (4mM) junto a 200µL de sêmen em banho-maria durante uma hora e meia. A indução da peroxidação foi uma técnica adaptada de Gomez et al. (1998).

Após a indução, junto aos 300µL de amostra (sêmen com adição de sulfato de ferro e ácido ascórbico) foram adicionados 600µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%). A amostra foi então centrifugada na capacidade máxima de rotação da centrífuga, durante 15 minutos a uma temperatura de 5°C para que ocorresse precipitação das proteínas da amostra.

Alíquotas de 800µL de sobrenadante foram transferidas para criotubos, nas quais foram adicionados 800µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA 1%). Estes tubos posteriormente foram submetidos à fervura durante 10 minutos e posteriormente foram imersos em gelo para que a reação não continuasse a ocorrer.

Após ocorrer a peroxidação lipídica da membrana espermática decorrente de um estresse oxidativo, ocorrerá a formação de alguns produtos que são consequência desta peroxidação, sendo o malondialdeído (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico) o principal produto formado (NICHI et al. 2006).

Ao adicionar o TBA na amostra, este ácido reagiu como malondialdeído formando uma coloração rósea. Esta coloração rósea das amostras foi quantificada em um espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences) com comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim a avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo foi expressa em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

5.1.2.3 Circunferência escrotal

Antes do início do experimento a circunferência escrotal de todos os animais do experimento foi mensurada utilizando fita métrica. As medidas foram novamente mensuradas aos 30 e 60 dias. Os valores foram submetidos à análise de variância e ao teste t a 5% de probabilidade para saber se houve diferença significativa entre as medidas dos grupos controle, 30 dias e 60 dias. As análises estatísticas foram feitas usando o software *GraphPad Prism*, versão 8.2.1.

5.1.2.4 Dosagem hormonal

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo através de punção da veia jugular aos 30 e 60 dias. O material coletado foi centrifugado a 3000g x 10 minutos. Então alíquotas do soro foram estocadas e congeladas a -20°C para posteriormente serem enviadas em gelo seco para a Universidade do Tennessee nos Estados Unidos. As dosagens dos hormônios testosterona e estradiol foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio.

5.1.2.5 Avaliação histológica

As amostras dos testículos foram coletadas e fixadas em solução de Bouin e posteriormente desidratadas em uma série de etanois em concentrações crescentes (de 60% a 100%) e diafanizadas duas frações em Xilol, para posterior inclusão em

parafina (TOLOSA et al., 2003). Foram obtidos cortes dos blocos de parafina com 5 μm de espessura, em micrótomo Leica RM 2155, os quais foram corados em HE (Hematoxilina/Eosina). Em seguida as lâminas foram montadas com lamínulas para observação da morfologia celular. As mensurações da área dos túbulos seminíferos (μm^2) foram feitas utilizando o software VS-ASW. A uniformidade foi o critério de escolha para mensuração dos túbulos seminíferos. A fotodocumentação microscópica foi feita em fotomicroscópio Olympus® BX61VS. As medidas registradas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste t a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram feitas usando o software *GraphPad Prism*, versão 8.2.1.

5.1.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de testículos fixadas em glutaraldeído a 2,5% e de sêmen fixadas em solução de Karnovsky modificada foram utilizadas para microscopia eletrônica de transmissão, através da desidratação em concentrações crescentes de álcoois e embebidas em resina.

Os cortes ultrafinos com 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastadas com acetato de uranila 2% em água destilada e citrato de chumbo 0,5% em água destilada por 5 e 10 minutos, respectivamente e as eletromicrografias foram realizadas no Setor de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

5.1.2.7 Imunohistoquímica

As amostras foram lavadas 20 vezes em solução de álcool a 70% e submetidas ao procedimento de desidratações em séries crescentes de álcoois de 70% até 100%, em seguida passaram por duas lavagens em Xilol, então foram incluídas e emblocadas em parafina. Cortes de 5 μm foram obtidos usando micrótomo Leica RM 2155, que em seguida foram desparafinizados em estufa a 70°C por 30 minutos e duas imersões em xilol por 10 minutos, reidratadas em graduação decrescente de álcoois de 100%, 90% e 70%, cada uma, durante 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e aquecidas em panela de pressão elétrica por 5 minutos em tampão citrato. Após esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos, os cortes foram lavados duas vezes em PBS por 5 minutos e o bloqueio da peroxidase

endógena usando Peroxidase Block por 30 minutos foi feito. Logo após, as lâminas foram novamente lavadas com PBS por 5 minutos e o bloqueio de proteína foi feito usando o Protein Block por 30 minutos. A incubação foi feita com anticorpo primário anti-aromatase em câmara úmida por 16 horas (1:200). O anticorpo primário foi substituído por PBS nos cortes controles. As lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS por 5 minutos e incubadas em cromógeno DAB. As lâminas foram lavadas em água destilada e contra coradas com hematoxilina, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcoois 70%, 90%, 100%, 100% por 5 minutos cada, diafanizadas em xilol I e xilol II, por 5 minutos cada e montadas as lamínulas. A intensidade da imunomarcção foi definida através de método subjetivo, por meio de observação direta no microscópio óptico (RIBEIRO et al., 2013). As fotodocumentações foram feitas em microscópio Olympus® BX61VS.

5.1.2.8 PCR em tempo real

Amostras dos testículos dos ovinos foram fixadas em solução de RNA *Later* (Invitrogen) por 12 horas e congeladas a -80°C para posterior processamento. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Disruptor de células L-Beader 6 (Loccus) e o RNA total extraído com *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen). As amostras de RNA foram quantificadas por Biodrop μLITE . 1 μg de RNA foi purificado com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e a retrotranscrição foi realizada pelo *SuperScript III* (Invitrogen). Todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. A quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando o *Select SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) e *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) pelo método de Curva Padrão com quatro diluições em placa óptica de 96 poços. Cada amostra correu em triplicata juntamente com os controles endógenos. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Os *primers* específicos de genes da enzima citocromo P450 aromatase (CYP19) e do controle endógeno estão apresentados na tabela 1.

Tabela 2 - *Primers* com as respectivas sequências utilizadas para qRT-PCR.

| Gene | Sequência dos <i>Primers</i> | Nº de acesso no Genbank |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| CYP19 | Fw 5' – CCCAGGTTGAAGAGGCAAT – 3' | 001123000.1 |
| | Rv 5' – CTGGTACCGCATGCTCTCAT – 3' | |
| GAPDH | Fw 5' – TGAGGACCAGGTTGTCTCCT – 3' | 001190390.1 |
| | Rv 5' – AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT – 3' | |

Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

5.1.2.8.1 *Análise estatística*

Os dados da expressão relativa da aromatase foram submetidos ao teste não-paramétrico Mann-Whitney U. A diferença significativa foi atribuída quando o valor de P foi inferior a 0,05. As análises estatísticas foram feitas usando o software *GraphPad Prism*, versão 8.2.1.

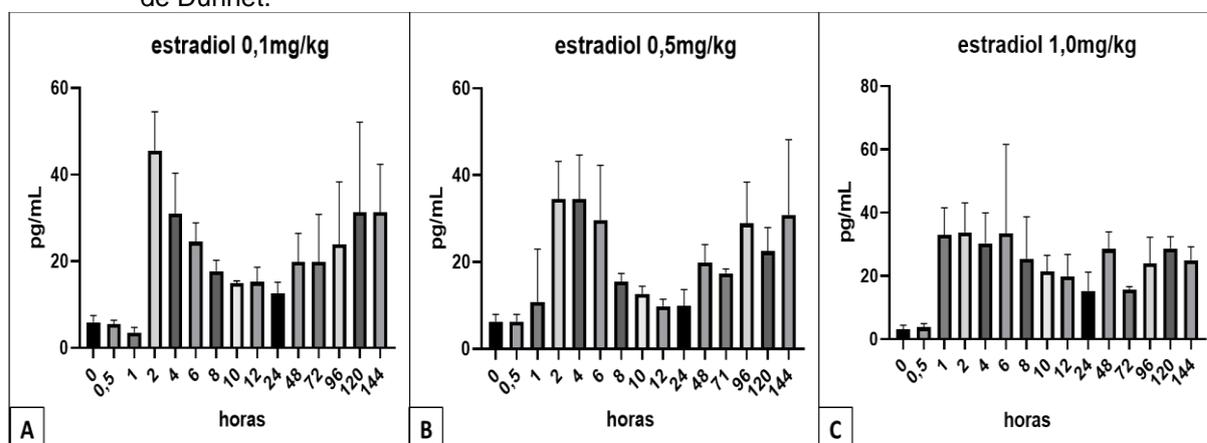
6 RESULTADOS

6.1 PRIMEIRA ETAPA (I) – DOSAGEM HORMONAL

Os resultados da presente pesquisa mostram que as 3 doses aplicadas por via oral causaram modificações nos níveis séricos de estradiol. A Figura 5 mostra os gráficos de concentração de estradiol em pg/mL, nos grupos estudados, utilizando as doses de 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg de letrozol por via oral. É possível observar nos três grupos um aumento nos níveis de estradiol já nas primeiras horas após a aplicação do letrozol e, logo em seguida, a diminuição desses níveis, chegando à concentração mínima no tempo de 24 horas. Logo em seguida esses níveis começaram a se elevar novamente.

No grupo de animais que receberam 1,0mg/kg de letrozol por via oral foi observado um aumento significativo dos níveis de estradiol já na primeira hora após a administração do medicamento ($p < 0,01$) (Fig. 5C). Já nos grupos que receberam 0,1mg/kg e 0,5mg/kg, respectivamente, o aumento significativo nos níveis de estradiol foi observado 2 horas após a administração do medicamento ($p < 0,01$) (Fig. 5A e 5B).

Figura 5 - Dosagem da concentração sérica de estradiol em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral. A – grupo que recebeu 0,1mg/kg; B – grupo que recebeu 0,5mg/mg; C – grupo que recebeu 1,0mg/kg. * difere estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

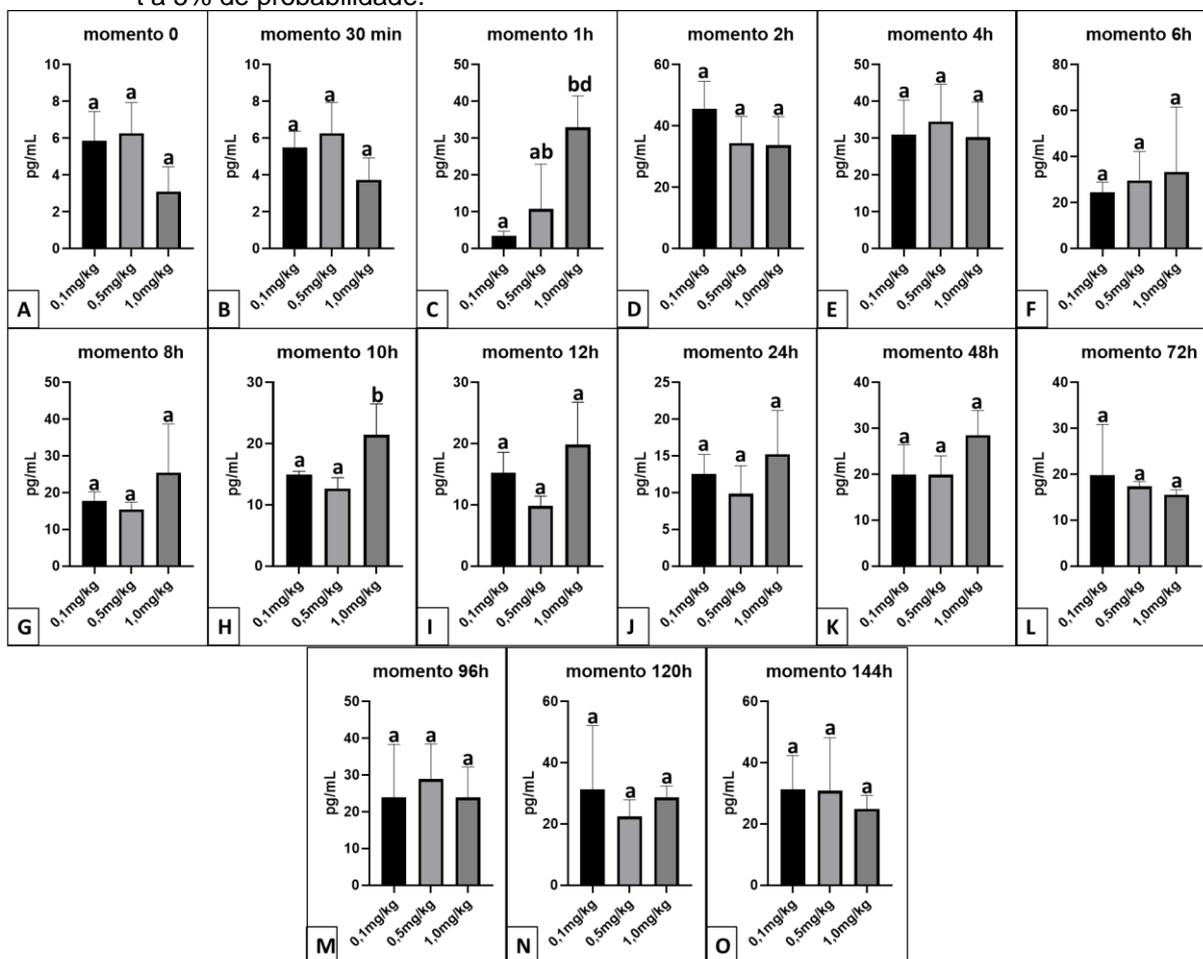
As médias das concentrações séricas de estradiol foram comparadas em todos os momentos entre os três grupos para saber se houve diferença significativa. Os

resultados mostram que no momento 0 e 30 minutos após a administração do medicamento as médias das concentrações séricas de estradiol não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$) (Fig. 6A e 6B). A diferença estatística foi observada 1h após a administração do medicamento, sendo maior no grupo de animais que recebeu 1,0mg/kg de letrozol, contudo essa diferença não foi significativa quando a média desse grupo foi comparada com a média do grupo de animais que recebeu 0,5mg/kg (Fig. 5C).

Ainda foi possível observar que no “momento 2 horas” após a administração do letrozol a diferença estatística foi significativa quando a média desse momento foi comparada com o primeiro momento (momento 0) nos três grupos (Fig. 5), contudo quando os níveis foram comparados entre os três grupos no “momento 2 horas”, a diferença não foi significativa ($p>0,05$) (Fig. 6D).

As médias de concentração sérica de estradiol foram gradativamente diminuindo nos três grupos (Fig. 5) até as 24 horas, mostrando níveis estatisticamente iguais ($p>0,05$) (Fig. 6 E-J), contudo o grupo que recebeu 1,0mg/kg apresentou diferença significativamente aumentada no “momento 10 horas”, quando comparado com os grupos que receberam 0,1mg/kg e 0,5mg/kg, respectivamente (Fig. 6H). Ainda foi observado níveis mais baixos de estradiol no grupo de animais que receberam 0,5mg/kg de estradiol 24 horas após a administração do medicamento (Fig. 6J), contudo não houve diferença significativa entre os grupos de doses estudadas ($p>0,05$).

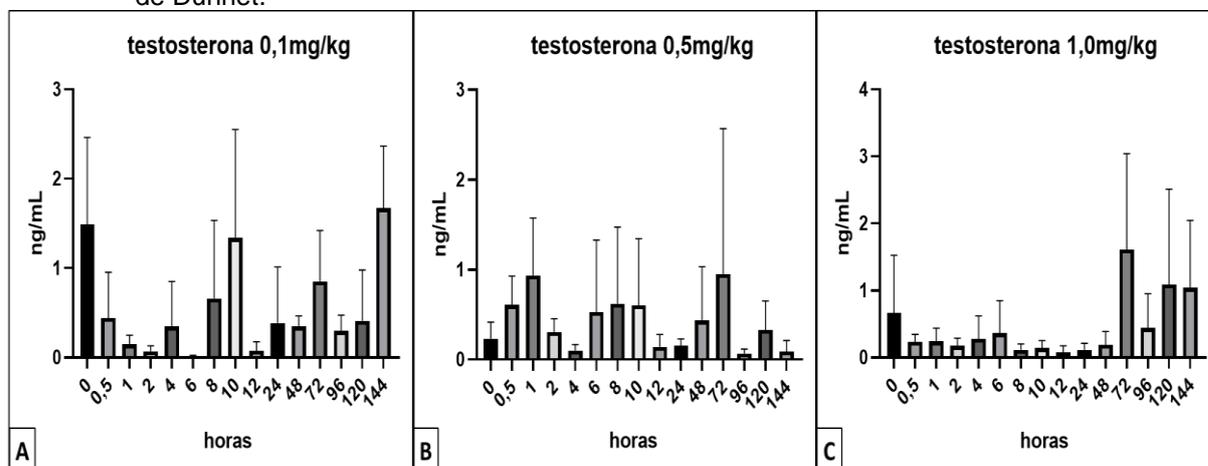
Figura 6 - Médias das concentrações séricas de estradiol em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral nos momentos 0, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Os gráficos mostram a comparação entre as doses 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

A Figura 7 mostra os gráficos de concentração sérica de testosterona em ng/mL, nos grupos estudados, utilizando as doses de 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg de letrozol por via oral. Foi possível observar que a aplicação do letrozol por via oral em carneiros causou alterações na concentração de testosterona nos três grupos estudados, contudo a diferença não foi significativa em nenhum dos momentos estudados, quando comparados com o momento 0 (Fig. 7). Nas primeiras horas após a administração do medicamento, as concentrações de testosterona diminuíram, atingindo o mínimo observado em 6 horas (Fig. 7A), 4 horas (Fig. 7B) e 2 horas (Fig. 7C). Entre 8 e 10 horas as concentrações aumentaram novamente (Fig. 7A e 7B). No grupo que recebeu a dose de 1,0mg/kg, a concentração máxima foi observada 72 horas após a administração do medicamento (Fig. 3C).

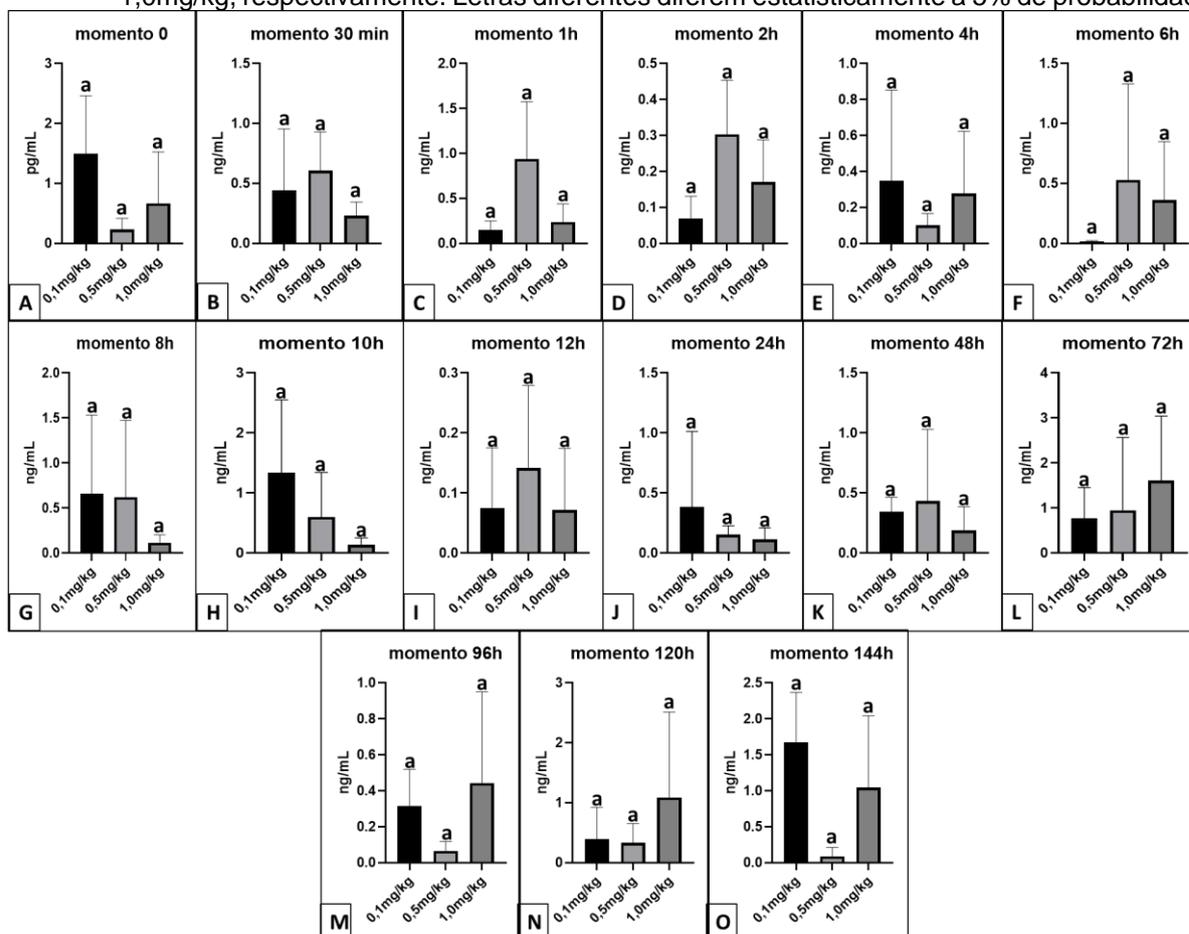
Figura 7 - Dosagem da concentração sérica de testosterona em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral. A – grupo que recebeu 0,1mg/kg; B – grupo que recebeu 0,5mg/mg; C – grupo que recebeu 1,0mg/kg. * difere estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

As médias das concentrações séricas de testosterona foram comparadas em todos os momentos entre os três grupos para saber se houve diferença significativa. A análise estatística mostrou que as concentrações não diferiram entre os grupos em nenhum dos momentos estudados (Fig. 8).

Figura 8 - Médias das concentrações séricas de testosterona em carneiros que tomaram uma dose de letrozol por via oral nos momentos 0, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Os gráficos mostram a comparação entre as doses 0,1mg/kg, 0,5mg/kg e 1,0mg/kg, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente a 5% de probabilidade.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

6.2 SEGUNDA ETAPA (II) – COLETA DE SÊMEN

Os animais utilizados para esta pesquisa foram provenientes de Fazendas de criação localizadas no Estado do Piauí a 4° 30' 57" de latitude Sul e 42° 37' 30" de longitude Oeste. A raça Dorper foi utilizada e o tipo de manejo realizados nos animais antes do início do experimento se concentrava somente em fornecimento de silagem duas vezes ao dia, ração comercial própria para ovinos, sal mineral e água à vontade, em regime intensivo de confinamento. Devido ao manejo pouco constante com os animais, foi preciso fazer um esquema de condicionamento diário para serem feitas as coletas de sêmen.

Inicialmente, foram colocados cabrestos em todos os animais, para que eles se acostumassem com o manejo. Diariamente, no período da manhã e no período da tarde, os animais foram manejados individualmente até se acostumarem com a presença de pessoas. Em um terceiro momento, uma fêmea no cio foi colocada próximo a eles para despertar o interesse sexual e foi feita a aproximação sempre guiada pelo cabresto para evitar cópula indesejada.

O treinamento consistiu no preparo da vagina artificial e tentativas de coletar o sêmen de todos os animais. Após três semanas, todos os animais estavam acostumados com o manejo e as coletas de sêmen com vagina artificial foram feitas sem dificuldade.

6.2.1 Avaliação do sêmen

Os resultados da presente pesquisa mostram que o tratamento com letrozol não afetou a concentração espermática. Apesar de ter sido observado um aumento nesse parâmetro, principalmente aos 30 dias de tratamento, a diferença não foi estatisticamente significativa. A quantidade de espermatozoides com membrana celular íntegra, a integridade acrossomal e a resistência dos espermatozoides ao estresse oxidativo também aumentaram em função do tratamento com o letrozol, porém os valores não apresentaram diferença significativa. O efeito do tratamento sobre a atividade mitocondrial diferiu entre os grupos, sendo que a quantidade de espermatozoides com média atividade mitocondrial foi menor nos animais aos 30 dias de tratamento com letrozol e aumentou aos 60 dias de tratamento. A ausência de atividade mitocondrial também diferiu entre os grupos, sendo maior aos 30 dias, voltando a diminuir aos 60 dias de tratamento. Os valores de espermatozoides com alta atividade mitocondrial aumentaram com o tempo, porém a diferença não foi significativa. A quantidade de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial diminuiu com o tempo, porém a diferença também não foi significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do letrozol sobre avaliação funcional de sêmen criopreservado de carneiros (*Ovis aries*) em função do tempo.

| Variável | Tempos (dias) | | |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 0 | 30 | 60 |
| CONC | 170000000±16832508.23 ^a | 225000000±40875828.23 ^a | 250000000±25658007.20 ^a |
| INTEGRO | 30.5±8.76 ^a | 31.0±1.35 ^a | 46.66±7.66 ^a |
| ACRO | 82.25±2.49 ^a | 83.5±1.19 ^a | 90.0±3.60 ^a |
| DAB I | 26.5±5.48 ^a | 34.5±7.02 ^a | 36.33±5.89 ^a |
| DAB II | 52.0±1.08 ^a | 23.5±6.58 ^b | 41.0±1.52 ^c |
| DABIII | 14.0±5.33 ^a | 6.25±1.18 ^a | 6.0±3.05 ^a |
| DAB IV | 7.75±3.11 ^b | 35.75±7.58 ^a | 16.66±4.84 ^b |
| TBARS | 1.45±0.15 ^a | 1.4±0.18 ^a | 3.08±1.55 ^a |

^{a, b, c} letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos

Testes funcionais: CONC (concentração espermática), INTEGRO (integridade da membrana plasmática), ACRO (integridade acrossomal), DAB I (alta atividade mitocondrial), DAB II (média atividade mitocondrial), DAB III (baixa atividade mitocondrial), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial) e TBARS (avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo dos espermatozoides).

As análises do CASA mostraram que o tratamento com letrozol não afetou a cinética espermática, representada pela velocidade média de percurso (VAP), velocidade retilínea do espermatozoide (VSL), velocidade curvilínea do espermatozoide (VCL), amplitude do movimento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), frequência de batimento cruzado do espermatozoide (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), motilidade espermática (MOT), motilidade progressiva (PROG), espermatozoides rápidos (RAPID), espermatozoides com velocidade média (MEDIUM), espermatozoides lentos (SLOW) e espermatozoides imóveis (STATIC), visto que as diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 4). Contudo foi observado que houve um aumento nos valores médios da velocidade média de percurso, velocidade retilínea, velocidade curvilínea, frequência de batimento cruzado, retilinearidade, linearidade, motilidade total, porcentagem de espermatozoides rápidos, porcentagem de espermatozoides com velocidade média, porcentagem de espermatozoides lentos e diminuição de espermatozoides imóveis aos 30 dias de tratamento. As amostras com 60 dias de tratamento mostraram uma diminuição nas médias dos parâmetros de velocidade média de percurso, velocidade retilínea, velocidade curvilínea, amplitude do movimento lateral da cabeça, frequência de batimento cruzado, motilidade progressiva, espermatozoides rápidos e espermatozoides lentos e aumento em retilinearidade, motilidade total e

espermatozoides com velocidade média, contudo essas observações não foram estatisticamente significativas.

Tabela 4 – Efeito do letrozol sobre as variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de carneiros (*Ovis aries*) em função do tempo.

| Variável | Tempos (dias) | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 0 | 30 | 60 |
| VAP | 77.37±9.66 ^a | 78.9±8.41 ^a | 65.66±1.79 ^a |
| VSL | 62.7±7.49 ^a | 63.52±5.75 ^a | 56.1±4.23 ^a |
| VCL | 126.17±20.39 ^a | 128.75±17.09 ^a | 97.0±4.36 ^a |
| ALH | 6.82±0.41 ^a | 6.57±0.26 ^a | 5.5±0.73 ^a |
| BCF | 28.6±2.53 ^a | 30.37±3.29 ^a | 20.7±1.61 ^a |
| STR | 78.75±2.53 ^a | 80.0±1.08 ^a | 85.0±4.04 ^a |
| LIN | 51.0±3.82 ^a | 52.0±2.04 ^a | 60.0±6.43 ^a |
| MOTILE | 34.0±8.74 ^a | 41.75±6.15 ^a | 42.0±13.27 ^a |
| PROGR | 13.0±5.81 ^a | 13.0±1.96 ^a | 10.33±1.45 ^a |
| RAPID | 16.75±6.75 ^a | 18.25±2.65 ^a | 14.0000±0 ^a |
| MEDIUM | 17.25±4.76 ^a | 23.25±5.85 ^a | 27.33±13.86 ^a |
| SLOW | 11.75±3.01 ^a | 14.25±2.71 ^a | 4.33±1.20 ^a |
| STATIC | 54.25±10.37 ^a | 44.00±7.59 ^a | 54.33±15.02 ^a |

a, b, c letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos

Variáveis: VAP ($\mu\text{m/s}$, velocidade média de percurso), VSL ($\mu\text{m/s}$ velocidade retilínea), VCL ($\mu\text{m/s}$, velocidade curvilínea), ALH (μm , amplitude do movimento lateral da cabeça), BCF (Hz, frequência de batimento cruzado), STR (VSL/VAP, %, retilinearidade), LIN (VSL/VCL, %, linearidade), MOT (% motilidade), PROG (% motilidade progressiva), RAPID (% espermatozoides rápidos), MEDIUM (% espermatozoides com velocidade média), SLOW (% espermatozoides lentos), STATIC (% espermatozoides imóveis).

O tratamento com o letrozol não mostrou alterações na morfologia espermática, visto que a porcentagem de defeitos menores, maiores e defeitos totais não foram estatisticamente significativas entre os momentos 0, 30 e 60 dias.

Tabela 5 - Efeito do letrozol sobre a morfologia espermática em sêmen criopreservado de carneiros (*Ovis aries*) em função do tempo.

| Variável | Tempos (dias) | | |
|----------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 0 | 30 | 60 |
| DEFMA | 4.25±2.71 ^a | 9.75±8.46 ^a | 9.0±8.02 ^a |
| DEFME | 2.5±2.17 ^a | 4.75±1.11 ^a | 2.66±1.76 ^a |
| DEFTOT | 6.75±4.81 ^a | 14.5±9.25 ^a | 11.66±9.66 ^a |

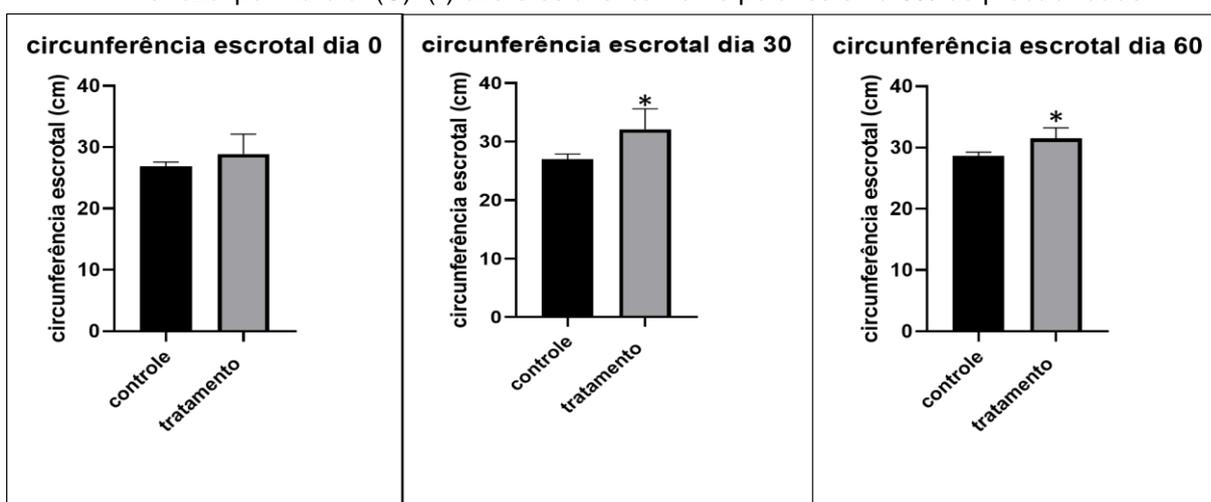
a, b, c letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos

Variáveis: DEFMA (% defeitos maiores), DEFME (% defeitos menores) e DEFTOT (% defeitos totais).

6.3 SEGUNDA ETAPA (II) – CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL

As medidas de circunferência escrotal realizadas nesta pesquisa mostram que os animais utilizados no experimento apresentavam inicialmente valores estatisticamente similares (Fig. 9A). Após 30 dias de tratamento com letrozol as medidas de circunferência escrotal aumentaram significativamente nos animais do grupo tratamento, quando comparados como grupo controle (Fig. 9B). O aumento foi considerado significativo ainda 60 dias após a administração do medicamento (Fig. 9C).

Figura 9 - Médias de circunferência escrotal (cm) de carneiros do grupo controle e tratamento nos momentos: antes do início do experimento (A), 30 dias após o início do tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (B) e 60 dias após o início do tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (C). (*) difere estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.



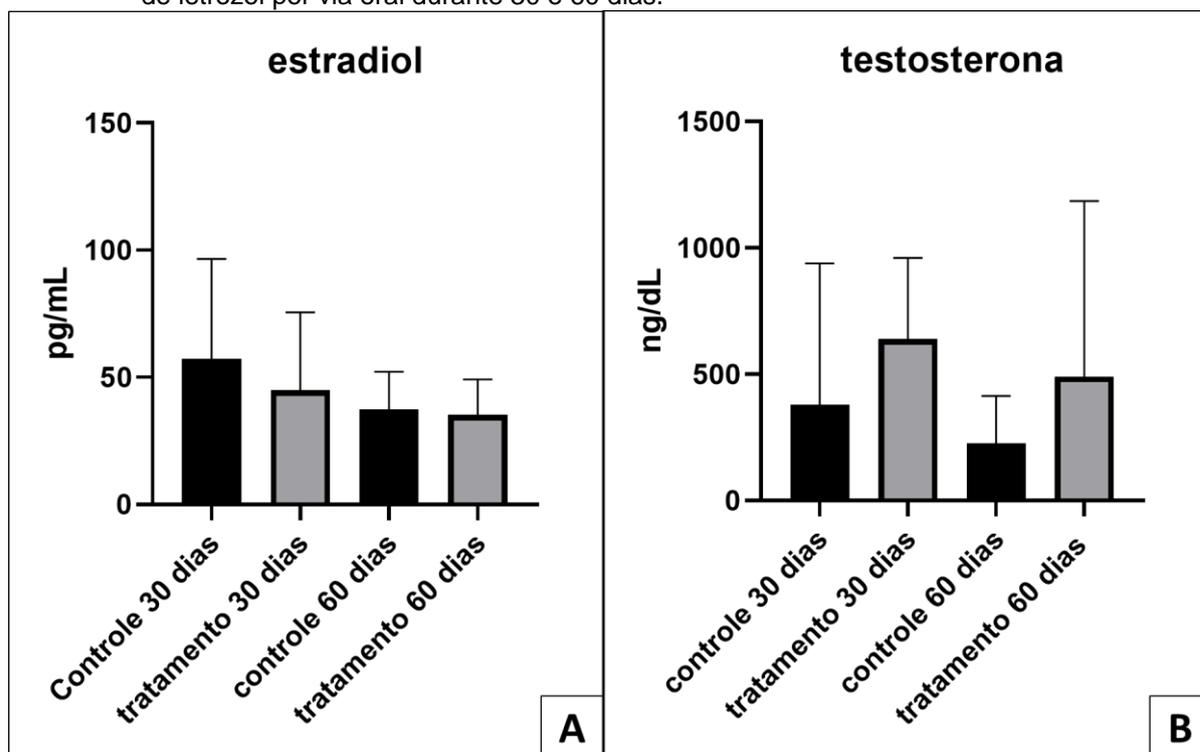
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

6.4 SEGUNDA ETAPA (II) – DOSAGEM HORMONAL

A dosagem de estradiol sérico mostra que não houve diferença significativa entre os grupos estudados no experimento, entretanto foi possível observar níveis mais baixos de estradiol nos animais tratados (Fig. 10A). Os níveis de testosterona foram mais altos nos animais tratados com o inibidor de aromatase, tanto nos animais que receberam o medicamento durante 30 dias como durante 60 dias, entretanto não houve diferença significativa quando comparados com os animais dos grupos controles (Fig. 10B).

Os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez que é possível alterar os níveis séricos dos hormônios estradiol e testosterona através da administração de 0,5mg/kg de letrozol por via oral em carneiros. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos controles e tratados nos níveis desses hormônios, sugerimos que sejam feitos mais estudos para comprovar os resultados encontrados nesta pesquisa.

Figura 10 - Dosagem dos hormônios estradiol (A) e testosterona (B) de carneiros tratados com 0,5mg/kg de letrozol por via oral durante 30 e 60 dias.



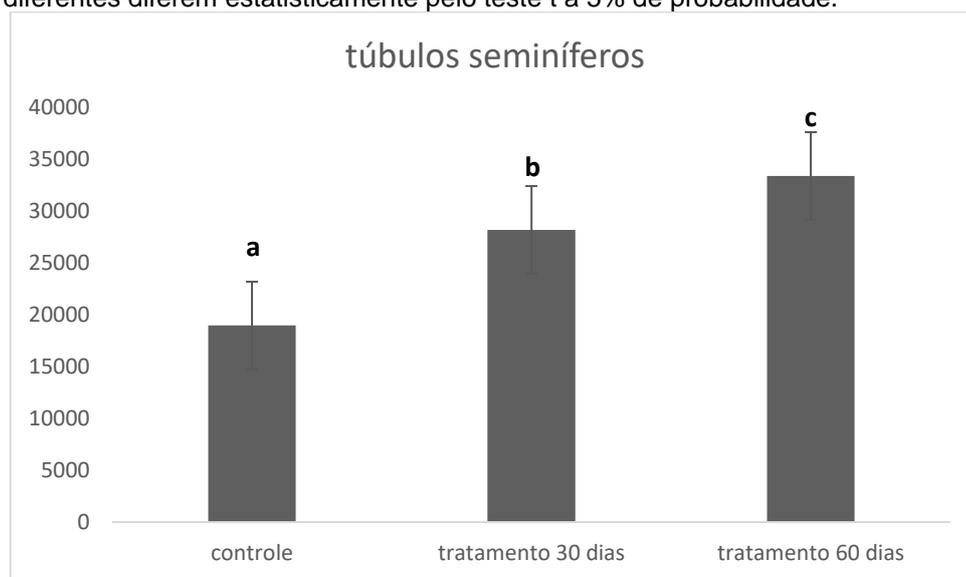
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

6.5 SEGUNDA ETAPA (II) – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise morfológica feita no presente estudo mostra que o tratamento com 0,5mg/kg de letrozol administrado por via oral durante 30 e 60 dias aumentou as medidas de área dos túbulos seminíferos. Observe na figura 11 as médias das medidas de área dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais estudados. A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre as médias das áreas dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais dos grupos estudados

($p < 0,05$). O teste t mostrou que houve diferença significativa das médias das áreas dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais do grupo controle e o grupo de 30 dias ($p < 0,05$), entre o grupo controle e o grupo de 60 dias ($p < 0,05$) e entre o grupo de 30 dias e o grupo de 60 dias ($p < 0,05$).

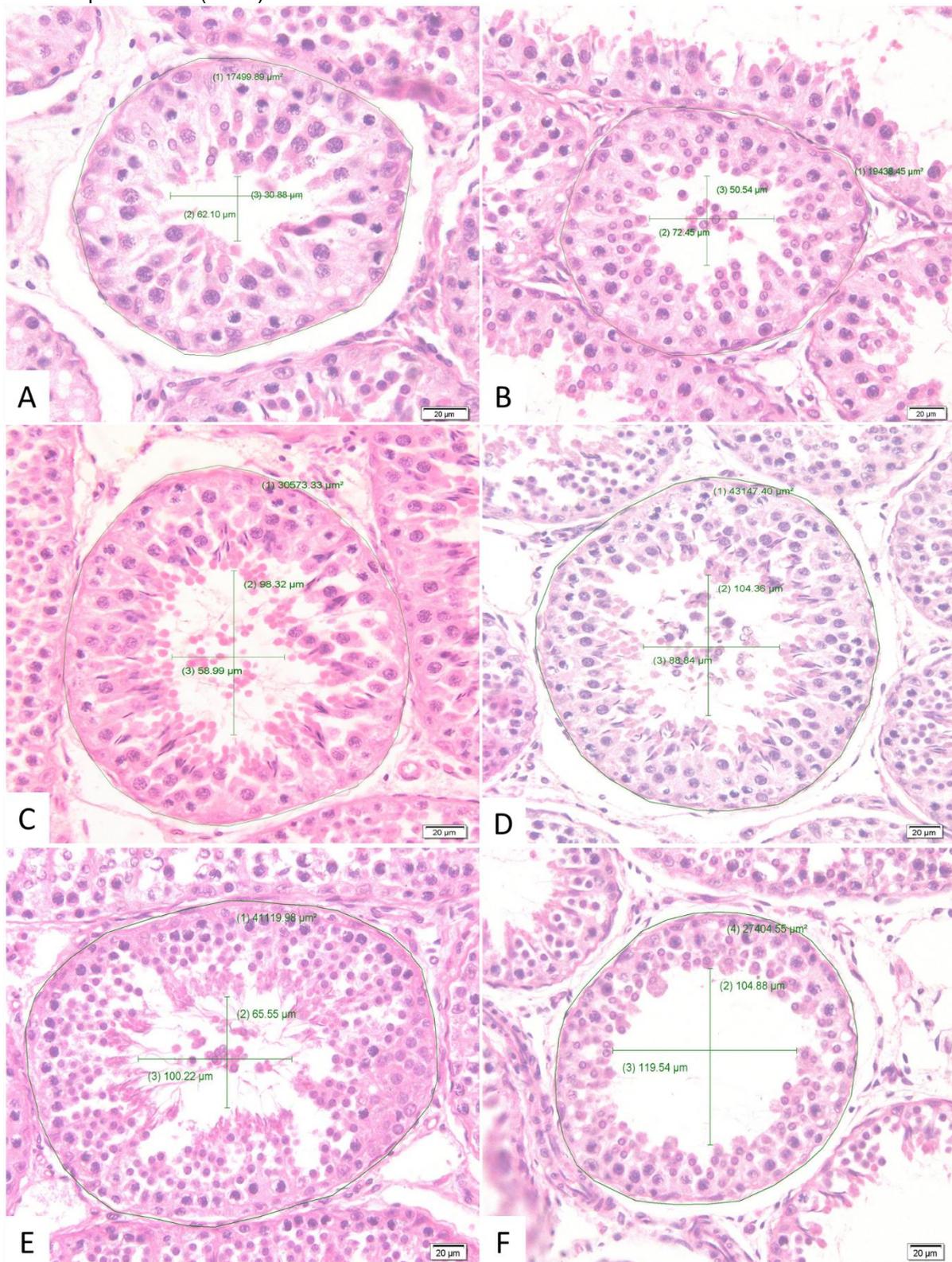
Figura 11 - Médias da área dos túbulos seminíferos (μm^2) dos três grupos estudados. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

A Figura 12 mostra as fotomicrografias registradas no momento das mensurações das áreas dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais dos grupos estudados. Note que a área dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais do grupo controle (Fig. 12A e 12B) é menor do que a área dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais do grupo de 30 dias (Fig. 12C e 12D). De todos os grupos estudados, a área dos túbulos seminíferos dos testículos dos animais que foram submetidos a 60 dias de tratamento foi a maior (Fig. 12E e 12F). Além disso, foi observado que a luz dos túbulos seminíferos foi aumentada pelo tratamento com letrozol durante 30 e 60 dias.

Figura 12 - Morfometria dos testículos de carneiros dos grupos controles (A e B), 30 dias de tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral (C e D) e 60 dias de tratamento com 0,5mg/kg letrozol por via oral (E e F).



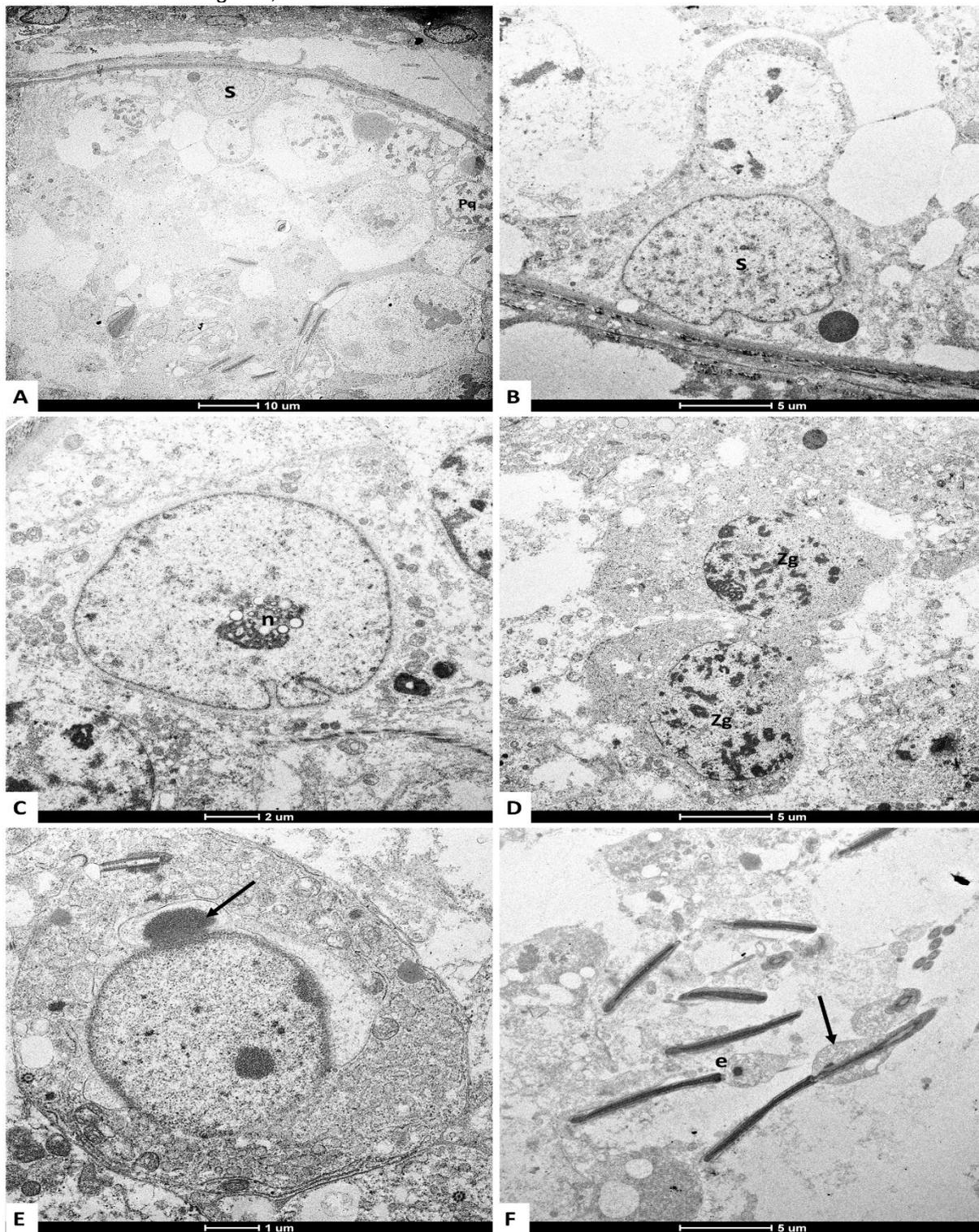
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

6.6 SEGUNDA ETAPA (II) – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A MET dos testículos e espermatozoides dos carneiros estudados mostra que o tratamento com o inibidor de aromatase não causou alterações a nível ultraestrutural. Nos testículos dos animais dos grupos controles foi possível observar os constituintes celulares, como células de Sertoli, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas. A lâmina basal dos túbulos seminíferos encontrava-se bem preservada (Fig. 13). Nas observações ultraestruturais dos testículos dos animais que receberam 0,5mg/kg de letrozol por via oral durante 30 e 60 dias consecutivos observou-se as células da linhagem germinativa, como espermatogônia, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas, além de células de Sertoli (Fig. 14 e Fig. 15). Nestes grupos a morfologia das células estava preservada e não apresentaram alterações na sua forma e nem nos seus constituintes citoplasmáticos, sendo assim, o tratamento com letrozol não alterou a ultraestrutura das células da linhagem germinativa dos testículos de carneiros.

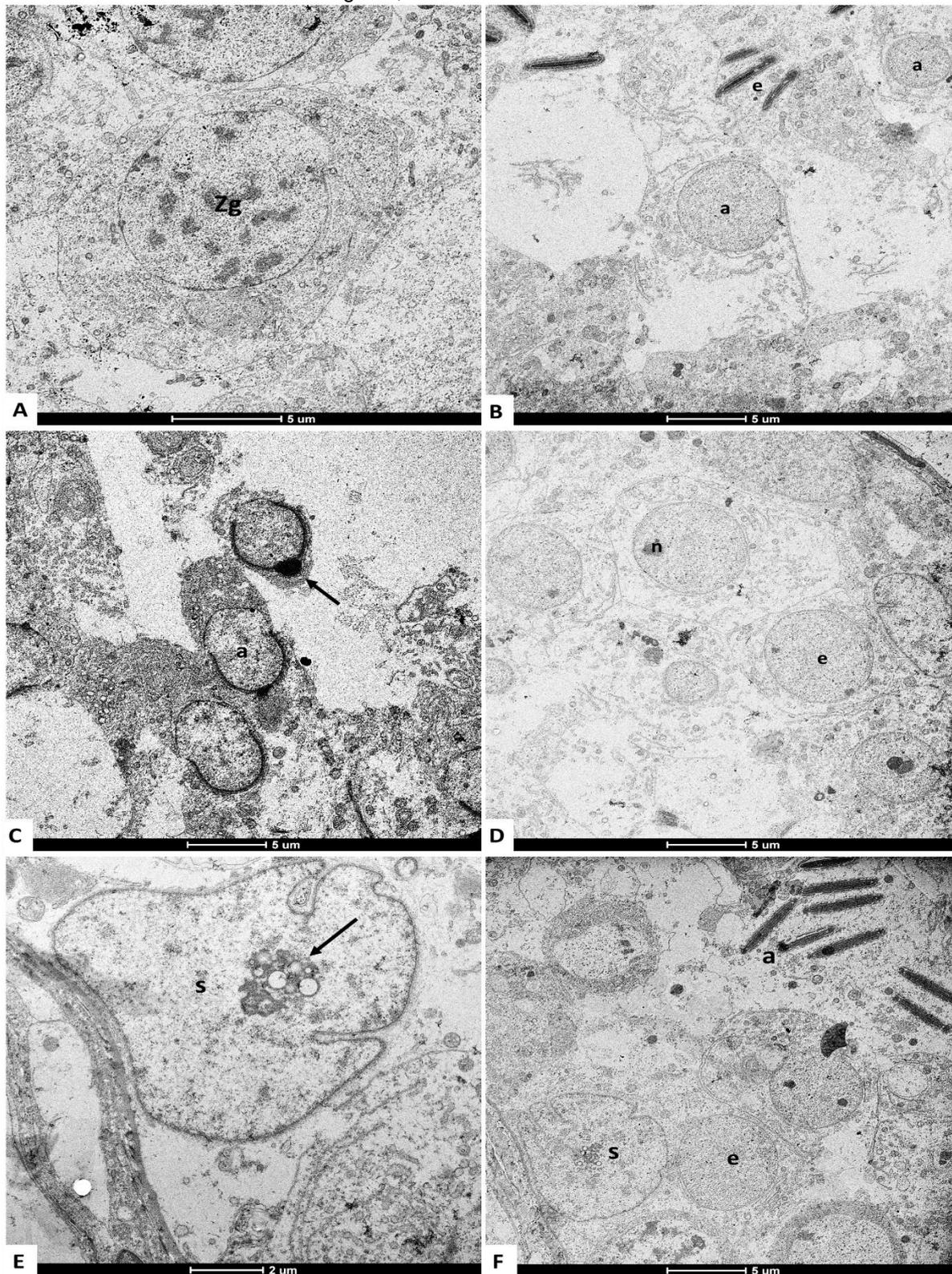
Na MET dos espermatozoides foi possível observar os constituintes que formam essas células em todos os grupos, como a cabeça (Fig. 16D), a peça intermediária (Fig. 16A e 16B) e cauda (Fig. 16E e 16F). O tratamento com o inibidor de aromatase não causou alterações na morfologia dessas células.

Figura 13 - Ultraestrutura dos testículos dos animais dos grupos controles. (A): S: Célula de Sertoli; Pq: espermatócito em paquíteno. (B): S: Célula de Sertoli. (C): n: núcleo da célula de Sertoli. (D): Zg: espermatócito em zigóteno. (E): n: núcleo da espermatíde arredondada; seta: acrossomo em formação. (F): e: espermatíde alongada; seta: corpos residuais. Eletromicrografia, método MET.



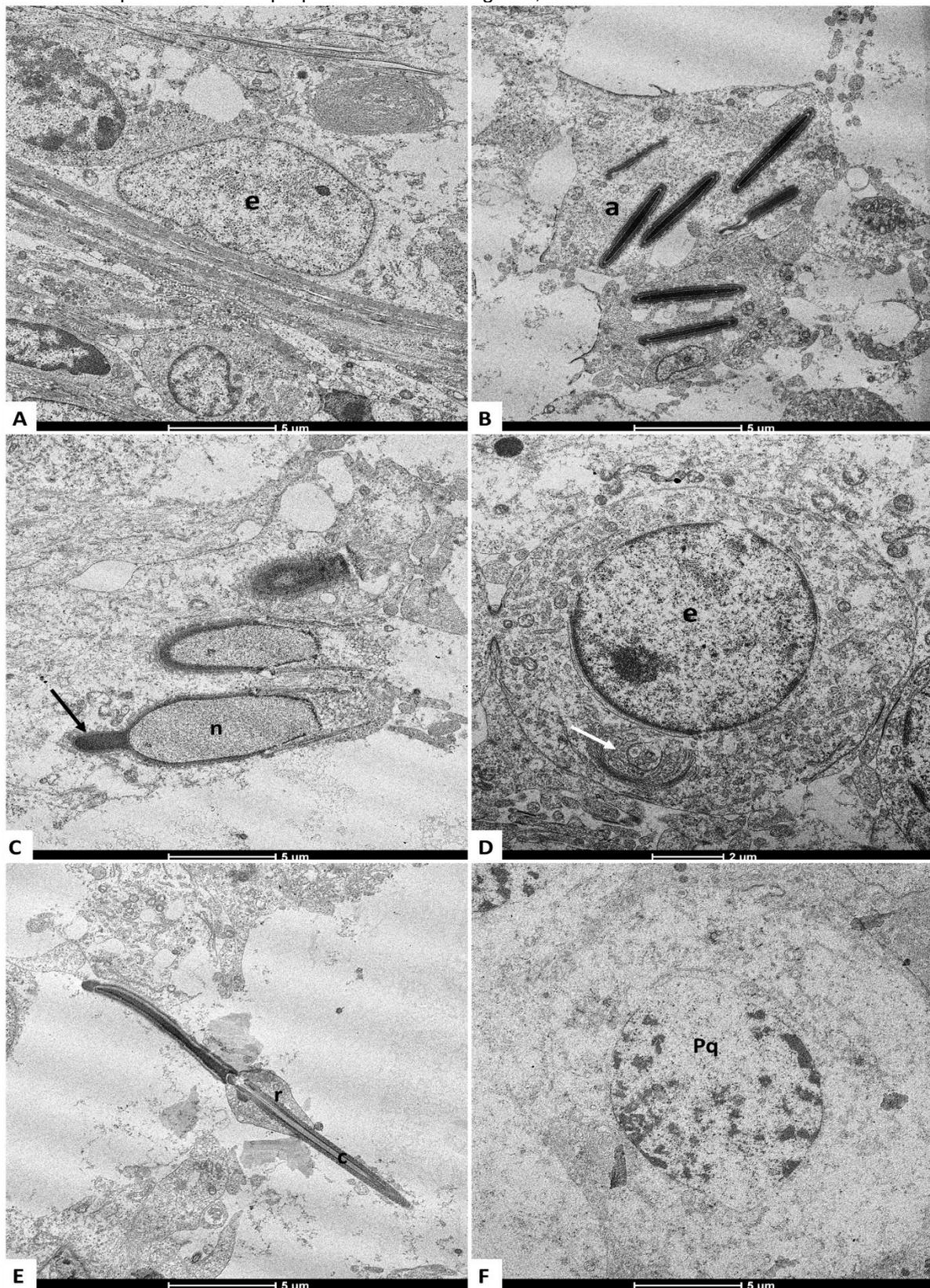
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Figura 14 - Ultraestrutura dos testículos de carneiros que receberam 0,5mg/kg de letrozol por via oral diariamente durante 30 dias. (A): Zg: Espermatócito em zigóteno. (B): a: espermatíde arredondada; e: espermatíde alongada. (C): a: espermatíde arredondada; seta: acrossomo. (D): n: núcleo da espermatíde; e: espermatíde arredondada. (E): s: célula de Sertoli; seta: núcleo da célula de Sertoli. (F): s: célula de Sertoli; a: espermatíde alongada; e: espermatíde arredondada. Eletromicrografia, método MET.



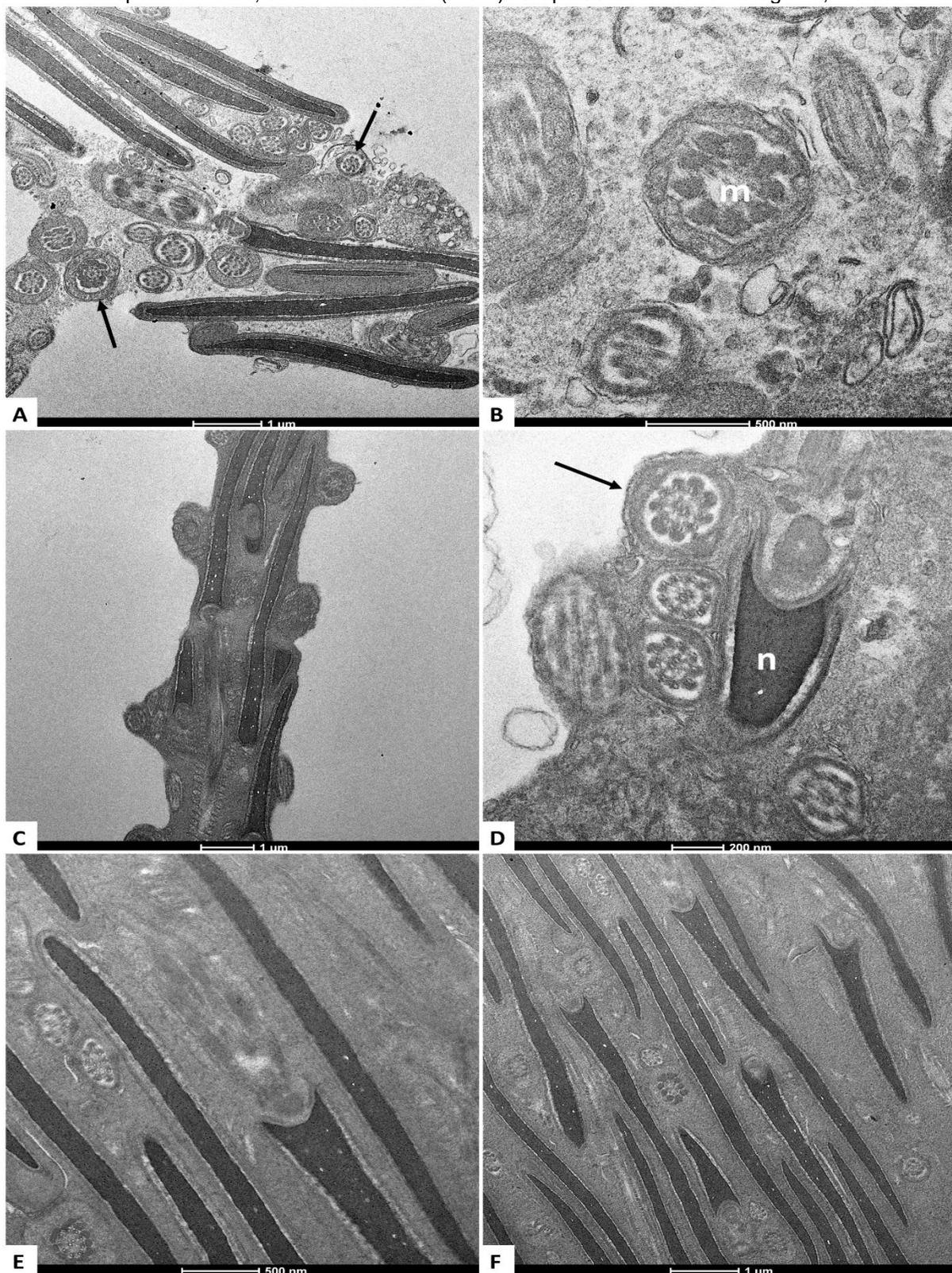
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Figura 15 - Ultraestrutura dos testículos de carneiros que receberam 0,5mg/kg de letrozol por via oral diariamente durante 60 dias. (A): e: Espermatogônia. (B): a: espermátide alongada. (C): n: núcleo da espermátide; seta: acrossomo. (D): e: espermátide arredondada; seta branca: complexo de Golgi. (E): c: cauda do espermatozoide; r: corpo residual. (F): Pq: espermatócito em paquíteno. Eletromicrografia, método MET.



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Figura 16 - Ultraestrutura dos espermatozoides de carneiros. (A): Grupo controle: setas: mitocôndria. (B): Grupo controle: m: mitocôndria. (C): Grupo 30 dias. (D): Grupo 30 dias: n: núcleo do espermatozoide; seta: mitocôndria. (E e F): Grupo 60 dias. Eletromicrografia, método MET.



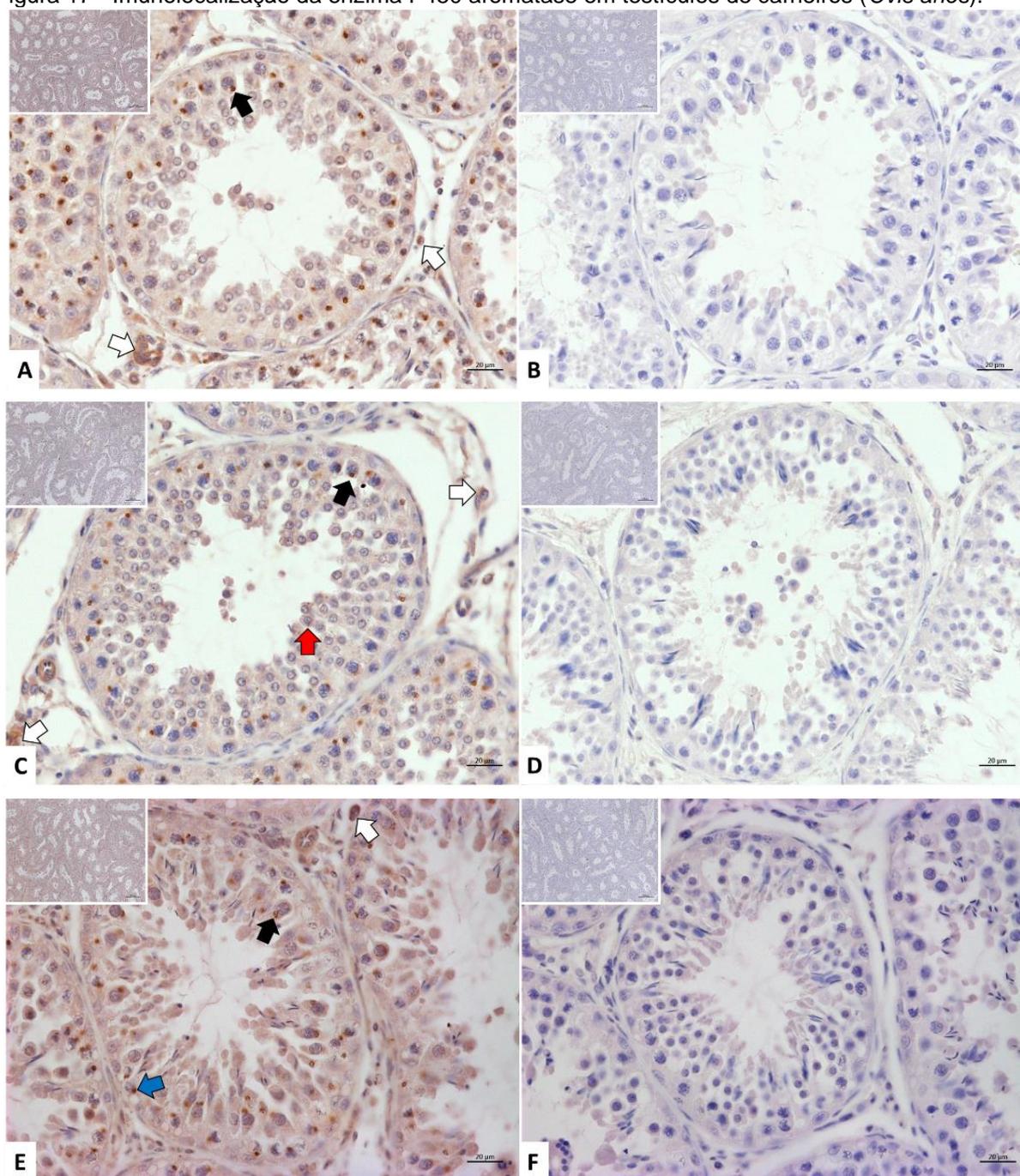
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

6.7 SEGUNDA ETAPA (II) – IMUNOHISTOQUÍMICA

Nos animais do grupo controle a aromatase foi imunolocalizada nas células de Leydig e espermatócitos primários. Células de Sertoli, células mioídes, espermatogônias e espermatídes não mostraram imunomarcacão para P450 aromatase nos animais do grupo controle. Em todas as imunomarcacões identificadas no presente estudo, a imunorreatividade foi observada especificamente no citoplasma das células, na região correspondente ao retículo endoplasmático (Fig. 13A).

No grupo de animais que tomaram letrozol durante 30 dias consecutivos, a imunomarcacão foi observada nas células de Leydig, nos espermatócitos e espermatídes. Não foi observada imunomarcacão em células de Sertoli, células mioídes e espermatogônias. A intensidade de marcação foi diferente entre os grupos de células germinativas, sendo mais forte nos espermatócitos e mais fraca, porém presente, nas espermatídes. A imunomarcacão também foi fraca nas células de Leydig (Fig. 13C).

Figura 17 - Imunolocalização da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros (*Ovis aries*).



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Legenda: A e B grupos controles (G1 e G2): A - imunohistoquímica do grupo controle (seta preta – imunorreatividade em espermatócitos; seta branca – imunorreatividade em células de Leydig) e B – controle negativo do grupo controle; C e D grupo 30 dias tratado com letrozol (G3): C – imunohistoquímica do grupo 30 dias (seta preta – imunorreatividade em espermatócitos; seta branca – imunorreatividade em células de Leydig; seta vermelha – imunorreatividade em espermatogônias) e D – controle negativo do grupo 30 dias; E e F grupo 60 dias tratado com letrozol (G4): E – (seta preta – imunorreatividade em espermatócitos; seta branca – imunorreatividade em células de Leydig; seta azul – imunorreatividade em espermatogônias) e F – controle negativo do grupo 60 dias. Barras: 20µm

Após 60 dias de tratamento diário com letrozol, a imunomarcagem para P450 aromatase foi identificada somente em células de Leydig, espermatogônias e espermatócitos. A intensidade da marcação foi mais forte nos espermatócitos e mais fraca nas espermatogônias e células de Leydig. Não foi observada imunomarcagem nas células de Sertoli, células mioides ou espermatídes (Fig. 13E).

Quando o anticorpo primário foi substituído por PBS, não houve imunomarcagem em nenhum dos grupos celulares (Fig. 13B, 13D e 13F).

Tabela 6 - Imunolocalização da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros dos grupos controles e tratados com letrozol durante 30 e 60 dias.

| Citocromo P450 aromatase | Controle | 30 dias | 60 dias |
|---------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Células de Leydig | +++ | +++ | + |
| Células de Sertoli | --- | --- | --- |
| Células mioides | --- | --- | --- |
| Espermatogônias | --- | --- | + |
| Espermatócitos | +++ | +++ | +++ |
| Espermatídes | ---- | + | --- |

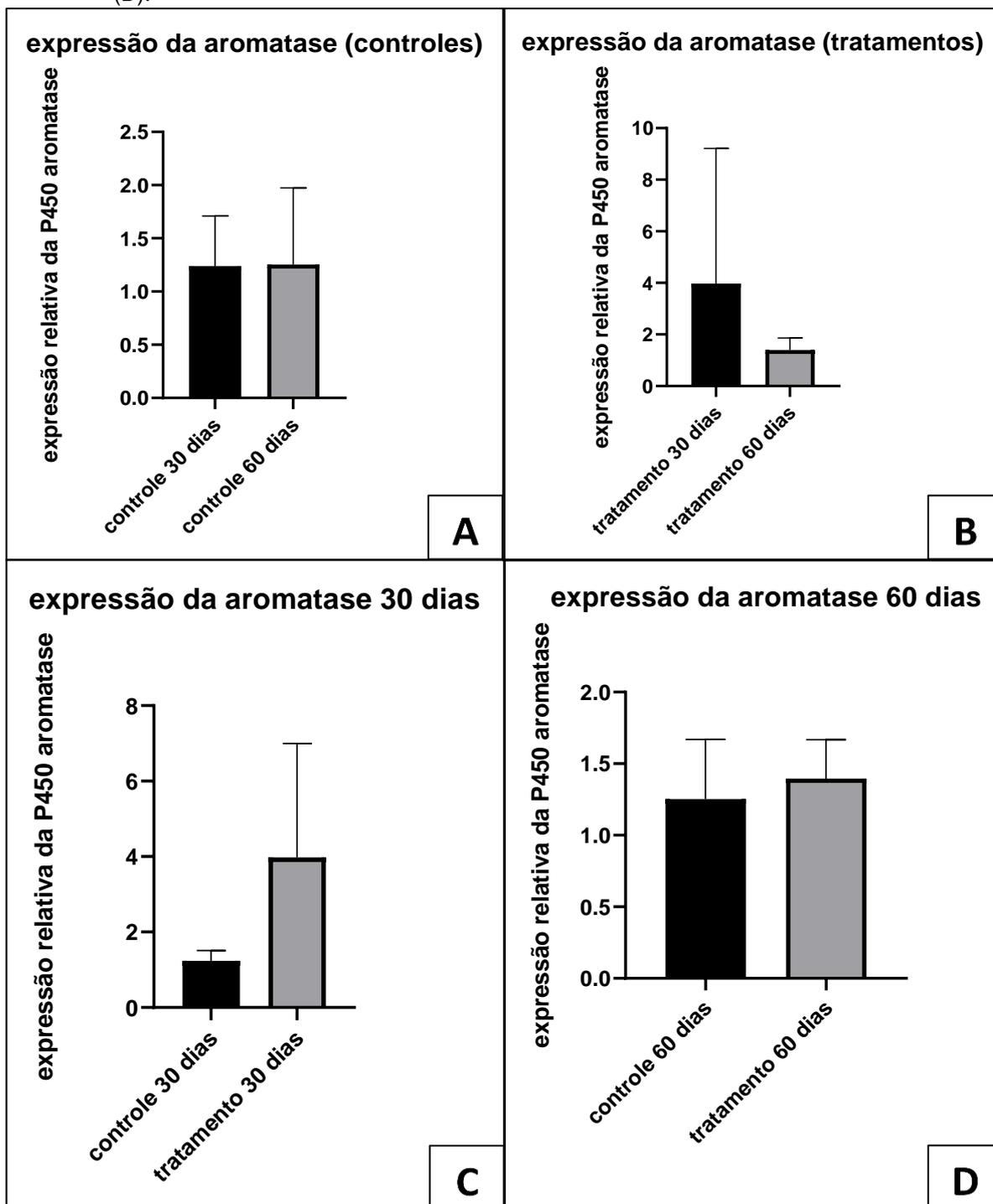
Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Legenda: Imunomarcagem forte (+++), imunomarcagem fraca (+), ausência de imunomarcagem (---).

6.8 SEGUNDA ETAPA (II) – PCR EM TEMPO REAL

A expressão relativa do gene CYP19 foi detectada nos testículos de carneiros do grupo controle e o nível de expressão entre esses grupos não resultou em diferença significativa ($P=0.99$) $>0,05$ (Fig. 14A).

Figura 18 - Expressão do gene CYP19 nos testículos de carneiros entre os grupos controles (A), grupos tratamentos (B), controle e tratamento por 30 dias (C) e controle e tratamento por 60 dias (D).



Fonte: (LISBOA NETO, 2020)

Os animais que tomaram o letrozol durante 30 dias consecutivos tiveram os níveis de expressão relativa da aromatase aumentados, mas quando comparados com o grupo controle, a diferença não foi significativa ($P=0,7930$) $>0,05$ (Fig. 14C).

Aos 60 dias de tratamento com letrozol, os animais tiveram uma diminuição dos níveis de expressão relativa do gene CYP19 quando comparados com o grupo de

animais que tomaram o inibidor de aromatase durante 30 dias, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa ($P=0,7930 >0,05$) (Fig. 14B).

Os níveis relativos de expressão gênica do grupo de 60 dias também foram comparados com o grupo controle, contudo não houve diferença significativa ($P=0,2898 >0,05$) (Fig. 14D).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Esta pesquisa inédita investigou os efeitos do letrozol sobre os parâmetros seminais, circunferência escrotal, morfologia testicular, expressão gênica e a imunolocalização da enzima P450 aromatase em testículos de carneiros tratados com letrozol por via oral, além do efeito de uma única aplicação do letrozol sobre as concentrações séricas de testosterona e estradiol. A seguir, serão abordados os aspectos relevantes encontrados nesse estudo, tendo como base as pesquisas encontradas na literatura.

Na primeira etapa da pesquisa, foi feito um estudo da dosagem hormonal que consistiu em testar se o letrozol pode causar alterações nas concentrações séricas de testosterona e estradiol em carneiros, quando administrado por via oral. Para esse estudo, foram testadas três doses, que foram administradas apenas uma vez. Nessa fase, amostras de sangue foram coletadas e submetidas à técnica de radioimunoensaio, uma técnica que quantifica reações antígeno-anticorpo, sendo possível se obter medidas com alta precisão, especificidade e alta sensibilidade (ZAIDI e KAMAL, 1993).

A dosagem sérica de estradiol mostrou que nas primeiras duas horas após a aplicação do letrozol houve um aumento significativo na concentração desse hormônio nos três grupos de animais estudados. O que explica esse fato é que a aplicação do inibidor de aromatase inicialmente gera um aumento nos níveis do mRNA e da proteína aromatase em resposta ao tratamento (HARADA et al., 1999).

Sabe-se que os estrógenos são sintetizados a partir dos andrógenos pela ação da enzima P450 aromatase (CONLEY e HINSHELWOOD, 2001). Devido à ação do letrozol nos momentos seguintes à aplicação, a concentração de estradiol começou a diminuir em todos os grupos estudados a partir de 4 a 6 horas após a aplicação do inibidor da aromatase, atingindo o mínimo em 24 horas. O letrozol quando administrado *in vivo* diminui os estrógenos testiculares e circulantes sem modificar as concentrações de gonadotrofinas e testosterona (AT-TARAS et al., 2006). Os resultados encontrados no presente estudo mostram que é possível bloquear a aromatase e conseqüentemente a síntese de estradiol utilizando o letrozol por via oral em carneiros. Contudo, sugerimos que sejam realizadas mais pesquisas relacionadas à absorção desse princípio ativo pela via oral em ruminantes.

A análise das concentrações de testosterona não mostrou diferenças significativas quando os momentos após a administração do letrozol foram comparados com o primeiro momento, nem quando as concentrações foram comparadas entre os grupos em cada momento. Segundo At-Taras et al. (2008), a produção de testosterona não é afetada pela administração de inibidores da enzima P450 aromatase *in vivo*. Esses achados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

A avaliação seminal mostrou que o tratamento com letrozol durante 30 e 60 dias não afeta a qualidade espermática. Nossa pesquisa mostra ainda um aumento não significativo na concentração, quantidade de espermatozoides íntegros, integridade acrossomal e resistência ao estresse oxidativo e melhora nos parâmetros de cinética espermática.

Rezaei et al. (2019) estudaram os efeitos do letrozol aplicado por via intramuscular e subcutânea sobre os parâmetros reprodutivos de caprinos. A concentração espermática foi aumentada pelo tratamento com inibidor de aromatase, porém os parâmetros de motilidade total e progressiva, defeitos, integridade acrossomática e integridade da membrana celular não foram afetados.

Em bubalino a expressão aromatase no sêmen está relacionada com a maior motilidade dos espermatozoides. Da mesma forma, foi observado também maior expressão nos espermatozoides móveis quando comparados com espermatozoides imóveis (TIWARI et al., 2008). No presente estudo a expressão da aromatase no sêmen não foi avaliada, contudo foi possível observar que o tratamento com inibidor de aromatase não causou alterações na motilidade espermática.

A capacidade de produção espermática pode ser aumentada utilizando inibidores de aromatase, segundo estudos realizados por Berger et al. (2008) e At-taras et al., (2006). Os resultados do nosso estudo mostram um aumento na concentração espermática de carneiros que tomaram o letrozol, porém esse parâmetro não apresentou diferença estatística.

Em vista dessas observações, sugerimos que o tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral diariamente pode causar uma melhora na qualidade espermática em ovinos, contudo mais pesquisas são necessárias para confirmar essa hipótese.

Na análise da circunferência escrotal dos animais estudados foi observado que o tratamento com o letrozol induziu um aumento desse parâmetro, aos 30 e 60 dias de tratamento. Antes do início do experimento foram feitas as medidas da

circunferência escrotal de todos os animais utilizados na pesquisa. Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com 0,5mg/kg de letrozol administrado por via oral durante 30 e 60 dias provoca um aumento desse parâmetro. Pesquisas avaliando a inibição da síntese de estrógenos em javalis mostram que a administração do inibidor da aromatase resulta em um aumento do tamanho testicular (AT-TARAS et al., 2006).

Esses resultados estão de acordo com pesquisas realizadas em caprinos, suínos e ratos, que descrevem um aumento do tamanho dos testículos causado pelo tratamento com letrozol (REZAEI et al., 2019; AT-TARAS et al., 2006; TURNER et al., 2000). Ainda vale a pena ressaltar que o tratamento utilizado no presente estudo aumentou os parâmetros de circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos, sem causar modificações na ultraestrutura das células da linhagem germinativa. A morfologia das células manteve-se preservada em todos os grupos estudados. Os constituintes ultraestruturais dos grupos controles não evidenciaram alterações da sua morfologia e foram comparados com as descrições feitas em carneiros durante o desenvolvimento até a fase adulta adultos por Steger e Wrobel (1996). Os autores encontraram as células de Sertoli e células germinativas com suas organelas preservadas. Gastel et al. (1995) encontraram variações sazonais sobre a morfologia testicular de carneiros da raça Corriedalle, afetando principalmente as células de Sertoli. O diâmetro dos túbulos seminíferos foi correlacionado significativamente com a circunferência escrotal e com os níveis de testosterona. No presente estudo diâmetro dos túbulos seminíferos e a circunferência escrotal foram aumentados significativamente pelo tratamento com o inibidor de aromatase.

Foi observado na segunda etapa do presente trabalho que os níveis de testosterona se apresentaram mais altos nos animais tratados com letrozol do que os animais dos grupos controles e que os níveis de estradiol foram mais baixos, quando comparados com os grupos controles. Em todas as comparações as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, provavelmente devido ao número de amostras analisadas na pesquisa, contudo este é o primeiro estudo a avaliar a influência do letrozol sobre os níveis séricos de testosterona e estradiol, quando administrado por via oral em carneiros.

Em caprinos a administração de 0,25mg/kg de letrozol causa um aumento dos níveis séricos de testosterona e diminuição dos níveis séricos de estradiol (REZAEI et al., 2019). Pesquisas utilizando o letrozol administrado cronicamente em ratos

mostram uma diminuição nos níveis séricos de estradiol (KONDAREWICZ et al., 2011). Bilinksa et al. (1997) observaram o impedimento da conversão de testosterona e estradiol em testículos de carneiros, em experimento *in vitro* usando o fadrazole, que é um inibidor de aromatase não esteroideal menos potente que o letrozol. Nosso experimento, realizado em carneiros *in vivo* mostra que é possível obter o bloqueio da síntese de estradiol através da administração do letrozol por via oral nesses animais.

O tratamento com letrozol induziu um aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos aos 30 e 60 dias de tratamento. A morfologia celular se manteve preservada, indicando que não houve degeneração testicular. Outros estudos também indicam um aumento em parâmetros como tamanho testicular (TURNER et al., 2000), aumento no número de células de Sertoli e consequente aumento do tamanho testicular e capacidade de produção de espermatozoides (BERGER et al., 2008; ATTARAS et al., 2006). Segundo Berger et al. (2013) também é possível aumentar a população de células de Sertoli e consequentemente obter aumento da capacidade de produção de espermatozoides com a utilização de antagonistas de receptores de estrógenos.

A aromatase é um complexo enzimático que catalisa a biossíntese de estrógenos a partir de andrógenos e localiza-se no retículo endoplasmático de vários tecidos do organismo, como gônadas, cérebro, placenta e tecido adiposo. Pesquisas realizadas em várias espécies de animais domésticos e silvestres, como ratos, suínos, equinos, ovinos, ursos também seres humanos, mostraram que o sítio de imunolocalização da P450 aromatase é em células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas (PILUTIN et al., 2014; CARREAU et al., 2007; SIPAHUTAR et al., 2003; CONLEY e HINSHELHOOD, 2001; BILINSKA et al., 1997; KOMATSU et al., 1997), entretanto a imunomarcção foi observada em todo o citoplasma dessas células.

Segundo Carreau et al. (2001) a aromatase está localizada no retículo endoplasmático de várias células do organismo. Nossa pesquisa mostra a imunomarcção específica no citoplasma das células germinativas, sendo possível distinguir o tipo de imunomarcção, que nas células de Leydig foi observada em todo o citoplasma e nas células germinativas, particularmente espermátides e espermatócitos primários, essa imunomarcção apareceu como um único grânulo redondo no citoplasma, corroborando com as informações encontradas por Liguori et

al. (2018). Esses dados demonstram a alta especificidade e qualidade da técnica imunohistoquímica utilizada no presente estudo.

Nos animais do grupo controle, a imunolocalização da P450 arom foi observada nas células de Leydig e nos espermatócitos. As células de Leydig são as principais responsáveis pela síntese de andrógenos, entretanto a conversão de andrógenos em estrógenos ocorre também em células germinativas (BILINSKA et al., 2000).

De acordo com Sipahutar et al. (2003) a produção local de aromatase pelas células de Sertoli em garanhões está relacionada com a idade, sendo maior em animais adultos. Essa produção é necessária para a espermatogênese, particularmente a proliferação das espermatogônias, espermiogênese e maturação dos espermatozoides. Contudo, em ratos adultos a P450 arom se expressa pelas células de Leydig que sintetizam estradiol ativamente em uma proporção maior do que a observada pelas células de Sertoli adultas (LEVALLET et al., 1998).

A presente pesquisa foi realizada com carneiros em atividade sexual. A maturidade sexual é um fator predominante para a imunolocalização de aromatase, sendo ausente em células de Sertoli e presente em células de Leydig em animais adultos Carreau et al. (2011); Bilinska et al. (1997). Sendo assim, nossos resultados corroboram com pesquisas encontradas na literatura que mostram que em ovinos as células germinativas também são sítios de síntese de estrógenos (BILINSKA et al., 1997). Na realização da análise de PCR em tempo real foi possível identificar a expressão do gene CYP19 nos testículos de carneiros, o que indica que nos ovinos o gene da enzima responsável pela biossíntese de estrógenos a partir dos andrógenos também se expressa nas gônadas masculinas. A expressão e imunolocalização da P450 arom também já foi relatada em outras espécies, como ratos (LEVALLET et al., 1998; NITTA et al., 1993), equinos (ALMEIDA et al., 2011; ALMADHIDI et al., 1995) e suínos (CONLEY et al., 1996).

As espermátides apresentaram imunorreatividade ao tratamento com letrozol durante 30 dias por via oral, o que pode demonstrar uma indução da ativação de novos sítios de imunolocalização da P450 arom em carneiros. Segundo Pilutin et al. (2014) em animais tratados com letrozol a imunorreatividade pode ser detectada em espermatogônias, espermatócitos e espermátides e células de Sertoli. Nos animais do presente estudo, as células de Sertoli não apresentaram imunorreatividade para P450 arom, entretanto o tratamento com Letrozol durante 30 dias consecutivos estimulou mais células germinativas a sintetizar estrógenos. Essas informações mostram que a

aplicação diária do letrozol por via oral induz a alterações na imunolocalização da enzima P450 arom nos testículos de carneiros.

Em relação ao gene CYP19, o tratamento realizado com o letrozol durante 30 dias consecutivos induziu um aumento nos níveis relativos de expressão gênica no grupo de animais tratados quando comparados com os animais do grupo controle. As aplicações diárias do inibidor da aromatase causaram um aumento no nível de expressão do mRNA e da proteína nos testículos. Esse aumento, causado em ambos os níveis, pode ser explicado por causa de um aumento na concentração de gonadotropinas em resposta à diminuição das concentrações plasmáticas de estradiol (HARADA et al., 1999), contudo as alterações encontradas nesta pesquisa não foram estatisticamente significativas, talvez porque a quantidade de amostras utilizadas não foi o suficiente para identificar alguma diferença estatística. Sendo assim, esta pesquisa é um ponto de partida para estudos futuros, abrindo possibilidades de se realizar tratamentos com inibidores de aromatase para avaliar efeitos do tratamento a longo prazo com doses mais baixas, visto que o tratamento com 0,5mg/kg de letrozol por via oral durante 30 dias consecutivos, aumenta os níveis de expressão gênica em testículos de carneiros, mesmo que não seja de forma estatisticamente significativa .

Nos testículos de carneiros tratados com letrozol durante 60 dias consecutivos, as células germinativas foram os principais locais de imunorreatividade para a enzima P450 aromatase. As células de Leydig apresentaram imunomarcção fraca, diferente do observado nos animais dos demais grupos. O tratamento com inibidor de aromatase alterou os sítios de imunorreatividade, sendo positivos em espermatogônias e espermátócitos e células de Leydig, porém nessas últimas a imunomarcção foi fraca. Pilutin et al. (2014) afirmam que é possível detectar imunomarcção no citoplasma das células de Leydig de testículos de animais tratados cronicamente com letrozol, contudo a intensidade da imunorreatividade à aromatase pode ser menor em animais tratados. Essas informações citadas estão de acordo com as encontradas analisadas no presente estudo e mostram que, apesar do tratamento com letrozol alterar a intensidade de imunorreatividade em células de Leydig e células germinativas, ainda é possível identificá-las em animais tratados.

No grupo de animais que foram tratados durante 60 dias com letrozol os níveis de expressão do gene CYP19 também não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao seu grupo controle, o que indica que o efeito do tratamento crônico com o inibidor da aromatase modifica os níveis de expressão gênica da P450

arom, contudo outros tratamentos com períodos mais prolongados serão necessárias para se definir até que ponto os níveis de expressão do gene CYP19 podem ou não interferir na produção espermática, na qualidade seminal ou na quantidade de espermatozoides produzidos. Nas análises histológicas dos túbulos seminíferos não foram observadas alterações do epitélio seminífero, indicando que não houve degeneração testicular. Os constituintes intertubulares, como por exemplo as células de Leydig, também não apresentaram alterações da morfologia tanto dos grupos controles como tratados. Dessa forma o tratamento com letrozol contribui para uma melhor performance reprodutiva de carneiros criados no Nordeste do Brasil. Essa pesquisa serve como um ponto de partida para pesquisas no intuito de obter uma melhor eficiência reprodutiva de pequenos ruminantes, podendo ser testado em animais de idade avançada ou com patologias espermáticas, abrindo possibilidades de manter animais de alto valor zootécnico por mais tempo na reprodução.

Não foi objetivo dessa pesquisa criar uma nova biotecnologia para a reprodução em pequenos ruminantes, contudo, sabendo que é possível se obter um aumento na concentração espermática, sem interferir na qualidade seminal, a ideia de testar essa possibilidade em trabalhos futuros surge como uma ótima opção para pesquisas futuras.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Conclui-se, com base nos resultados encontrados na presente pesquisa que o tratamento com o inibidor de aromatase não esteroide (letrozol) por via oral causa modificações nos níveis séricos de estradiol, aumenta os parâmetros de circunferência escrotal, aumenta o diâmetro dos túbulos seminíferos, causa modificações na expressão do gene CYP19, mantém ativos os sítios de imunolocalização da aromatase nos testículos, não interferindo na qualidade seminal de carneiros adultos tratados com 0,5mg/kg.

REFERÊNCIAS

ADELUST, H.; FARZINPOUR, A.; FARSHAD, A.; ROSTAMZADEH, J.; LOPEZ-BEJAR, M. Increased sperm cell production in ageing rooster by an oral treatment with an aromatase inhibitor and a natural herbal extract designed for improving fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.52, n.4, p. 58-60, 2017.

ALMADHIDI, I.; SHÉRALINIG.; SILBERZAHN, P.; GAILLARD, J.L. immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.43, p.571-577, 1995.

ALMEIDA, J.; CONLEY, A.J.; MATHEWSON, L.; BALL, B.A. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. **Reproduction**. v.141, p.841-848, 2011.

AT-TARAS, E.E.; BERGER, T.; MCCARTHY, M.J.; CONLEY, A.J.; NITTA-ODA, B.J.; ROSER, J.F. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. **Journal of Andrology**. v.27, n.4, p.552-559, 2006.

AT-TARAS, E.E.; KIM, I.C.; BERGER, T.; CONLEY, A.J.; ROSER, J.F. Reducing endogenous estrogen during development alters hormone production by porcine Leydig cells and seminiferous tubules. **Domestic Animal Endocrinology**. v.34, p.100-108, 2008.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J-C. **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins**. INRA. Nouzilly. 231p. 1993.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BERGER, T.; CONLEY, A. J. Reducing endogenous estrogen during puberal life does not affect boar libido or sperm fertilizing potential. **Theriogenology**. v.82, p.627-635, 2014.

BERGER, T.; CONLEY, A. J.; KLOMPENBERG, M. V.; ROSER, J. F.; HOVEY, R. C. Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.366, p.53-58, 2013.

BERGER, T.; McCARTHY, M.; PEARL, C. A.; AT-TARAS, E.; ROSER, J. F.; CONLEY, A. J. Reducing endogenous estrogen during the neonatal and juvenile periods affects reproductive tract and sperm production in postpuberal boars. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 218-235, 2008.

BERTELLI, G. Sequencing of aromatase inhibitors. **British journal of Cancer**. v.93 (Suppl. 1), p.S6-S9, 2005.

BHATNAGAR, A. S. The Discovery and mechanism of action of letrozole. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 105, p.7-17, 2007.

BHATNAGAR, A. S.; MULLER, P.; SCHENKEL, L.; TRUNET, P. F.; BEH, I.; SCHIEWECK, K. Inhibition of estrogen biosynthesis and its consequences on gonadotrophin secretion in the male. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.41, p.437-443, 1992.

BIEGON, A.; KIM, S. W.; ALEXOFF, D. L.; JAYNE, M.; CARTER, P.; HUBBARD, B.; KING, P.; LOGAN, J.; MUENCH, L.; PARETO, D.; SCHLYER, D.; SHEA, C.; TELANG, F.; WANG, G-J.; XU, Y.; FOWLER, J. S. Unique distribution of aromatase in the human brain: in vivo studies with PET and [N-methyl-11C] vorozole. **Synapse**. v.64, n.11, p.801-807, 2010.

GASTEL, T.; BIELLI, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; TAGLE, R.; FRANCO, J.; LABORDE, D.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedalle rams. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p.59-75, 1995.

BILINSKA, B.; LESNIAK, M.; SCHMALZ, B. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? **Reproduction, Fertility and Development**. v.9, n.2, 193-200, 1997.

BILINSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; SADOWSKA, J.; CARREAU, S. Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors α and β in testicular cells – an immunohistochemical study of the bank vole. **Acta Histochemica**. v.102, p.167-181, 2000.

BOER, H.; VERSCHOOR, L.; RUINEMANS-KOERTS, J.; JANSEN, M. A. Letrozole normalizes serum testosterone in severely obese men with hypogonadotropic hypogonadism. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v.7, n.3, p.211-215, 2004.

BUZDAR, A. U.; ROBERTSON, J. F. R.; ELLERMANN, W.; NABHOLTZ, J. M. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation

aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. **Cancer**. v.95, n.9, p.2006-2016, 2002.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; SILVA FILHO, A.H.S.; MONTEIRO, A.W.U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semi-árido nordestino durante o período seco e chuvoso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.40, n.3, p. 185-189, 2003.

CARREAU, S. germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.178, p.65-72, 2001.

CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; SILVA, F.R.M.B.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen signaling in testicular cells. **Life Science**. v.89, p.584-587, 2011.

CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. **Advances in Medical Sciences**. v.57, n.1, p.31-36, 2012.

CARREAU, S.; DELALANDE, C.; SILANDRE D.; BOURGUIBA, S.; LAMBARD, S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 246, p. 65-68. 2006.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B.; LEVALLET, J. Sources of oestrogens in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology**. v.22, p.211-223, 1999.

CARREAU, S.; SILANDRE, D.; BOURGUIBA, S.; HAMDEN, K.; SAID, L.; LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; DELALANDE, C. Estrogens and male reproduction: a new concept. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.40, p.761-768, 2007.

CAVALLINI, G.; BERETTA, G.; BIAGIOTTI, G. Preliminary study of letrozole use for improving spermatogenesis in non-obstructive azoospermia patients with normal serum FSH. **Asian Journal of Andrology**. v.13, n.6, p.895-897, 2011.

COLE, P. A.; ROBINSON, C. H. Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.33, n.11, p.2933-2942, 1990.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**. v.121, n.5, p. 685-695. 2001.

CONLEY, A.J.; CORBIN, C.J.; HINSHELWOOD, M.M.; LIU, Z.; SIMPSON, E.R.; FORD, J.J.; HARADA, N. Functional aromatase expression. In porcine adrenal and testis. **Biology of Reproduction**. v.54, p.497-505, 1996.

CORFIELD, J. R.; HARADA, N.; IWANIUK, A. N. Aromatase expression. In the brain of the ruffed grouse (*Bonasa umbellus*) and comparisons with other galliform birds (Aves, Galliformes). **Journal of Chemical Neuroanatomy**. v.47, p.15-27, 2012.

COSTANZO, L. S. **Physiology**. Philadelphia: Saunders Company, 1998, p. 392.

COUMAILLEAU, P. and KAH, O. Expression of the cyp19a1 gene in the adult brain of *Xenopus* is neuronal and not sexually dimorphic. **General and Comparative Endocrinology**. v.221, p.203-212.

DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. A. Androgens and male fertility. **World Journal of Urology**. v.21, p.341–345. <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-003-0365-9>. 2003.

DUNKEL, L. Use of aromatase inhibitor to increase final height. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.254-255, p.207-216, 2006.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.180, 2004.

ELLENPORT, C.R. Aparelho urogenital geral. In: GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, vol. 1, cap. 9, p. 136-139, 1986.

ELLINWOOD, W. E.; HESS, D. L.; ROSELLI C. E.; SCPE, H. G.; RESKO, J. A. Inhibition of aromatization stimulates luteinizing hormone and testosterone secretion in adult male rhesus monkeys. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.59, p.1088-1096, 1984.

EVANS, G.; MAXWELL, W.W.C. **Salamon's artificial inseminations of sheeps and goats**. Butterworths. P. 194, 1990.

FRESHMAN, J.L. Semen collection and evaluation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.17, n.3, p.104-107, 2002.

GABALDI, S.H.; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências agrárias e da Saúde**. Andradina-SP. v.2, n.2, p.66-70, 2002.

GHANEM, H.; SHAEER, O.; EL-SEGINI, A. Combination clomiphene citrate and antioxidante therapy for idiopatic male infertility: a randomized controlled trial. **Fertility and Sterility**. v.93, n.7, p.2232-2235, 2010.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v.21, n.2, p.81-94, 1998.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução animal**. 2ed. Roca: São Paulo. 395p. 2008.

GOOVAERTS, I.G.F.; HOFACK, G.G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Throne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v.66, n.2, p.323-330, 2006.

GRIER, H.J.; NEYDIG, C. Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH TR, MAZIK PM. (eds). **Cryopreservation of aquatic species**. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p1-12 2000.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Manole: São Paulo. 513p. 2003.

HARADA, N.; HONDA, S-I.; HATANO, O. Aromatase inhibitor and enzyme stability. **Endocrine-Related Cancer**. v.6, p.211-218, 1999.

HAUSLER. A.; SCHENKEL, L.; KRAHENBUHL, C.; MONNET, G.; BHATNAGAR, A. S. An in vitro method to determine the selective inhibition of estrogen biosynthesis by aromatase inhibitors. **Journal of Steroid Biochemistry**. v.33, p.125–131, 1989.

HAYES, F.; SEMINARA, S.; DECRUZ, S.; BOEPPLE, P.; CROWLEY, W. JR. Absence of testosterone (T) negative feedback on FSH in the male. In Program and

Abstract, 81st American Endocrine Society, San Diego: The Endocrine Society Press. Abstract OR 02-1, 1999.

HAYNES, B. P.; DOWSETT, M.; MILLER, W. R.; DIXON, J. M.; BATHNAGAR, A. S. The pharmacology of letrozole. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 87, p. 35-45, 2003.

HESS, R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproduction Biology and Endocrinology**. v. 9, p. 52-64. 2003.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, Inc. Cap.5, p.174-220, 1991.

JUNIEWICZ, P. E.; OESTERLING, J. E.; WALTERS, J. R.; STEELE, R. E.; NISWENDER, G. D.; COFFEY, D. S.; EWING, L. L. Aromatase inhibition in the dog. Effect on serum LH, serum testosterone concentrations, testicular secretion and spermatogenesis. **Journal of Urology**. v.139, p.827-831, 1988.

JUNKER WALKER, U.; NOGUES, V. Changes induced by treatment with aromatase inhibitors in testicular Leydig cells of rats and dogs. **Experimental Toxicology and Pathology**. v.46, p.211-213, 1994.

KOMATSU, T.; TSUBOTA, T.; YAMAMOTO, Y.; ATOJI, Y.; SUZUKI, Y. Seasonal changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testis of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). **Journal of Veterinary Medical Science**. v.59, n.7, p.521-529, 1997.

KONDAREWICZ, A.; KOLASA, A.; ZAWISLAK, B.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; WENDA-RÓZEWICKA, L.; WISZNIEWSKA, B. Testis morphology in rats chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 49, p. 677-684, 2011.

KRETZER, D.M.; LOVELAND, K.L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, M. Spermatogenesis. **Human Reproduction**. v.13, Suppl 1, p.1-8, 1998.

LARDONE, M. C.; CASTILLO, P.; VALDEVENITO, R.; EBENSPERGER, M.; RONCO, A. M.; POMMER, R.; PIOTTANTE, A.; CASTRO, A. P450-aromatase activity and expression in human testicular tissues with severe spermatogenic failure. **International Journal of Andrology**. v.33, p. 650-660, 2010.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. **The American Journal of Anatomy**. v.90, n.2, p.167–215, 1952.

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**, v. 58, p. 919-926, 1998.

LI, M.; SUN, L.; WANG, D. Roles of estrogens in fish sexual plasticity and sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**. 2018.
doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.015

LI, X.; STRAUSS, L.; KAATRASALI, A.; MAYERHOFER, A.; HUHTANIEMI, I.; SANTII, R.; POUTANEN, M. Transgenic mice expressing P450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. **Endocrinology**. v.147, n.3, p.1271-1277, 2006.

LIGUORI, G.; PELAGALLI, A.; ASSISI, L.; SQUILLACIOTI, C.; COSTAGLIOLA, A.; MIRABELLA, N. Effects of orexins on 17 β -estradiol synthesis and P450 aromatase modulation in the testis of alpaca (*Vicugna pacos*). **Animal Reproduction Science**. v.192, p.313-320, 2018.

LISBOA NETO, A. F. S. **Efeito do cruzamento racial sobre as características seminais e biometria escroto-testicular em ovinos submetidos à insulação escrotal**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2015.

LØNNING, P. E. Comparasion between aromatase inhibitors and sequential use. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 86, p. 275-282, 2003.

MAIA, M. S. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. In: VI CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA E VII SEMINÁRIO NORDESTINO DE CAPRINO-OVINOCULTURA. 2015. Dois irmãos (**Anais...**). Recife, 2015.

MARTINS, J.A.M. **Avaliação da biometria testicular, epididimal e das glândulas sexuais acessórias e correlação entre as características biométricas e histológicas em carneiros deslanados sem padrão racial definido (SPRD)**. 2006. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootenia) - Universidade Federal do Ceará.

MASAMURA, S.; ADLERCREUTZ, H.; HARVEY, H.; LIPTON, A.; DEMERS, L. M.; SANTEN, R. J.; SANTNER, S. J. Aromatase inhibitor development for treatment of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.33, p.19-26, 1995.

MASSARI, A.; URBATZKA, R.; CEVASCO, A.; CANESI, L.; LANZA, C.; SCARABELLI, L.; KLOAS, W.; MANDICH, A. Aromatase mRNA expression. In the brain of adult *Xenopus laevis* exposed to Lambro river water and endocrine disrupting compounds. **General and Comparative Endocrinology**. v.168, p.262-268, 2010.

MCLACHLAN, R. I.; WREFORD, N. G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D. M.; ROBERTSON, D. M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**. v.148, n.1, p.1-9, 1996.

MCLACHLAN, R.I. The endocrine control of spermatogenesis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**. vol. 14, n. 3, p. 345-362, 2000.

MENAD, R.; SMAÏ, D.; BONNRY, X.; GERNIGON-SPYCHALOWICZ, T.; MOUDILOU, E.; KHAMMAR, F.; EXBRAYAT, J-M. Seasonal variations of aromatase and estrogen receptors expression in testis of free-ranging sand rats. **Acta Histochemica**. V.119, n.4, p.382-391,2017.

MENG, J.; HOLDCRAFT, R. W.; SHIMA, J. E.; GRISWOLD, M. D.; BRAUN, R. E. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. **Proceedings of the National academy of Sciences**. v.102, p.16696–16700. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506084102>. 2005.

MILLER, W. L. Androgenesis synthesis in adrenarache. **Reviews of Endocrinology Metabolic Disorders**. v.10, n. 1, p. 03-17, 2009.

MURRAY, M.; CANTRILL, E.; FARRELL, G. C. Induction of cytochrome P450 2B1 in rat liver by the aromatase inhibitor aminoglutethimide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.265, p.477-481, 1993.

MURTA, D.; GOMES, V.; MARTINEZ, L. A organização celular dos testículos dos mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.20, n.1, p.1-12, 2013.

NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZÜGE, R.M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.F.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* Bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.822, 828, 2006.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R.A.; JANULIS, L.; NEWTON, S.C.; MILLETTE, C.F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J.M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**. v.132, p.1396-1401, 1993.

NORMAN, W.A.; LITWACK, G. **Hormones**. 2ed. San Diego: Academic Press, 873p. 1997.

NUÑEZ, Q.M. Morfología del tract genital de los pequeños ruminantes. **Revista Científica, FCV - Luz, Falcon**, v.3, n.2, p.77-86, 1993.

NUNEZ, S. B.; BLYE, R. P.; THOMAS, P. M.; REEL, J. R.; BARNES, K. M.; MALLEY, J. D.; CUTLER, G. B. Recovery of reproductive function in rats treated with the aromatase inhibitor fadrazole. **Reproductive Toxicology**. v.10, p.373-377, 1996.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v.22, n.2, p.289-318, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 351-358, 1979.

PATRY, G.; JARVI, K.; GROBER, E. D.; LO, K. C. Use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility. **Fertility and Sterility**. v.92, n.2, p.829.e1-829.e2, 2009.

PILUTIN, A.; MISIAKIEWICZ-HAS, K.; KOLASA, A.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; WISZNIEWSKA, B. The immunoeexpression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta, vanilloid type 1 receptor and cytochrome p450 aromatase in rats testis chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. v.52, n.3, p.206-217, 2014.

PITTMAN, J. A. and BROWN, R. W. Antithyroid and antiadrenocortical activity of aminoglutethimide. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.26, p.1014–1016, 1966.

PLOURDE, P. V.; DYROFF, M.; DUKES, M. D. Arimidex: a potent and selective fourth generation aromatase inhibitor. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.30, p.103-111, 1994.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PRAPORSKI, S.; NQ, S. M.; NQUYEN, A. D.; CORBIN, C. O.; MECHLER, A.; ZHENQ, J.; CONLEY, A. J.; MARTIN, L. L. Organization of cytochrome P450 enzymes involved in sex steroid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**. v.284, n.48, p.33224-33232, 2009.

QUEIROZ, G.C.; CARDOSO, F.M. Avaliação histológica do rendimento da espermatogênese de carneiros deslanados adultos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 13, n.2, p. 99-108, 1989.

RAMAN, J. D.; SCHLEGEL, P. N. Aromatase inhibitors for male infertility. **Journal of Urology**. v.167, p.624-629, 2002.

RAMESH, R.; PEARL, C. A.; AT-TARAS, E.; ROSER, J. F.; BERGER, T. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. **Animal Reproduction Science**. v.102, p.286-299, 2007.

RAVEN, G.; DE JONG, F. H.; KAUFMAN, J. M.; RONDE, W. In men, peripheral estradiol levels directly reflect action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.91, n.9, p.3324-3328, 2006.

REZAEI, A.; VAZIRY, A.; FARSHAD, A.; FARZINPOUR, A.; ROSTAMZADEH, J. Effects of letrozole administration on growth and reproductive performance in Markhoz goat bucklings. **Theriogenology**, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.017>.

RIBEIRO, F.A.Q.; PEREIRA, C.S.B.; CHI, R.J.; YOKOMIZO, P.L.; FREGNANI, J.H.T.G.; ROCHA, R.M. Comparative assessment between objective and subjective

methods in slides stained by immunohistochemistry. **Brazilian Journal of Otolaryngology**. v.79, n.6, p.704-708, 2013.

ROBERTSON, K. M.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E. E.; MEACHEM, S. J.; BOON, W. C.; FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; MCLACHLAN, R. I.; SIMPSON, E. R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National academy of Sciences**. v.99, p.7986-7991, 1999.

RONDE, W.; JONG, F. H. Aromatase inhibitors in men: effects and therapeutic options. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.9, p.1-7, 2011.

RUSSELL, L.D. Role in spermiation. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (eds) **The Sertoli Cell**. Cache River Press, Clearwater, Florida, p.269–304, 1993.

SAAD, E. D.; BROMBERG, S.; KATZ, A.; SIMON, S. D. Inibidores de aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.48, n.4, p.555-567, 2002.

SAID, L.; SAAD, A.; CARREAU, S. Differential expression of mRNA aromatase in ejaculated spermatozoa from infertile men in relation to either asthenozoospermia or teratozoospermia. **Andrologia**. v. 46, p. 136-146. 2014.

SANTEN, R. J. Feedback control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by testosterone and estradiol in men: physiologic and clinical implications. **Clinical Biochemistry**. v.14, n.4, p.243-251, 1981.

SANTEN, R. J.; DEMERS, L. M.; LYNCH, J.; HARVEY, H.; LIPTON, A.; MULAGHA, M.; HANAGAN, J.; GARBER, J. E.; HENDERSON, I. C.; NAVARI, R. M.; MILLER, A. A. Specificity of low dose fadrozole hydrochloride (CGS 16949A) as an aromatase inhibitor. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.73, p.99-106, 1991.

SANTOS, A. C.; VIANA, D. C.; OLIVEIRA, G. B.; LOBO, L. M.; ASSIS-NETO, A. C. Intrauterine sexual differentiation: biosynthesis and action of sexual steroid hormones. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.58, n.3, p.395-405, 2015.

SAYLAM, B.; EFESÖY, O.; ÇAYAN, S. The effect of aromatase inhibitor letrozole on body mass index, serum hormones, and sperm parameters in infertile men. **Fertility and Sterility**. v.95, n.2, p.809-811, 2011.

SCHLATT, S.; EHMCKE, J.; WISTUBA, J. Cell biology and physiology of male reproduction. **Der Urologe. Ausg. A.** v.55, n.7, p.868-876, 2016.

SCHLEGEL, P. N. Aromatase inhibitors for male infertility. **Fertility and Sterility.** v.98, n.6, p.1359-1362, 2012.

SHEN, Z. G.; FAN, Q. X.; YANG, W.; ZHANG, Y. L.; HU, P. P.; XIE, C. X. Effects of non-steroidal aromatase inhibitor letrozole on sex inversion and spermatogenesis in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **The Biologic Bulletin.** v.225, p.18-23, 2013.

SHETTY, G.; KRISHAMURTHY, H.; KRISHNAMURTHY, H.; BHATNAGAR, A.; MOUDGAL, N. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult bonnet monkeys (*M. radiata*). **Steroids.** v.63, p.414-420, 1998.

SHOSHANY, O.; ABHYANKAR, N.; MUFARREH, N.; DANIEL, G.; NIEDERBERGER, C. Outcomes of anastrozole in oligozoospermic hypoandrogenic subfertile men. **Fertility and Sterility.** v.107, n.3, p.589-594, 2017.

SIMPSON, E. R.; MISSO, M.; HEWITT, K. N.; HILL, R. A.; BOON, W. C.; JONES M. E.; KOVACIC, A.; ZHOU, J.; CLYNE, C. D. Estrogens – the good, the bad and the unexpected. **Endocrine Reviews.** v. 26, n.3, p. 322-330. 2005.

SIMPSON, E. R.; CLYNE, E.; RUBIN, G.; BOON, W. C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase – a brief over. **Annual Reviews of Physiology.** v.64, p.93-127, 2002.

SINGH, J.; O'NEILL, C.; HANDELSMAN, D. J. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. **Endocrinology.** v.136, p.5311–5321, 1995.

SIPAHUTAR, H.; SOURDAINE, P.; MOUSLEMI, S.; PLAINFOSSÉ, B.; SÉRALINI, G.E. Immunolocalization of aromatase in stallion leydig cells and seminiferous tubules. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** v.51, n.3, p.311-318, 2003.

SMITH, L.B.; WALKER, W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** v.30, p.2-13, 2014.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. **Processos reprodutivos dos machos**. Dukes - Fisiologia dos animais domésticos. Cap 35, pág. 603-614, Rio de Janeiro, 1996.

STEIN, T. A.; BALL, B. A.; CONLEY, A. J.; BHATNAGAR, A. S.; ROSER, J. F. The effects of na aromatase inhibitor (letrozole) on hormone and sperm production in stallion. **Theriogenology**. v.58, p.381-383, 2002.

STEGER, K.; WROBEL, K-H. Postnatal developmentof ovine seminiferous tubules. na electron microscopical and morphometric study. **Anal of Anatomy**, v.178, p.201-213, 1996.

SURESH, B.; LEE, J.; HONG, S.H.; KIM, K.S.; RAMAKRISHNA, S. The role of deubiquitination enzymes in spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Science**. v.72, n.24, p.4711-4720, 2015.

TILBROOK, A. J.; CAMERON, A. W. N. The contribution of the behaviour of rams to succesful mating of ewes under field conditions. In: OLDHAM, C. M.; MARTIN, G. B.; PURVIS, I. W. **Reproductive physiology of merino sheep: concepts and consequences**. Perth: The university of Western Australia. p.143-160, 1990.

TIWARI, A.; SINGH, D.; KUMAR, O. S.; SHARMA, M. K. Expression of cytochrome P450 aromatase transcript in buffalo (*Bubalus bubalis*) - ejaculated spermatozoa and its relationship with sperm motility. **Domestic Animal Endocrinology**. v.34, p.238-249, 2008.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ed. Barueri: Manole, 2003. 331 p.

TRUNET, P. F.; MUELLER, P.; BHATNAGAR, A. S.; DICKES, I.; MONNET, G.; WHITE, G. Open dose-finding study of a new potente and selective nonsteroidal aromatase inhibitor, CGS 20 267, in healthy male subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.77, p.319-323, 1993.

TSAI-MORRIS, C-H.; AQUILANO, D. R.; DUFAU, M. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. **Endocrinology**. v.116, p.38-46, 1985.

TSUTSUI, K.; UKENA, K.; USUI, M.; SAKAMOTO, H.; TAKASE, M. novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. **Neuroscience Research**. v.36, n.4, p.261-273, 2000.

TURNER, K. S.; MORLEY, M.; ATANASSOVA, N.; SWANSTON, I. D. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. **Journal of endocrinology**. V. 164, p.225-238, 2000.

VELDHUIS, J.; IRANMANESH, A. Short-term aromatase-enzyme blockade unmasks impaired feedback adaptations in luteinizing hormone and testosterone secretion in older men. **Journal of Endocrinology and Metabolism**. v.90, n.1, p.211-218, 2005.

VENZKE, W.G. Endocrinologia Geral. In: GUETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, vol 1, cap.10, p.140, 1986.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 11, p. 1-9, 2008.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. Environmental Physiology of Animals. **Blackwell Publishing** <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>. 2005.

WINTER, M.; FALVO, R. E.; SCHANBACHEM, B. D.; VERHOLTZ, S. Regulation of gonadotropin secretion in the male dog: role of estradiol. **Journal of Andrology**. v.4, n.5, p.319-323, 1983.

WROBEL, K.H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, Berlin, v. 177, p. 19-32, 1995.

YANG, J. H.; MENSHENINA, J.; CUNHA, G. R.; PLACE, N.; BASKIN, L. S. Morphology of mouse external genitalia: implication for a role of estrogen in sexual dimorphism of the mouse genital tubercle. **The Journal of Urology**. v.184, p.1604-1609, 2010.

ZAIDI, P.; KAMAL, S. Raciloimmunoassay: principles and techniques. **Journal of the Pakistan Medical Association**. v.43, n.12, p.264-267, 1993.

ZAMARATSKAIA, G.; BERGER, T. Skatole metabolism in the pigs with reduced testicular oestrogen synthesis. **Reproduction in Domestic Animals**. v.49, p.302-305, 2014.

1 **Gene expression and immunolocalization of the P450 aromatase enzyme**
2 **in sheep testes treated with an aromatase inhibitor**

3
4
5 **Abstract**

6
7 Positive immunolocalization and expression of the P450 aromatase enzyme
8 (P450arom) in testes is an indicator of local estradiol synthesis. The objective of the
9 present study was to evaluate the effect of a non-steroid aromatase inhibitor (letrozole)
10 on adult sheep testes. Twelve animals were randomly divided into four groups: G1: 30-
11 day control, G2: 60-day control, G3: 30-day treatment, and G4: 60-day treatment. Daily
12 doses were administered orally at a 0.5 mg/kg ratio; control groups were administered
13 a placebo. Testicle samples were processed for immunohistochemistry assays and
14 subjected to RNA extraction for real-time PCR. Results showed that
15 immunolocalization of P450arom in letrozole-treated animal testes was stronger in
16 Leydig cells and germ cells (spermatocytes). The expression of the CYP19 gene were
17 altered after 30 days of treatment; however, relative levels of aromatase expression
18 decreased after 60 days. It was concluded that the treatment with the aromatase
19 inhibitor did not alter the seminiferous epithelium and interstitial cells; aromatase
20 immunolocalization was positive in Leydig cells while gene expression levels remained
21 within the normal range, suggesting that at the dosage used in the present study, 0.5
22 mg/kg administered orally, can stimulate testicular function and contribute to improving
23 sperm production in sheep reared under intensive management conditions in
24 Northeast Brazil.

25
26 **Keywords:** CYP19, estradiol, immunohistochemistry, real-time PCR.

27
28 **1 INTRODUCTION**

29
30 P450 cytochrome aromatase (P450arom) is an enzyme complex present in the
31 endoplasmic reticulum of ovarian, testicular, brain, and placental cells, where it is
32 responsible for the conversion of testosterone to estrogens, an essential step in
33 reproductive development and fertility [1,2]. In testes, testosterone was considered for
34 many years as the sole steroid hormone responsible for the spermatogenic process.
35 However, it has been shown that estrogens play an important role in this process [3,4].

1 Positive P450arom immunostaining in mammalian testes has been described in
2 domestic species, with variations between Leydig cells and germ cells, such as
3 spermatocytes and spermatids [5–7]. Positive immunoreactivity to P450arom in Leydig
4 cells of adult sheep testes cultured *in vitro* was ascribed to both testosterone and
5 estrogen synthesis sites. Nonetheless, immunoreactivity was negative in Leydig cells
6 of sexually immature animals [8].

7 Aromatase inhibitors have been employed to assess the effects of estradiol in
8 advanced breast cancer [9]. They were primarily developed as a proven effective
9 strategy to reduce serum estrogen levels in post-menopausal women. They prevent
10 the aromatization of androgens into estrogens, specifically the conversion of
11 testosterone and androstenedione to estradiol and estrone, respectively [10].

12 Prolonged treatment with an aromatase inhibitor pointed towards a direct
13 influence of estrogens on the morphology of seminiferous tubules and interstitial tissue
14 in mice [11]. Likewise, high concentrations of estrogens induced morphological and
15 functional abnormalities in letrozole-treated rat testes; letrozole is a potent, reversible,
16 competitive inhibitor of aromatase [12]. Estradiol promoted Leydig cell hypertrophy and
17 hyperplasia, and increased inflammatory cell numbers in transgenic mice expressing
18 high levels of aromatase [13]. Studies of this nature are important to explain the
19 mechanisms behind chronic testicular inflammation (orchitis) and infertility in species.
20 The conversion of testosterone to estradiol in sheep Leydig cells cultured *in vitro* was
21 significantly suppressed in a dose-dependent manner in the presence of an aromatase
22 inhibitor [8]. However, studies evaluating an aromatase inhibitor for a prolonged period
23 and the effects on ovine reproductive performance under *in vivo* conditions cannot be
24 found in the literature.

25 The aim of the present study was to evaluate the effect of a non-steroid
26 aromatase inhibitor (letrozole) on the immunolocalization and gene expression of
27 P450arom in adult sheep testes, reared under intensive management conditions in
28 Northeast Brazil.

29

30 **2 MATERIAL AND METHODS**

31

32 **2.1 Animals, treatments, and experimental groups**

33 The research was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals
34 (CEUA/FMVZ) -USP under protocol No. 7512260617.

1 Twelve adult Dorper rams aged between 12 and 14 months were used; the
2 animals were reared in a confinement system, located in the State of Piauí at a latitude
3 of 4° 30' 57"S and a longitude of 42° 37' 30"W, and were randomly divided into four
4 groups: G1: 30-day control, G2: 60-day control, G3: 30-day treatment; and G4: 60-day
5 treatment. The animals in the control groups were administered a placebo orally during
6 the period of the experiment, while the animals in the 30- and 60-day treatment groups
7 were orally administered 0.5 mg/kg letrozole daily during the respective periods. At the
8 end of each period, the groups had their testicles removed and fixed in Bouin's solution.

9 **2.2 Immunohistochemistry**

10 The samples were washed 20 times in a 70% alcohol solution and subjected to
11 the dehydration procedure in increasing series of alcohol concentrations from 70% to
12 100%, followed by two washes in Xylol. Samples were subsequently included and
13 embedded in paraffin. 5µm cuts were obtained using a Leica RM 2155 microtome,
14 which were then deparaffinized in an oven operating at 70 °C for 30 minutes, followed
15 by two immersions in xylol for 10 minutes, rehydrated in decreasing alcohol
16 concentrations of 100%, 90% and 70% (5 minutes incubation time each). The slides
17 were washed in distilled water for 5 minutes, added to citrate buffer, and heated in an
18 electric pressure cooker for 5 minutes. After cooling at room temperature for 20
19 minutes, the cuts were washed twice in PBS for 5 minutes, followed by the blocking of
20 endogenous peroxidase using Peroxidase Block for 30 minutes. Slides were washed
21 with PBS for 5 minutes and the protein block was done using Protein Block for 30
22 minutes. Incubation was performed with a primary anti-aromatase antibody or PBS (for
23 the treatment or control groups, respectively) in a humid chamber for 16 hours (1:200).
24 The slides were washed with PBS for 5 minutes and incubated with secondary antibody
25 for 30 minutes. Samples were washed in PBS for 5 minutes and incubated in a DAB
26 chromogen. The slides were washed in distilled water and stained with hematoxylin,
27 washed in running water for 10 minutes, dehydrated in increasing alcohol
28 concentrations (70%, 90%, 100%, 100%; 5 minutes each), diaphanized in xylol I and
29 xylol II (5 minutes each), followed by coverslip assembly. The intensity of the
30 immunostaining was evaluated through a subjective method by observation in an
31 optical microscope (RIBEIRO et al., 2013). Samples were photodocumented using an
32 Olympus® BX61VS microscope.

33

34

1 2.3 Real-time PCR

2 Sheep testicle samples were fixed in RNA *Later* (Invitrogen) solution for 12
 3 hours and frozen at -80 °C for further processing. The samples were homogenized
 4 with the aid of L-Beader cell disruptor 6 (Loccus), and the total RNA extracted with
 5 *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen). The RNA samples were quantified in a Biodrop μ LITE.
 6 1 μ g of RNA was purified with *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen), and
 7 retrotranscription was performed using *SuperScript III* (Invitrogen). All procedures
 8 followed the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was
 9 performed using *Select SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) and *Step One*
 10 *Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) by the Standard Curve method with
 11 four dilutions in optical 96-well plates. Each sample was prepared in triplicate, together
 12 with the endogenous controls. GAPDH was used as an endogenous control. The
 13 cytochrome P450 aromatase-specific *primers* specific to the (Cyp19) enzyme and
 14 endogenous control genes are shown in table 1.

15 **Table 1.** *Primers* used for qRT-PCR, and their respective sequences.

| Gene | Primer sequences | GenBank accession number |
|--------------|------------------------------------|--------------------------|
| CYP19 | Fw 5' – CCCAGGTTGAAGAGGCAAT – 3' | 001123000.1 |
| | Rv 5' – CTGGTACCGCATGCTCTCAT – 3' | |
| GAPDH | Fw 5' – TGAGGACCAGGTTGTCTCCT – 3' | 001190390.1 |
| | Rv 5' – AAGTGGTCTGTTGAGGGCAAT – 3' | |

16 Source: (LISBOA NETO, 2020)

17 2.4 Statistical analysis

18 The relative aromatase expression data were submitted to the Mann-Whitney
 19 non-parametric U test. A significant difference was attributed when the P-value < 0.05.
 20 Statistical analyses were performed using the *GraphPad Prism v. 8.2.1* software.

21 3 RESULTS

22 3.1 P450 aromatase enzyme immunolocalization

23 Aromatase was immunolocalized in Leydig cells and primary spermatocytes,
 24 but not in Sertoli cells, myoid cells, sperm or spermatids in control group animals. All
 25 positive immunoreactivity observed in the present study occurred in the cytoplasm, and
 26 specifically in the endoplasmic reticulum area.

27 In the 30-day treatment group, immunostaining was observed in Leydig cells,
 28 spermatocytes and spermatids. Immunostaining was not observed in Sertoli cells,
 29 myoid cells, and sperm cells. Staining intensity differed among germ cells: stronger in

1 spermatocytes, weaker (but present) in sperm cells. Immunostaining was also poor in
2 Leydig cells.

3 After 60 days of daily treatment with letrozole, immunostaining for P450arom
4 was identified only in Leydig cells, sperm, and spermatocytes. The staining intensity
5 was stronger in spermatocytes and weaker in spermatogonia and Leydig cells.
6 Immunostaining was not observed in Sertoli cells, myoid cells, or spermatids.

7 The intertubular constituents also showed no changes, as demonstrated by the
8 integrity of Leydig cell morphology in both control and treated groups.

9

10 Table 2. Immunolocalization of the P450 aromatase enzyme in the testicles of control, 30-day letrozole
11 treatment, and 60-day letrozole treatment groups animals.

| Cytochrome P450 aromatase | Control | 30 days | 60 days |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Leydig cells | +++ | +++ | + |
| Sertoli cells | --- | --- | --- |
| Myoid cells | --- | --- | --- |
| Spermatogonia | --- | --- | + |
| Spermatocyte | +++ | +++ | +++ |
| Spermatids | ---- | + | --- |

12 Source: (LISBOA NETO, 2020)

13

14 **3.2 Relative gene expression of P450 aromatase (CYP19)**

15

16 The relative expression of the CYP19 gene was detected in the testicles of
17 sheep in all groups (control, 30-day treatment, and 60-day treatment); the level of
18 expression between these groups was not significantly different ($P=0.99 > 0.05$ (figure
19 2A).

20 Animals administered with letrozole for 30 consecutive days showed increased
21 levels of relative aromatase expression, but not statistically significant when compared
22 to the 30-day control group ($P = 0.7930 > 0.05$ (Figure 2C).

23 At 60 days of treatment with letrozole, the animals showed a decrease in relative
24 CYP19 expression levels when compared to the 30-day treatment; however, the
25 decrease was not statistically significant ($P=0.7930 > 0.05$) (Figure 2B).

26 The relative levels of gene expression in the 60-day group were also compared
27 with the 60-day control group; no significant difference was found ($P=0.2889 > 0.05$)
28 (Figure 2D).

29

30

31

1 4 DISCUSSION

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

This is the first study addressing P450arom gene expression and immunolocalization in the testes of sheep orally treated with letrozole. Studies carried out on rats, swine, equines, ovine, bears and humans showed that the P450arom immunolocalization sites occur in Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells [1,2,8,12,14,15]. Immunostaining was observed throughout the cytoplasm in these cells.

According to [16], aromatase is located in the endoplasmic reticulum of several cell types. Our research shows specific immunostaining in the cytoplasm of germ cells, being possible to distinguish the type of immunostaining, which in Leydig cells was observed in all the cytoplasm and in the germ cells, particularly spermatids and primary spermatocytes. This immunostaining appeared as a single round granule in the cytoplasm, corroborating the information in [17]. The data demonstrate the high specificity and quality of the immunohistochemistry technique used in the present study.

In the control group animals, aromatase was immunolocalized in Leydig cells and spermatocytes. The former are mainly responsible for androgen synthesis; nonetheless, conversion of androgens to estrogens also occurs in germ cells [7].

This research was carried out in sexually active sheep. Sexual maturity is a predominant aromatase immunolocalization factor, being absent in Sertoli cells and present in Leydig cells of adult animals [8,18]. Thus, our results corroborate the existing literature that reports germ cells as also being estrogen synthesis sites in ovine [8]. In the real-time PCR analysis, it was possible to identify the expression of the CYP19 gene in sheep testes, which indicates that in these animals the expression of the gene encoding the enzyme responsible for the biosynthesis of estrogens occurs also in male gonads. The expression and immunolocalization of P450arom has also been reported in other species, such as rats [19,20], equines [5,21], and swine [22].

Spermatids showed immunoreactivity to a 30-day oral treatment with letrozole, which may demonstrate that the activation of new P450arom immunolocalization sites in sheep has been induced. According to [12], immunoreactivity can be detected in spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells in letrozole-treated animals. In the animals of the present study, Sertoli cells did not show immunoreactivity for P450arom; however, treatment with letrozole for 30 consecutive days may be

1 stimulating more germ cells to synthesize estrogens. This information shows that the
2 daily oral intake of letrozole induces P450arom immunolocalization changes in sheep
3 testes.

4 Regarding the CYP19 gene, the 30-consecutive day letrozole treatment induced
5 an increase in the relative gene expression levels in the treatment group compared to
6 its control. Daily administrations of the aromatase inhibitor caused an increase in
7 mRNA and protein expression levels in testes. Both changes can be ascribed to an
8 increase in the concentration of gonadotropins as a response to the decrease in
9 plasma estradiol concentrations [23] however, the differences found in this study were
10 not statistically significant, which can be attributed to the size of the sample analyzed.
11 Therefore, this research is a starting point for future studies, opening up possibilities
12 to carry out aromatase inhibitor treatments to evaluate the effects of long-term
13 treatments, since the oral treatment with 0.5 mg/kg letrozole for 30 consecutive days
14 increased gene expression levels in sheep testicles, even if not statistically significant.

15 Germ cells were the main P450arom immunoreactivity sites in the testicles of
16 letrozole-treated sheep for 60 consecutive days. Leydig cells showed weak
17 immunostaining, unlike the other groups. The treatment with the aromatase inhibitor
18 changed the immunoreactivity sites, now being positive in spermatogonia,
19 spermatocytes and Leydig cells, although immunostaining was weak in the latter. [12]
20 state that it is possible to detect immunostaining in the cytoplasm of Leydig cells from
21 testicles of animals chronically treated with letrozole – but that the intensity of
22 aromatase immunoreactivity may be lower in treated animals. This information
23 corroborates the results found in the present study and shows that, despite the
24 alteration in immunoreactivity in Leydig cells and germ cells upon the letrozole
25 treatment, it is still identifiable in treated animals.

26 Studies by [24–26], comparing different aromatase inhibitors demonstrated that
27 letrozole is the most potent, acting selectively and preventing the synthesis of
28 intracellular estrogen, reducing its levels by up to 99%. Letrozole's function consists of
29 inhibiting estrogen synthesis by selectively blocking P450arom without affecting other
30 steroidogenic pathways, and can significantly reduce these hormonal levels [26].

31 In the 60-day letrozole treatment group, expression levels of the CYP19 gene
32 also did not show statistical differences when compared to the control group, which
33 indicates that the effect of chronic treatment with the aromatase inhibitor modifies
34 P450arom gene expression levels; nonetheless, different treatments throughout longer

1 periods of time will be necessary to define to what extent the CYP19 gene expression
2 levels may or may not interfere with sperm production, seminal quality, or quantity of
3 sperm produced. Histological analyses of the seminiferous tubules showed no
4 alterations in the seminiferous epithelium. The intertubular constituents also showed
5 no changes as demonstrated by the integrity of Leydig cell morphology in both control
6 and treated groups.

7

8 **5 CONCLUSION**

9

10 The results allow concluding that an oral treatment with 0.5 mg/kg of non-
11 steroidal aromatase inhibitor (letrozole) induces changes in the expression of the
12 CYP19 gene and keeps aromatase immunolocalization sites active in testes of adult
13 sheep.

14

15

16

17 **REFERENCES**

18

19

- 20 [1] Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, et al.
21 Estrogens and male reproduction: A new concept. *Brazilian J Med Biol Res*
22 2007;40:761–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000600003>.
- 23 [2] Conley A. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2004;121:685–95.
24 <https://doi.org/10.1530/reprod/121.5.685>.
- 25 [3] Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc B*
26 *Biol Sci* 2010;365:1517–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0235>.
- 27 [4] Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone
28 involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci* 2012;57:31–6.
29 <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0005-y>.
- 30 [5] Almadhidi J, Seralini GE, Fresnel J, Silberzahn P, Gaillard JL.
31 Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine
32 gonads. *J Histochem Cytochem* 1995;43:571–7.
33 <https://doi.org/10.1177/43.6.7769228>.
- 34 [6] JANULIS L, BAHR JM, HESS REXA, JANSSEN S, OSAWA Y, BUNICK D. Rat
35 Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain Active P450 Aromatase.
36 *J Androl* 1998;19:65–71. <https://doi.org/doi:10.1002/j.1939-4640.1998.tb02471.x>.
- 37 [7] Bilińska B, Schmalz-Frączek B, Sadowska J, Carreau S. Localization of
38 cytochrome P450, aromatase and estrogen receptors α and β in testicular cells
39 - An immunohistochemical study of the bank vole. *Acta Histochem*
40 2000;102:167–81. [https://doi.org/10.1078/S0065-1281\(04\)70026-4](https://doi.org/10.1078/S0065-1281(04)70026-4).
- 41 [8] Bilinska B, Lesniak M, Schmalz B. Are ovine Leydig cells able to aromatize
42 androgens? *Reprod Fertl Dev* 1997;9:193–9. <https://doi.org/10.1071/r96038>.
- 43 [9] Bertelli G. Sequencing of aromatase inhibitors. *Br J Cancer* 2005;93:S6–9.
44 <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602689>.
- 45

- 1 [10] Saad ED, Bromberg S, Katz A, Simon SD. Inibidores de aromatase no câncer
2 de mama: da doença metástica ao tratamento adjuvante. *Rev Bras Cancerol*
3 2002;48:555–67.
- 4 [11] Kondarewicz A, Kolasa A, Zawiślak B, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M,
5 Wenda-Rózewicka L, et al. Testis morphology in rats chronically treated with
6 letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49:677–84.
7 <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0091>.
- 8 [12] Pilutin A, Misiakiewicz-Has K, Kolasa A, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz
9 M, Wiszniewska B. The immunoexpression of androgen receptor, estrogen
10 receptors α and β , vanilloid type 1 receptor and cytochrome p450 aromatase in
11 rats testis chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia*
12 *Histochem Cytobiol* 2014;52:206–17. <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0024>.
- 13 [13] Li X, Strauss L, Kaatrasalo A, Mayerhofer A, Huhtaniemi I, Santti R, et al.
14 Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility
15 associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology*
16 2006;147:1271–7. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0654>.
- 17 [14] Sipahutar H, Sourdain P, Moslemi S, Plainfossé B, Séralini GE.
18 Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous
19 tubules. *J Histochem Cytochem* 2003;51:311–8.
20 <https://doi.org/10.1177/002215540305100306>.
- 21 [15] Komatsu T, Tsubota T, Yamamoto Y, Atoji Y, Suzuki Y. Seasonal Changes in
22 the Immunolocalization of Steroidogenic Enzymes in the Testes of the
23 Japanese Black Bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J Vet Med Sci*
24 1997;59:521–9. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.521>.
- 25 [16] Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B,
26 et al. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*
27 2001;79:203–8. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00137-6).
- 28 [17] Liguori G, Pelagalli A, Assisi L, Squillacioti C, Costagliola A, Mirabella N.
29 Effects of orexins on 17β -estradiol synthesis and P450 aromatase modulation
30 in the testis of alpaca (*Vicugna pacos*). *Anim Reprod Sci* 2018;192:313–20.
31 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.032>.
- 32 [18] Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FRMB, Bouraima-Lelong H, Delalande C.
33 Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci* 2011;89:584–7.
34 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.004>.
- 35 [19] Levallet J, Bilinska B, Mitre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression
36 and Immunolocalization of Functional Cytochrome P450 Aromatase in Mature
37 Rat Testicular Cells¹. *Biol Reprod* 1998;58:919–26.
38 <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.919>.
- 39 [20] Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, et al. Germ
40 cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*
41 1993;132:1396–401. <https://doi.org/10.1210/endo.132.3.8440194>.
- 42 [21] Almeida J, Conley AJ, Mathewson L, Ball BA. Expression of steroidogenic
43 enzymes during equine testicular development. *Reproduction* 2011;141:841–8.
44 <https://doi.org/10.1530/REP-10-0499>.
- 45 [22] Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM, Liu Z, Simpson ER, Ford JJ, et al.
46 Functional Aromatase Expression in Porcine Adrenal Gland and Testis¹. *Biol*
47 *Reprod* 1996;54:497–505. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.2.497>.
- 48 [23] Harada N, Honda SI, Hatano O. Aromatase inhibitors and enzyme stability.
49 *Endocr Relat Cancer* 1999;6:211–8. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0060211>.
- 50 [24] Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The

- 1 pharmacology of letrozole. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87:35–45.
2 [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00384-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00384-4).
- 3 [25] Lonning PE. Comparison between aromatase inhibitors and sequential use. *J*
4 *Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86:275–82. <https://doi.org/10.1016/s0960->
5 [0760\(03\)00367-4](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00367-4).
- 6 [26] Bhatnagar AS. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast*
7 *Cancer Res Treat* 2007;105:7–17. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9438-y>.
8