

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA

**Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α
relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**

Karen Friedrich

Rio de Janeiro
2003

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA

**Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α
relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**

Karen Friedrich

Dissertação Apresentada à Escola Nacional de
Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz para
Obtenção do Grau de Mestre em Saúde Pública –
Área de Concentração em Toxicologia.

Rio de Janeiro
2003

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA

**Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α
relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**

Karen Friedrich

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado
Co-Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em 23 de Junho de 2003 pela banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. _____
Cláudia Vitória de Moura Gallo

Prof.^a. Dr.^a. _____
Cláudia Serpa

Prof. Dr. _____
Isabella Fernandes Delgado

Prof. Dr. _____
Israel Felzenszwalb

Prof. Dr. _____
Sérgio Koifman

Rio de Janeiro
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Friedrich, Karen

Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley / Karen Friedrich – 2003

xxii, 100p.;

Orientadores: Isabella Fernandes Delgado e Francisco J.R. Paumgarten

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública.

1. Receptor de estrogênio alfa. 2. Western blot. I. Isabella Fernandes Delgado. II.

Fundação Oswaldo Cruz III. Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley.

Aos meus pais que sempre serão os
únicos responsáveis por todas as
minhas conquistas.

Ao Leandro pela presença
incondicional e constante durante
essa etapa da minha vida.

This work was supervised and supported by Prof. Dr. Ibrahim Chahoud. The practical procedures were performed in the Department of Toxicology, Institut of Clinical Pharmacology and Toxicology, *Freie Universität*, Berlin, Germany, as an official agreement between this institution and the Laboratory of Environmental Toxicology, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto e Vera, pelo incentivo durante toda a minha vida acadêmica, por todo o suporte espiritual, emocional e financeiro. E, não menos importante, pelo modelo de competência, dedicação ao trabalho e à família, e pelo exemplo de amor e respeito à natureza e aos seres que os cercam. Enfim, aos inúmeros fatores, mencionados ou não acima, que foram de importância crucial na minha formação profissional.

Ao Leandro, pelo apoio, paciência e compreensão dispensados durante todo esse período, e principalmente, pelo que não se consegue dizer em palavras. E ainda pela digitação atenciosa das referências bibliográficas.

Ao Kiko pelas explicações imprescindíveis de alguns programas usados na confecção desta dissertação. Obrigado ainda pela cumplicidade, alegria, admiração e humildade que o tornam um irmão especial.

A Isabella Fernandes Delgado pelo exemplo de competência profissional. Obrigado principalmente pela amizade, apoio e torcida na minha ida a Berlim e pelo carinho quase maternal durante toda a nossa convivência.

Ao Prof. Francisco Paumgarten por todas as oportunidades e incontáveis ensinamentos indispensáveis na minha formação científica.

A minha amiga Márcia por ter sido uma das pessoas mais presentes durante esses dois anos: através das disciplinas que fizemos, dos interurbanos, das aventuras de viagens, da visita a Berlim e de todas as lágrimas. Obrigado pela ajuda durante a fase de formatação da dissertação e pelas explicações sobre os programas de estatística e de *Power Point*. E ainda pelo grande exemplo de competência, responsabilidade e dedicação à carreira científica.

Aos gatinhos Elvis e Carlitas pelos afagos e muitas vezes únicas companhias nos momentos de estresse e também grandes parceiros de computador, papéis e cadernos.

Ao Sérgio e Cristina pela amizade e por toda a ajuda imprescindível durante minha estada em Berlim e sem os quais, meu retorno ao Brasil teria sido muito difícil.

A Tininha que representou vários papéis durante esse tempo: irmã, amiga, companheira, tradutora, ouvinte, falante, quebra-muitos-galhos, companheira de natação, de 'Biergarten', de museus, filmes de terror etc etc etc. Você foi muito especial e uma amiga que jamais imaginava encontrar.

A todos os amigos do Brasil que me enviaram cartas, cartões, emails e que dessa maneira estiveram ao meu lado durante esse tempo: Júnia, Érika Brito, Katita, Fátima, Pepita, Bárbara, Flávia, Rose, Vanilda, Cláudio e Andréa.

E ainda aos amigos que fiz em Berlim, principalmente Tomas Helge pelas inúmeras ajudas.

A todos os funcionários da Secretaria Acadêmica da ENSP, por toda a ajuda e informações dispensadas sempre com simpatia e competência durante esse tempo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que essa dissertação se realizasse.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Prof. Ibrahim Chahoud for the supervision and financial support.

To Dr. Gilbert Schönfelder for teaching me about Western Blot.

To Chris Talsness for the ideas, support and friendship.

To Konnie, Beate, Britta Selzam, Brigitte, Olaf, Ulla and Omar for the constant help, joyness and friendship.

All of you made me feel at home in Berlin.

Vielen Danke!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do colesterol (Fonte: Nelson & Cox, 2000)

Figura 2 – Biossíntese de estrógenos (modificado de Katsung, 1998 e Gruber *et al*, 2002).

Figura 3 – Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos.

Figura 4 – Domínios funcionais da superfamília de receptores intracelulares (modificado de Alberts *et al*, 1994).

Figura 5 – Estrutura dos componentes da superfamília de receptores nucleares (modificado de Alberts *et al*, 1994).

Figura 6 – Domínios funcionais dos receptores de estrogênio.

Figura 7 – Cronologia dos principais eventos que promovem a maturação sexual de ratas desde o período fetal até a puberdade.

Figura 8 – Localização do hipotálamo e da glândula pituitária (modificado: Nelson & Cox, 2000).

Figura 9 – Eixo hipotalâmico-pituitário (modificado: Nelson & Cox, 2000).

Figura 10 – Disposição da membrana e do gel durante a transferência.

Figura 11 – Média e desvio-padrão do peso corpóreo (g) de fêmeas sacrificadas em três momentos diferentes do desenvolvimento pós-natal: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da abertura da vagina (VA), e com a mesma idade do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

Figura 12 – Média e desvio-padrão do peso absoluto (mg) do útero, vagina e ovários de fêmeas sacrificadas em três momentos diferentes do desenvolvimento pós-natal: aos 21

dias de vida (21 DPN), no dia de abertura da vagina (VA), com a mesma idade do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

Figura 13 – Bandas imunorreativas ao RE α obtidas de *pools* de ovários de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal: 21 DPN, VF e VA.

Figura 14 – Valores individuais de ovários de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de *immunoblots*.

Figura 15 – Bandas imunorreativas ao RE α obtidas de úteros de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: 21 DPN, VF e VA.

Figura 16 – Valores individuais de úteros de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de *immunoblots*.

Figura 17 – Bandas imunorreativas ao RE α mostradas pelas vaginas de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: 21 DPN, VF e VA.

Figura 18 – Valores individuais de vaginas de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de *immunoblots*.

Figura 19 – Papel da leptina e do neuropeptídeo Y na puberdade.

Figura 20 – Variantes do RE α (modificado de Friend *et al*, 1997).

Figura 21 – Níveis de estradiol sérico em ratas Sprague-Dawley (n=20) (modificado de Noda *et al*, 2002).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Afinidade relativa (17 β -estradiol = 100%) de diferentes xenoestrógenos (ligantes) pelos REs α e β .

Tabela 2 – Peso corpóreo (g) das ratas sacrificadas aos 21 DPN, no dia da abertura da vagina (VA) e das fêmeas ainda com a vagina fechada (VF) pareadas quanto à idade com fêmeas do grupo VA.

Tabela 3 – Pesos absolutos e relativos dos ovários direito e esquerdo de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

Tabela 4 – Pesos absolutos e relativos dos úteros de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

Tabela 5 – Pesos absolutos e relativos das vaginas de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

Tabela 6 – Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, em *pools* de três ovários de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

Tabela 7 – Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, obtidos de úteros de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

Tabela 8 – Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, obtidos de vaginas de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

Tabela 9 – Diferenças da expressão do RE α em ovários, útero e vagina em três diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

Tabela 10 - Expressão das variantes do RE α em *immunoblots* de diferentes tecidos.

Tabela 11 – Substâncias consideradas como xenoestrógenos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP – α -fetoproteína

ANOVA – análise de variância (*analysis of variance*)

AV – abertura de vagina

BCA – *bicinchoninic acid*

BSA – albumina sérica bovina

CYP450- citocromo P450

DDL – Domínio de ligação ao DNA

DE – desregulador endócrino

DES – dietilestilbestrol

DLL – Domínio de ligação do ligante

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP - desvio padrão

DPN – dia de vida pós-natal

e.g. – por exemplo (*exempli gratia*)

EDSTAC – *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*

ERE – elemento de resposta a estrógeno

ERKO – *estrogen receptor knockout*

et al - e colaboradores (*et alii*)

FA1 - função de ativação ligante-independente

FA2 - função de ativação ligante-dependente

FSH – hormônio folículo estimulante

g – grama

GABA – ácido γ -aminobutírico

GnRH - hormônio de liberação das gonadotropinas

HSP – proteína de choque térmico (*heat shock protein*)

i.e. - isto é (*id est*)

IGF – fator de crescimento semelhante a insulina

IgG – imunoglobulina G

kD – kilo Dalton

kg – quilograma

LH – hormônio luteinizante

LHRH - hormônio de liberação luteinizante
MAPK – proteína quinase mitógeno ativada (*mitogen activated protein kinase*)
mg - miligrama
mL - mililitro
mm – milímetros
mM- milimolar
NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido
ND – não determinado
nm – nanômetros
NPY – neuropeptídeo Y
p/v - peso/volume
per se – por si só
PM – peso molecular
PN- pós-natal
Q – quartil
qsp - quantidade suficiente para
RE-E – Complexo receptor de estrogênio e estrógeno
RE – receptor de estrogênio
RE α – receptor de estrogênio subtipo α
RE β – receptor de estrogênio subtipo β
RE γ – receptor de estrogênio subtipo γ
REh – receptor de estrogênio subtipo α humano
RNA m - ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR – reação de polimerase em cadeia (transcriptase reversa)
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS/PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SNC – sistema nervoso central
TBS - solução tampão de tris
TERP-1 – *truncated estrogen receptor protein*
TGF – fator transformador de crescimento
TTBS - solução tampão de tris/Tween
UDO - unidade (arbitrária) de densidade óptica

US EPA – Agência de proteção ambiental americana (*United States Environmental Protection Agency*)

v/v - volume/volume

VA – vagina aberta

VF – vagina fechada

µg - microgramas

µL - microlitros

µM - micromolar

RESUMO

O receptor de estrogênio α (RE α) regula a diferenciação celular e a proliferação do epitélio de tecidos-alvo do sistema reprodutivo feminino. Pouco se sabe, entretanto, sobre a expressão de RE α durante o desenvolvimento pré-puberdade. O objetivo do presente estudo foi investigar as mudanças na expressão do RE α em alguns tecidos responsivos a estrógenos, tais como ovário, útero e vagina, durante a abertura de vagina, um evento crítico que marca o início da puberdade em ratas. A expressão de RE α foi avaliada em grupos de ratas Sprague-Dawley sacrificados por decapitação no dia 21 pós-natal (21 DPN) e no dia de abertura de vagina (VA). A expressão de RE α também foi avaliada em um terceiro grupo de ratas com vagina fechada (VF) pareados com animais do grupo VA por idade e, sempre que possível, por ninhada de origem. Imediatamente após o sacrifício os órgãos-alvo (ovários, útero e vagina) foram removidos e armazenados à -80°C até o uso. Os órgãos foram pesados ainda congelados, descongelados e homogeneizados (útero e vagina, individualmente, e *pool* de três ovários do mesmo grupo) antes das análises de SDS-PAGE e Western Blot. As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal contra RE α de camundongo (1:200) e posteriormente com anticorpo IgG secundário anti-coelho (1:5000). Diferenças de peso corporal entre os grupos VA e VF foram analisadas pelo teste de Wilcoxon Signed-rank entre animais pareados. Os pesos dos órgãos absolutos foram comparados por ANOVA e pelo teste *t* de student e as diferenças de peso relativo dos órgãos e densidades de bandas foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Apesar de terem a mesma idade, e pertencerem à mesma ninhada, as fêmeas do grupo VA estavam mais pesadas que as do grupo VF. Esse fato vem confirmar achados anteriores de diferentes autores sugerindo que o peso corporal e os fatores metabólicos desempenham papel fundamental no período da puberdade. Três variantes do RE α – com pesos moleculares aparentes de 64, 56 e 42 kD – foram encontradas nos ovários, útero e vagina. A expressão de todas as três variantes em ovários e úteros, bem como as variantes 64 e 56 kD na vagina, das fêmeas do grupo VA, parece ter sido menor do que em ratas do grupo 21 DPN. Por outro lado, a expressão da variante 42 kD em tecido de vagina de ratas do grupo 21 DPN foi menor do que a expressão nas fêmeas do grupo VA e VF. Nossos resultados sugerem que – com exceção da variante 42 kD na vagina – a expressão de todas as variantes de RE α nos ovários, úteros e vaginas parecem diminuir nas ratas quando ocorre a abertura de vagina.

ABSTRACT

Estrogen receptor alpha (ER α) regulates cellular differentiation and proliferation in epithelial target tissues of the female reproductive system. Little is known, however, about expression of ER α during pre-pubertal development. The objective of the present study was to evaluate the expression of ER α in some estrogen responsive tissues such as ovary, vagina and uterus, during vagina opening, an event that marks the beginning of puberty in female rats. Expression of ER α was evaluated in groups of Sprague-Dawley rats killed by decapitation on postnatal day 21 (PND 21), and on the day of vaginal opening (VO). ER α was also evaluated in a third group of female rats with closed vaginas (VC) matched to animals of VO group by age and, whenever possible, by litter of origin. Immediately after sacrifice the target organs (ovaries, uteri and vagina) were removed and stored at -80°C until further use. The organs were weighed still frozen, thawed and homogenized (individual organs for uterus and vagina and pools of three ovaries of the same group) before SDS PAGE and Western Blot analysis. Immunoblots were incubated with polyclonal antibodies against mouse ER α (1:200) and afterwards with secondary antibodies antirabbit IgG (1:5000). Body weight differences between VO and VC groups were analysed by the Wilcoxon Signed-rank test between paired animals. Absolute organ weights were compared by ANOVA and Student's t-test and differences of relative organ weights and band densities were evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test. In any case a difference was considered as statistically significant when $p < 0,05$. Despite having the same age and litter of origin, females of VO group were heavier than those of VC group. This fact seems to confirm previous findings from several authors suggesting that body weight and metabolic cues play a fundamental role on the timing of puberty. Three different variants of ER α – with apparent molecular weights of 64, 56 and 42 kDa – were found in ovaries, uteri and vaginas. Expression of all three variants in ovaries and uteri, as well as 64 and 56 kDa variants in vaginas of VO group females seemed to be lower than those in rats of PND 21 group. On the other hand, expression of 42 kDa variant in vaginal tissue of rats from PND 21 group was much lower than that of females from VO and VC groups. Altogether present study findings suggest that – with the exception of 42 kDa variant in vagina – expression of all variants of ER α in uterus, ovary and vagina seem to decrease as vaginas open in rats.

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. Introdução	1
1.1 Síntese de estrógenos	2
1.2 Transporte e metabolismo de estrógenos	6
1.3 Ações gerais dos estrógenos	7
1.4 Mecanismos de ações dos estrógenos	7
1.4.1 Coreguladores de REs	10
1.4.2 Domínios estruturais e funcionais dos REs	10
1.4.3 Subtipos de REs (α e β)	13
1.4.4 Subtipo RE γ	14
1.4.5 Variantes de RE	15
1.5 Ações dos estrógenos no sistema reprodutivo feminino	16
1.5.1 Desenvolvimento sexual feminino	16
1.5.1.1 Desenvolvimento fetal	17
1.5.1.2 Desenvolvimento pós-natal	17
1.5.2 Alterações promovidas por xenoestrógenos	23
2. Objetivo	24
3. Materiais e métodos	25
3.1 Animais e grupos	25

3.1.1 Animais	25
3.1.2 Acasalamento	25
3.1.3 Tratamento	26
3.1.4 Ninhada	26
3.1.5 Grupos analisados	27
3.1.6 Retirada e armazenamento dos órgãos	27
3.2 Determinação semiquantitativa de receptores de estrogênio do subtipo α	28
3.2.1 Extração de proteínas	28
3.2.2 Determinação de proteínas	28
3.2.3 Eletroforese	29
3.2.4 <i>Immunoblotting</i>	29
3.2.5 Análise semiquantitativa das bandas	31
3.2.6 Análise estatística	32
3.2.7 Equipamentos e reagentes	32
3.2.7.1 Equipamentos	32
3.2.7.2 Softwares	33
3.2.7.3 Reagentes	33
3.2.7.4 Anticorpos	39
3.2.8 Preparo de soluções	40
4. Resultados	45
4.1 Peso corpóreo	45
4.2 Peso dos órgãos (ovários, útero e vagina)	45
4.2.1 Ovários	49
4.2.2 Útero	49

4.2.3 Vagina	50
4.3 Expressão do receptor de estrogênio subtipo α (RE- α) analisada por Western Blotting	54
4.3.1 Ovários	54
4.3.2 Útero	59
4.3.3 Vagina	63
5. Discussão	67
5.1 Puberdade em ratas	67
5.1.1 Regulação da puberdade	67
5.1.1.1 Relação entre peso corpóreo e puberdade	67
5.1.2 Início da puberdade	69
5.1.3 Peso corpóreo e abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley	71
5.2 Expressão do RE α em ovários, útero e vagina de ratas Sprague-Dawley	71
5.2.1 Especificidade do anticorpo usado para evidenciar RE α	71
5.2.2 Expressão das variantes de RE α	72
5.2.3 Expressão do RE α no período pré-puberdade	74
5.2.4 Regulação da expressão do RE α pelos níveis de estradiol	74
5.2.5 Expressão das variantes de RE α em outros estudos	76
5.2.6 Homologia interespécies	80
5.3 Expressão de variantes de RE α em tumores de mama em mulheres	80
5.4 RE γ	81

5.5 Importância toxicológica do estudo da expressão do RE α	81
6. Conclusões	85
7. Referências Bibliográficas	86

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os efeitos de substâncias suspeitas de serem “desreguladores endócrinos” têm sido intensamente investigados. Segundo definição do EDSTAC (*Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*, comitê constituído pela Agência de Proteção Ambiental americana – US EPA), desreguladores endócrinos (DEs) são quaisquer substâncias exógenas que alterem funções endócrinas e causem efeitos adversos no indivíduo, sua progênie e/ou (sub) populações de organismos (Goldman *et al*, 2000). Esses efeitos adversos podem resultar da interferência com a produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação de processos do desenvolvimento (Kavlock *et al*, 1996).

Entre os DEs conhecidos se incluem os estrógenos ambientais ou xenoestrógenos (Klaassen, 2001), cujas ações podem ser mediadas pela: (1) interferência com as enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios esteróides; (2) alteração da liberação hormonal do eixo hipotalâmico-pituitário; e (3) atuação como ligantes de receptores esteróides. As alterações funcionais mediadas pela ligação de xenobióticos a receptores de estrógenos, andrógenos e hormônios tireoidianos específicos, tem sido as mais estudadas no contexto de desregulação endócrina, principalmente os efeitos destes desreguladores nos sistemas reprodutivos masculino e feminino.

A diminuição do número e motilidade de espermatozóides e aumento de incidência de câncer testicular e descida anormal de testículos, são algumas alterações que podem estar associadas à desregulação do desenvolvimento de gônadas masculinas por agentes exógenos (Goldman *et al*, 2000).

Por outro lado, várias ocorrências como puberdade precoce, endometriose e câncer de mama, podem estar relacionadas à interferência de substâncias exógenas com o sistema reprodutor feminino (Goldman *et al*, 2000). Um exemplo neste sentido é o do DES (dietilestilbestrol), estrógeno sintético usado, até o início da década de 70, para evitar a ocorrência de abortos espontâneos. Embora não haja comprovação científica de que o DES é eficaz para este fim, este medicamento foi prescrito para grávidas sendo responsável pelo aparecimento de uma forma rara de câncer, o adenocarcinoma de vagina em mulheres jovens (14 a 21 anos de idade) que haviam sido expostas *in utero* (Giusti *et al*, 1995).

Os andrógenos e estrógenos, assim como a progesterona, são hormônios esteróides sexuais, derivados do colesterol. Os andrógenos e estrógenos são responsáveis principalmente pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, e a progesterona, por sua vez, pela manutenção do ciclo reprodutivo feminino. Os hormônios sexuais, assim como todos os hormônios esteróides são eficazes em concentrações extremamente baixas e, portanto, são sintetizados em pequenas quantidades, medidas no plasma em concentrações da ordem do nanomol ou inferiores.

1.1 Síntese de estrógenos

Os estrógenos endógenos, 17 β -estradiol, estrona e estriol, são esteróides com 18 átomos de carbono, derivados do colesterol (Figura 1) e sintetizados nos ovários, testículos e glândulas adrenais (Gruber *et al*, 2002). A síntese dos estrógenos é descrita a seguir.

Após se ligar a receptores lipoprotéicos, o colesterol é capturado por células esteroidogênicas e levado aos sítios de síntese de esteróides. Os diferentes hormônios esteróides são formados pela clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol - reduzindo o número dos átomos de carbono de 27 para 18 - que ocorre nas mitocôndrias de tecidos formadores de hormônios esteróides. O passo limitante na produção de esteróides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna mitocondrial. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação que ocorrem durante a biossíntese de esteróides, são catalisadas por oxidases de função-mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ (Nelson & Cox, 2000).

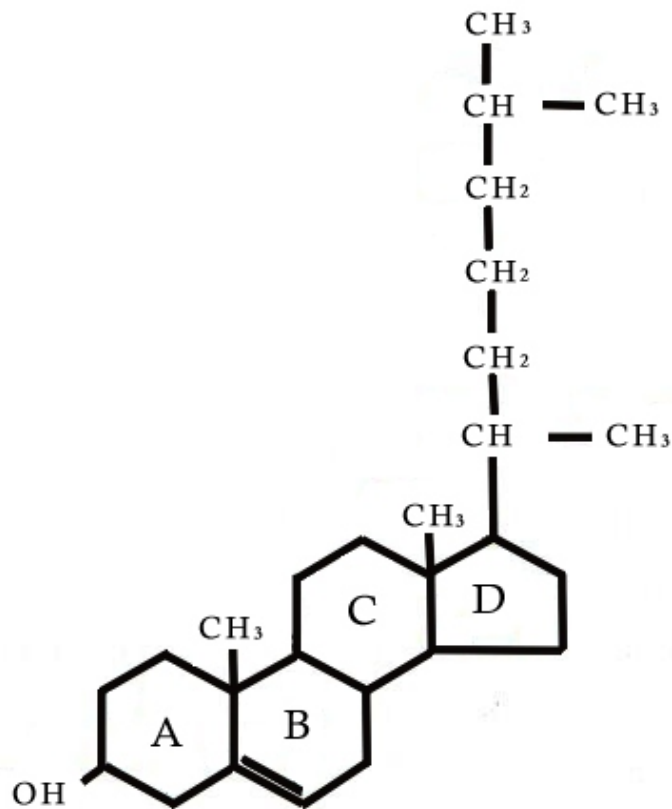


Figura 1: Fórmula estrutural do colesterol (Nelson & Cox, 2000).

A aromatização, último passo no processo de formação de estrógenos, é catalisada pelas aromatasas do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), que funcionam como desmetilases, e estão presentes no retículo endoplasmático liso (Gruber *et al*, 2002). Como mostrado na Figura 2, essa etapa converte testosterona em estradiol, androstenodiona em estrona e 16 α -hidroxiestrone em estriol (Meinhardt & Mullis, 2002). As fontes primárias de estradiol são as células da teca e as células granulosas dos ovários. Resumidamente, as células da teca secretam andrógenos, que se difundem para as células granulosas onde, sob ação das aromatasas, são transformadas em estrógenos. A descrição desse processo será retomada adiante quando abordarmos o

desenvolvimento sexual. A estrona e o estriol são formados no fígado e ovários a partir do estradiol (Gruber *et al*, 2002 e Klaassen, 2001).

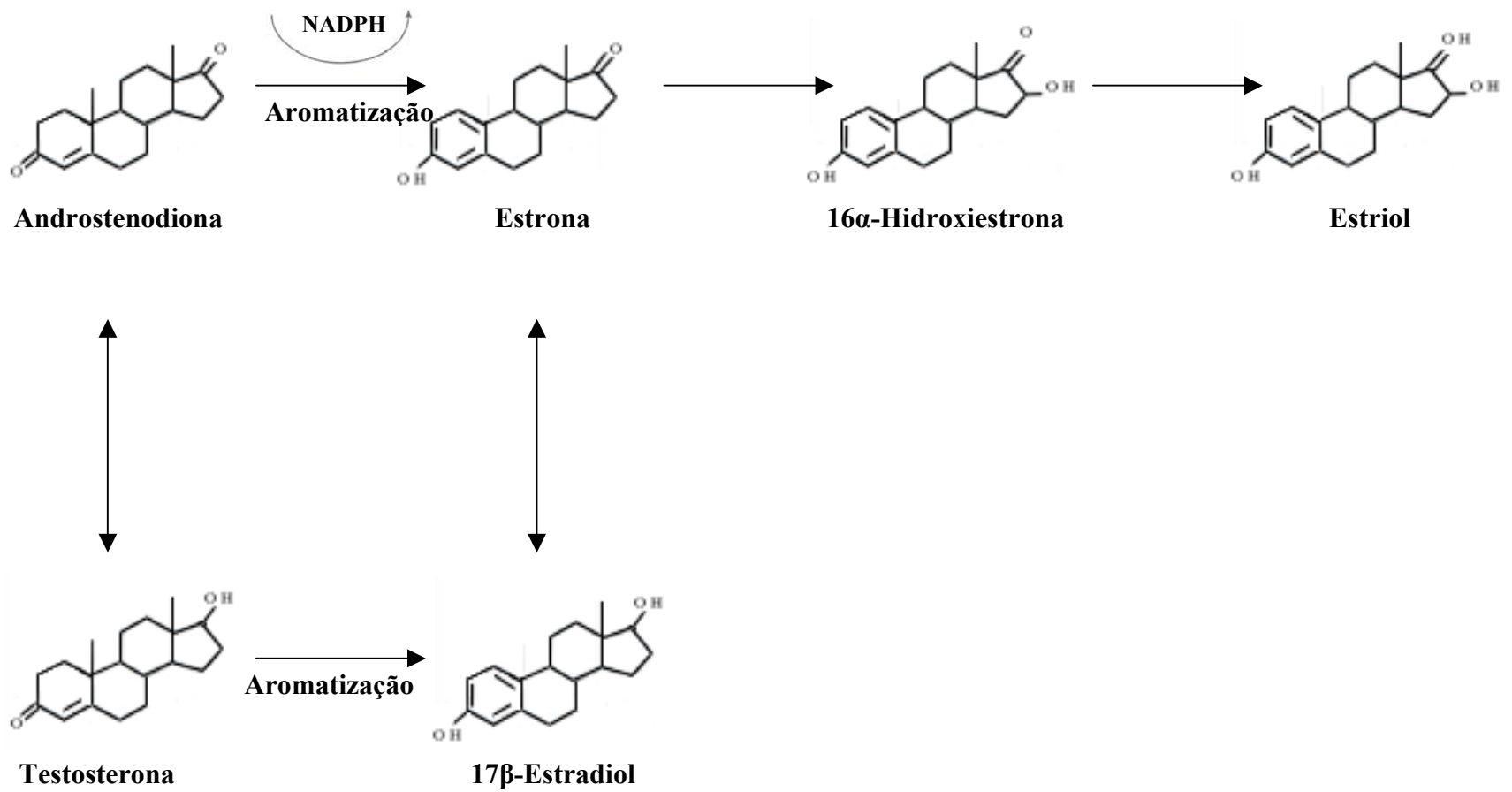


Figura 2: Biossíntese de estrógenos (modificado de Katsung, 1998 e Gruber *et al*, 2002)

1.2 Transporte e metabolismo de estrógenos

Por serem altamente hidrofóbicos, os hormônios esteróides são transportados, por proteínas carreadoras específicas, dos órgãos produtores até os respectivos tecidos-alvo, onde passam para o meio intracelular por difusão simples e se ligam a receptores nucleares.

O estradiol se liga de modo reversível a uma β -globulina (ligante de hormônios esteróides) e, com menos afinidade, à albumina. Cerca de 2 a 3 % do estradiol total se encontra livre no plasma (Gruber *et al*, 2002).

Segundo Blom e colaboradores (2001), os estrógenos são metabolizados por sulfotransferases (sulfatação) ou pela UDP-glucuronosil transferase (glucuronidação) e os conjugados são excretados na bile e na urina. A hidrólise desses conjugados pela flora intestinal possibilita a subsequente reabsorção do estrógeno, resultando em uma recirculação entero-hepática.

Os estrógenos também são metabolizados por hidroxilação e subsequente metilação, formando catecóis e estrógenos metoxilados (Osawa *et al*, 1993). A hidroxilação de estrógenos leva a formação dos catecóis estrógenos, *e.g.*, 2-hidroxiestrógenos, 4-hidroxiestrógenos e 16 α -hidroxiestrógenos. Dentre estes, a 4-hidroxiestrone e o 16 α -hidroxiestradiol são considerados carcinogênicos (Gruber *et al*, 2002 e Zhu & Liehr, 1993). A metilação de 2-hidroxiestrógenos e 4-hidroxiestrógenos pela catecol-*O*-metiltransferase dá origem a metabólitos metoxilados (Gruber & Huber, 2001). Os catecóis-estrógenos se ligam a receptores de estrogênio e possuem fraca atividade estrogênica em animais. Além disso, os catecóis-estrógenos são capazes de manter um processo de oxi-redução cíclico e contínuo formando quinonas intermediárias (Gruber *et al*, 2002). Devido à formação de radicais livres durante esse processo, e a ligação covalente desses intermediários ao DNA, os estrógenos podem apresentar atividade genotóxica (Liehr, 2000).

Outros agentes como os fitoestrógenos (*e.g.* genesteína e daidzeína - isoflavonóides encontrados na soja e no cravo), alguns desreguladores hormonais ambientais, e estrógenos sintéticos como o DES, também possuem atividade estrogênica, ou seja, mimetizam algumas das ações dos estrógenos endógenos em tecidos-alvo.

1.3 Ações gerais dos estrógenos

Os estrógenos endógenos (*i.e.*, 17 β -estradiol, estrona e estriol) são responsáveis pela regulação de diversos processos fisiológicos em tecidos-alvo, principalmente em órgãos do sistema reprodutivo, onde desempenham um importante papel na diferenciação sexual, na regulação da fertilidade e no crescimento e desenvolvimento desses tecidos.

Os sistemas cardiovascular (Barret-Connor e Bush, 1991), esquelético (Migliaccio *et al*, 1992), entre outros, também são alvos de estrógenos endógenos.

Os estrógenos podem influenciar vários processos fisiológicos, são agentes vasoprotetores naturais, protegem contra a arteroesclerose, reduzem o tônus vascular da musculatura lisa e abrem canais de cálcio específicos (White *et al*, 1995). O papel dos estrógenos na manutenção da integridade óssea é comprovado pelo aumento da susceptibilidade a fraturas (osteoporose), decorrente da deficiência de estrógenos, que ocorre principalmente a partir da menopausa.

Além disso, os estrógenos podem atuar no sistema nervoso central (Naftolin *et al*, 1990 e Garcia *et al*, 1999), na pele (Schmidt *et al*, 1996), no desenvolvimento de câncer de mama e endometrial e na proteção contra neoplasias de cólon (Calle *et al*, 1995).

Os efeitos fisiológicos dos estrógenos de ação mais rápida, como a vasodilatação de curta duração de artérias coronárias (Kim *et al*, 1999), são promovidos por mecanismos envolvendo efeitos não-genômicos ou não-clássicos, ou seja, são mediados por receptores de esteróides presentes na superfície celular (Revelli *et al*, 1998) e geralmente envolvem o Ca²⁺ como mensageiro secundário. As ações clássicas ou genômicas dos estrógenos (assim como as de outros hormônios esteróides), requerem a ligação destes a receptores de alta afinidade localizados no interior das células-alvo, receptores estes que regulam a transcrição de genes específicos. É possível ainda que ações genômicas e não-genômicas atuem de maneira sinérgica, promovendo ações imediatas e também de longa duração ou persistentes (Klaassen, 2001).

1.4 Mecanismos de ações dos estrógenos

Os estrógenos desencadeiam suas ações biológicas (agonistas e antagonistas) em diferentes tipos celulares, por meio de ligação a receptores nucleares específicos, os

receptores de estrogênio (RE), membros da superfamília dos receptores nucleares (que incluem também os receptores do ácido retinóico e de hormônios tireoidianos).

Como ilustrado na Figura 3, o RE livre no citoplasma ou localizado na membrana nuclear se encontra ligado a proteínas receptores-associadas. Estas proteínas servem como 'chaperones' que estabilizam o receptor no seu estado inativo ou "mascaram" o domínio de ligação ao DNA do próprio receptor (Smith & Toft, 1993). A localização exata do RE (assim como de outros receptores de esteróides) não é totalmente conhecida, embora o mais provável seja que os receptores se encontrem distribuídos igualmente entre o citoplasma e o núcleo celular, equilíbrio este alterado após a ligação a estrógenos (Gruber *et al*, 2002).

Quando o estrógeno se difunde para o meio intracelular, ele se liga ao domínio de ligação ao ligante (DLL) do receptor que, por sua vez, se dissocia dos seus 'chaperones'. Esse complexo formado pelo receptor e pelo estrógeno (RE-E), se difunde para o interior do núcleo da célula e se liga a sequências específicas nas regiões promotoras do DNA, chamadas elementos de resposta a estrógenos (ERE). Dessa maneira ocorre a estimulação ou supressão da transcrição dos genes alvo dos estrógenos, também influenciada pela ligação a proteínas co-reguladoras (coativadores e co-repressores), que serão mencionadas a seguir (Pettersson *et al*, 1997). O mecanismo de translocação do complexo RE-E não é inteiramente conhecido. Sabe-se, porém que esse movimento é estimulado pela proteína caveolina-1, que interage diretamente com o receptor (Schlegel *et al*, 1999). Os estrógenos também podem regular a transcrição de genes que não possuem os EREs, interferindo com a atividade de outros fatores de transcrição, como por exemplo, ligando-se a subunidades da proteína de ativação-1 (Webb *et al*, 1995).

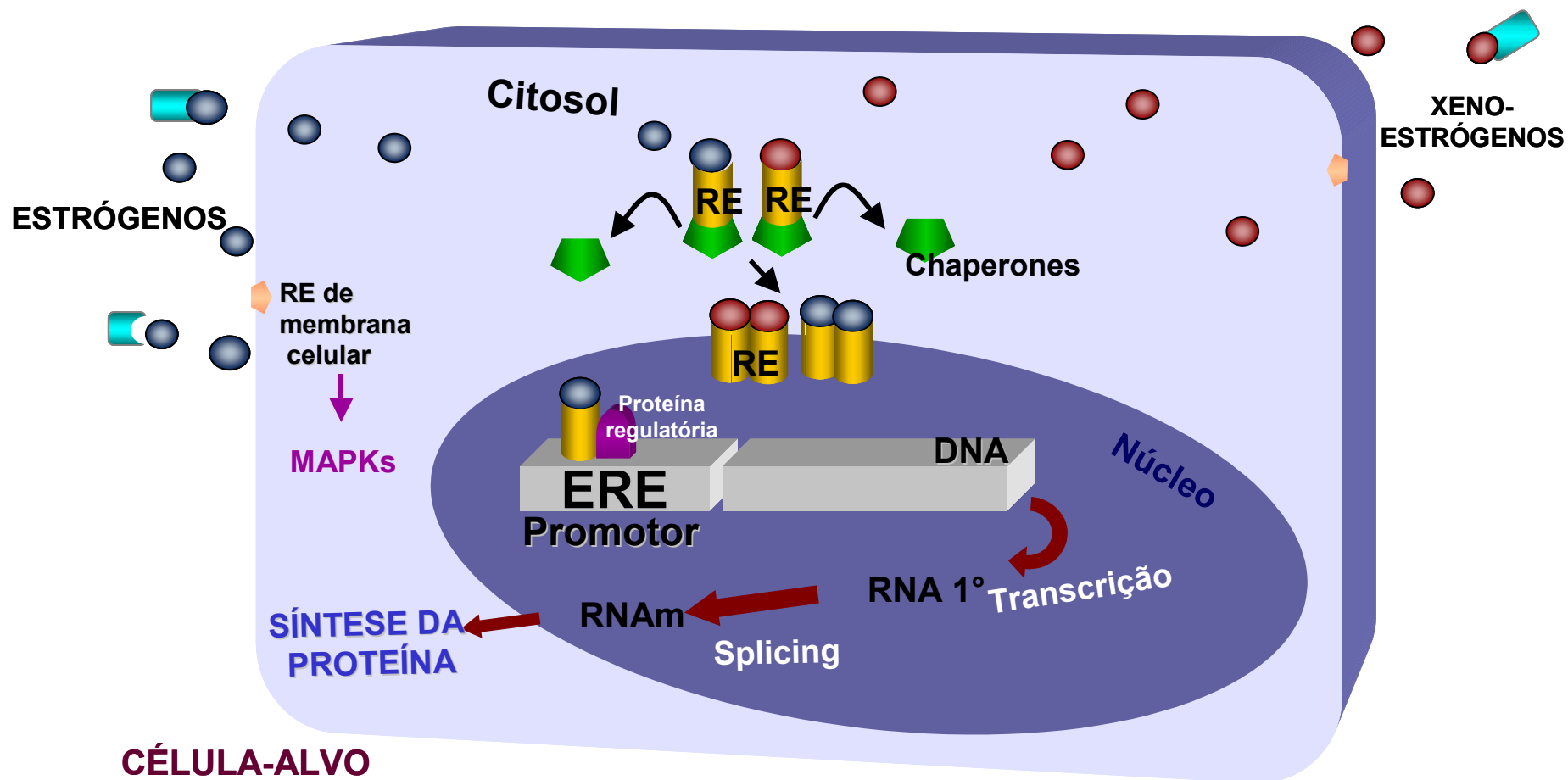


Figura 3: Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos.

1.4.1 Coreguladores de REs

Os REs interagem com diversas proteínas coreguladoras que se intercalam entre o receptor ativado e a maquinaria transcripcional. Os complexos formados por REs, fatores de transcrição e proteínas coativadoras e co-repressoras, modulam a capacidade transcripcional do gene. As proteínas coativadoras possuem maior capacidade de aumentar a atividade transcripcional dos REs, enquanto as co-repressoras interagem com receptores agonistas ou antagonistas e também competem com as proteínas coativadoras (Gruber *et al*, 2002).

As ligações dos estrógenos a hormônios, DNA e também a proteínas coreguladoras, podem ser melhor compreendidas a partir do conhecimento dos domínios funcionais dos receptores.

1.4.2 Domínios estruturais e funcionais dos REs

A Figura 4 mostra a conformação geral dos domínios funcionais pertencentes à superfamília de receptores intracelulares e estruturas como 'chaperones' e o próprio hormônio esteróide, previamente mencionadas.

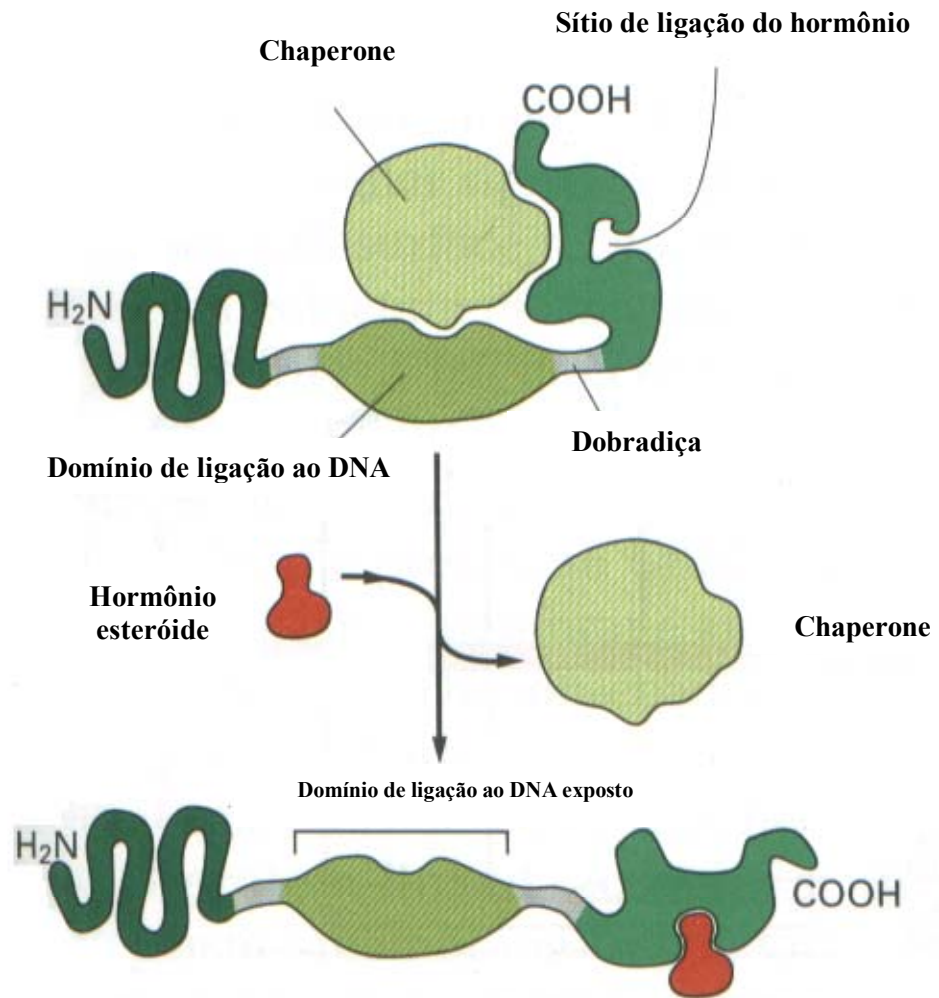
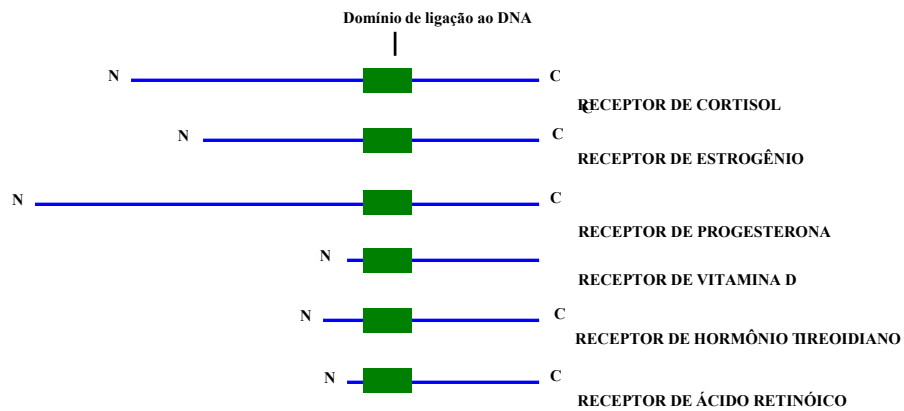


Figura 4: Domínios funcionais da superfamília de receptores intracelulares (modificado de Alberts *et al*, 1994).

A [Figura 5](#) mostra a estrutura linear dos diferentes receptores dessa superfamília, incluindo o receptor de estrogênio.



[Figura 5](#): Estrutura dos componentes da superfamília de receptores nucleares (modificado de Alberts *et al*, 1994).

Os domínios funcionais dos REs são mostrados de maneira esquemática na [Figura 6](#).

- Domínio A/B ou amino-terminal – esse domínio, que possui alto grau de variabilidade, codifica uma função de ativação ligante-independente (FA1), que é uma região do receptor envolvida em interações entre proteínas e na ativação transcripcional da expressão do gene-alvo.
- Domínio C ou de ligação ao DNA (DDL) – esse domínio possui dois dedos de zinco (dobradiça), importantes na dimerização do receptor e na ligação a sequências específicas do DNA.
- Domínio D/E/F ou de ligação ao ligante (DLL) ou carbóxi-terminal – possui diferentes conjuntos de aminoácidos, responsáveis pela ligação a diferentes ligantes (estrógenos). Este domínio também é responsável pela dimerização do receptor, pela translocação nuclear e transativação da expressão do gene-

alvo e pela interação com proteínas coreguladoras. Esse domínio possui ainda uma função de ativação ligante-dependente (FA2).

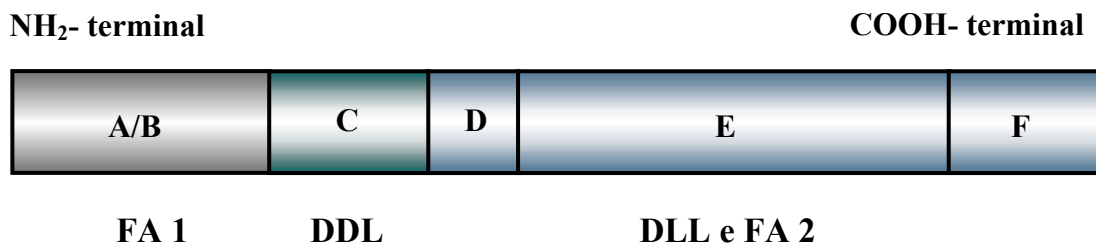


Figura 6: Domínios funcionais dos receptores de estrogênio

Esses domínios, de uma maneira geral não são totalmente homólogos entre dois subtipos de REs identificados (α e β) o que confere diferentes comportamentos fisiológicos destes receptores no organismo.

1.4.3 Subtipos de REs (α e β)

Os dois subtipos de RE mais conhecidos são o receptor de estrogênio α (RE α) e o receptor de estrogênio β (RE β). O subtipo clássico ou RE α foi clonado inicialmente em 1986, a partir de uma linhagem de células neoplásicas mamárias (Koike *et al*, 1987), enquanto o RE β foi isolado em 1996, a partir de próstata de rato e testículo humano (Kuiper *et al*, 1996 e Mosselman *et al*, 1996). Esses dois subtipos variam quanto a estrutura e seus genes codificantes se encontram em diferentes cromossomos. O gene do RE α foi mapeado a partir do braço longo do cromossomo 6, enquanto o RE β está localizado na banda q22-24 do cromossomo 14 (Gruber *et al*, 2002). Além disso, ambos subtipos apresentam diferenças de expressão nos vários tecidos (Wu *et al*, 1992, 1993, Hutz *et al*, 1993 e Saunders *et al*, 1997), assim como diferentes afinidades por ligantes, como apresentado na Tabela 1.

1.4.4 Subtipo RE γ

Esse subtipo de RE foi primeiramente identificado em 1998 (por Rao) em fígado de camundongos. Entretanto pouco se sabe sobre suas funções fisiológicas e seus genes-alvo (Coward *et al*, 2001).

Os poucos estudos publicados até agora indicam que a expressão desse subtipo de RE é maior em órgãos não reprodutivos como coração, cérebro, rim e placenta (Giguere *et al*, 1988; Heard *et al*, 2000; Hong *et al*, 1999 e Sladek *et al*, 1997).

Um estudo comparando a ligação de xenoestrógenos aos três subtipos de RE (Coward *et al*, 2001), indica que o RE γ possui maior afinidade de ligação ao tamoxifeno e ao DES, quando comparado aos outros dois subtipos.

Tabela 1: Afinidade relativa (17 β -estradiol = 100%) de diferentes xenoestrógenos (ligantes) pelos REs α e β .

Ligante	RE α	RE β
17 β -estradiol ^a	100	100
17 α -estradiol ^a	58	11
Estriol ^a	14	21
Estrona ^a	60	37
4-hidroxiestradiol ^a	13	7
2-hidroxiestrona ^b	2	0,2
Tamoxifeno ^b	4	3
Raloxifeno ^b	69	16
Genesteína ^b	4	87
Coumestrol ^b	20	140
Daidzeína ^b	0,1	0,5
4-octilfenol ^b	0,02	0,07
Nonilfenol ^b	0,05	0,09

^a segundo Kuiper *et al*, 1997; ^b segundo Kuiper *et al*, 1998

A diversidade biológica dos REs vai além dos dois subtipos apresentados, *i.e.*, cada subtipo pode apresentar diversas isoformas (ou variantes) em diferentes tecidos ou células (Friend *et al*, 1997).

1.4.5 Variantes de REs

As variantes de REs surgem a partir de remoções de íntrons (RNA *splicing*) equivocadas e deleções de éxons (regiões codificantes do DNA) durante a formação de RNA mensageiro, dando origem a proteínas, ou seja REs, com ausência de domínios funcionais específicos. Apesar do papel fisiológico das variantes de REs não ser

totalmente conhecido, as variantes podem estar associadas a eventos tais como alterações da expressão desses receptores em células neoplásicas mamárias (presença ou ausência), ou ainda, a respostas não apropriadas à terapia antiestrogênica (McGuire *et al*, 1991).

Além disso, outros sítios iniciadores de transcrição de RNAm de REs foram identificados de seres humanos e roedores (Friend *et al*, 1997). Shupnik e colaboradores (1989) identificaram um novo RNA mensageiro de RE em pituitárias de ratas, o TERP-1 (*truncated estrogen receptor product*). Essa variante – estimulada por estrógenos e transcrita a partir de um sítio iniciador diferente do correspondente ao RE completo (*full-length*) – codifica uma proteína (RE) truncada na região amino-terminal (Friend *et al*, 1995). Além dessa variante, outras de diferentes tamanhos também foram identificadas na hipófise e em útero de ratas (Friend *et al*, 1997).

1.5 Ações dos estrógenos no sistema reprodutivo feminino

Para melhor entendermos a ação dos estrógenos na reprodução feminina, uma breve explicação do desenvolvimento sexual será apresentada a seguir.

1.5.1 Desenvolvimento sexual feminino

Apesar de algumas diferenças interespecíficas (*e.g.* duração do ciclo sexual), os mamíferos são em geral muito semelhantes quanto à fisiologia reprodutiva. Os sistemas reprodutivos femininos de roedores e seres humanos possuem semelhanças adicionais, como o aumento na liberação de gonadotropinas no meio do ciclo, o que desencadeia mudanças na maturação oocítica e folicular dos ovários (Goldman *et al*, 2000).

Em virtude desta semelhança, muitos resultados obtidos com roedores podem ser facilmente extrapolados para humanos. Os roedores também apresentam outras vantagens como modelos experimentais: são de fácil manipulação, crescem rapidamente e apresentam características externas de maturidade sexual facilmente observáveis (Ojeda & Urbanski, 1994).

O desenvolvimento sexual feminino em ratas pode ser dividido em cinco fases (Ojeda & Urbanski, 1994): (a) fetal – que se inicia no dia 12 de gestação, quando o hormônio de liberação luteinizante (LHRH) pode ser detectado no cérebro fetal (b) neonatal – que se inicia no dia do nascimento e vai até o dia 7 pós-natal PN; (c) infantil – do dia 8 ao dia 21 PN; (d) juvenil – que termina, aproximadamente, entre os dias 30 e 32 PN; (e) peripubertal – que possui duração variada, mas que culmina com a primeira ovulação e a abertura de vagina (mais ou menos aos 38 dias PN).

1.5.1.1 Desenvolvimento fetal

O LHRH pode ser detectado no cérebro a partir do dia 12 de gestação e, ao mesmo tempo, sítios de ligação a esse hormônio são encontrados na pituitária anterior (ou adenohipófise) primordial. Alguns estudos sugerem que o LHRH hipotalâmico desempenha papel essencial na diferenciação de células gonadotrópicas hipofisárias (Szabo & Csanyi, 1982 e Fink & Smith, 1971).

Nos primeiros 4 a 5 dias PN, os ovários possuem somente oócitos agrupados, envoltos por células estromais, e outras poucas células que provavelmente irão se diferenciar nas primeiras células granulosas (Ojeda & Urbanski, 1994).

Nos ovários, oogônias, formadas por células germinativas em proliferação, passam por divisões meióticas até alcançarem um estágio diplóteno (oócito) entre o dia 17 de gestação e o dia 5 PN (Byskov, 1974). Cada oócito envolto por células forma o folículo primordial.

A Figura 7 mostra os principais eventos associados à maturação, desde o período fetal até a puberdade.

1.5.1.2 Desenvolvimento pós-natal

Logo após o nascimento, os níveis plasmáticos de gonadotropinas, *i.e.*, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), começam a aumentar, atingindo seus valores máximos aproximadamente aos 12 dias de vida, e a partir de então começam a diminuir gradualmente.

No começo da quarta semana, os níveis de gonadotropinas caem e pequenos pulsos de LH surgem a cada 30 minutos, influenciados, aparentemente, pelo aumento, nesse período, da concentração de esteróides circulantes. Esse processo continua até depois da puberdade, com os aumentos de LH, e também de FSH, no meio do ciclo, que estimulam a maturação folicular e oocítica e a ovulação (Goldman *et al*, 2000).

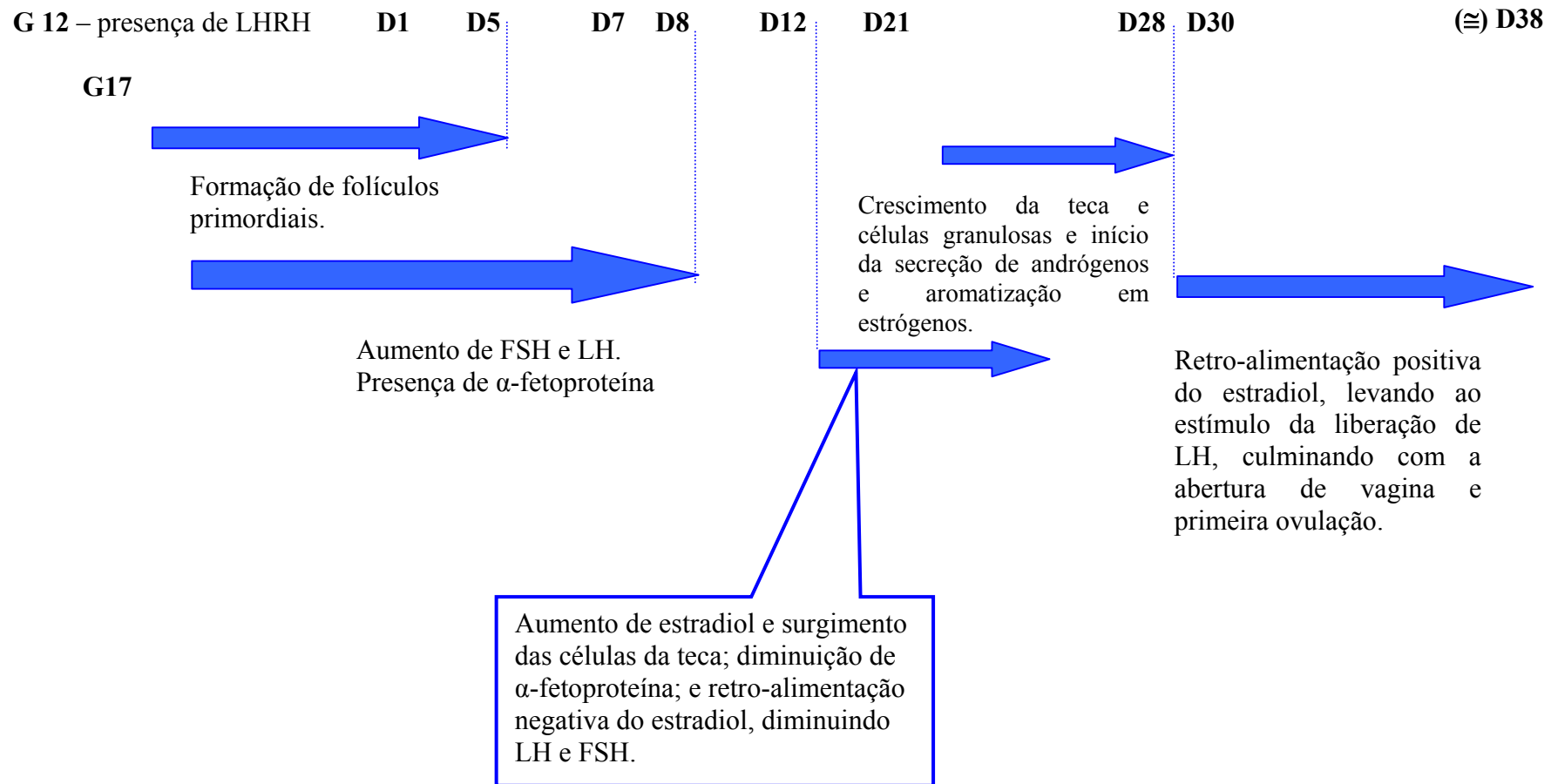


Figura 7: Cronologia dos principais eventos que promovem a maturação sexual de ratas desde o período fetal até a puberdade.
G=idade gestacional; D=idade pós-natal

A parte mais inferior do hipotálamo denominada eminência média, se conecta com a haste hipofisária possibilitando, dessa maneira, que o hormônio de liberação das gonadotropinas (GnRH) secretado de forma pulsante no hipotálamo seja levado, pelos vasos do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, até a hipófise anterior (Guyton & Hall, 1997). A hipófise anterior, por sua vez, libera LH e FSH na circulação sistêmica. A secreção de GnRH hipotalâmico está associada a um fenômeno “gerador de pulsos”, ou seja, a um aumento de atividade elétrica na área medio-basal, cujos mecanismos geradores ao nível celular e anatômico ainda não são bem conhecidos. A secreção de GnRH é imprescindível para o início da puberdade (Goldman *et al*, 2000). O eixo hipotalâmico-pituitário é ilustrado nas Figuras 8 e 9.

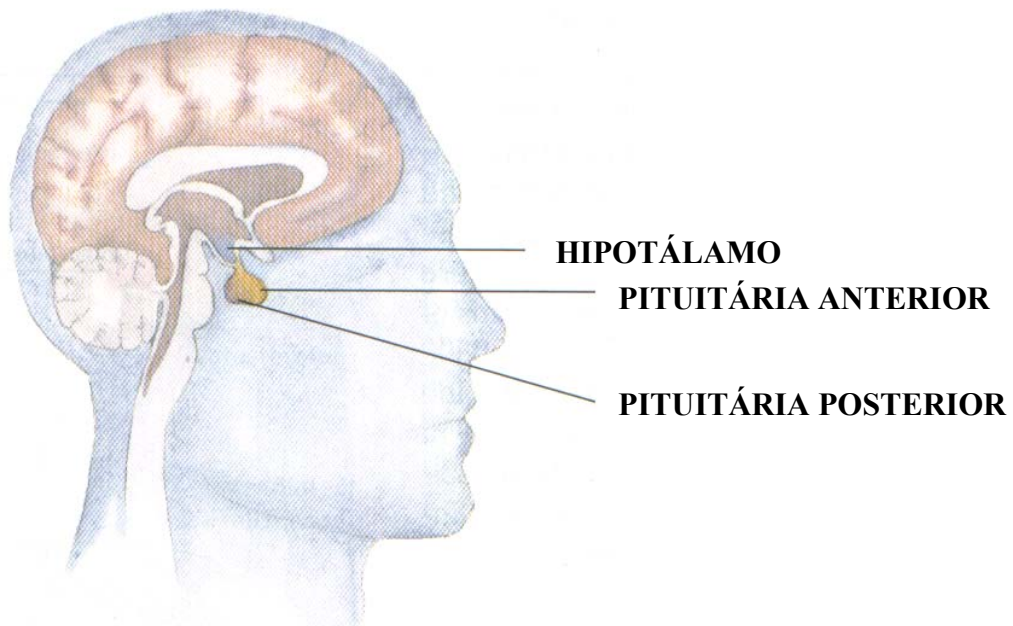


Figura 8: Localização do hipotálamo e da glândula pituitária (modificado de Nelson e Cox, 2000).

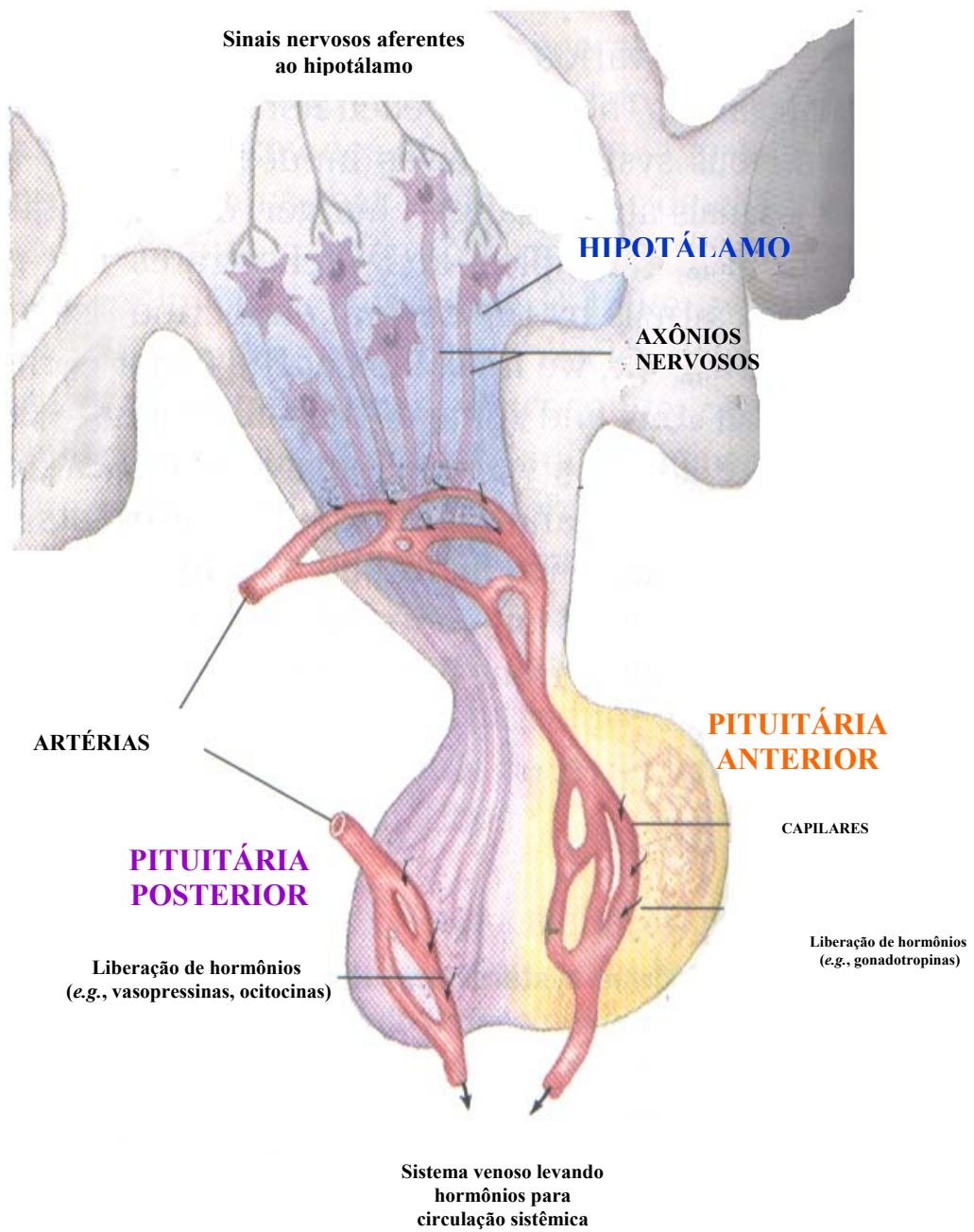


Figura 9: Eixo hipotalâmico-pituitário (modificado de Nelson e Cox, 2000).

O processo de maturação dos folículos primordiais requer a proliferação e diferenciação das células granulosas circundantes dos oócitos e parece estar associado à regulação coordenada de FSH e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento facilitam a maturação folicular, aumentando a afinidade e o número de receptores de FSH (Dunkel *et al*, 1994 e Mayerhofer *et al*, 1997).

Os receptores ovarianos de FSH começam a aumentar nas primeiras semanas de vida, tornando possível a ligação com o FSH e atinge os níveis máximos na quarta semana. O FSH, ainda na primeira semana, já é capaz de estimular a atividade da aromatase (George & Ojeda, 1987), apesar dos baixos níveis de testosterona e progesterona limitarem a produção de estradiol (Carson & Smith, 1986). O aumento do estradiol só é observado a partir da metade da segunda semana, quando surge uma camada de células na teca, envolvendo as células granulosas que já haviam começado a proliferar.

Durante as duas primeiras semanas o estradiol não diminui os níveis de gonadotropinas (por retro-alimentação negativa), devido a presença na circulação a α -fetoproteína que se liga aos estrógenos disponíveis reduzindo a concentração do hormônio livre no plasma (Meijs-Roelofs & Kramer, 1979). Quando os níveis de α -fetoproteína começam a cair, a retro-alimentação negativa promovida pelo estradiol, causa o declínio dos níveis de LH e FSH no começo da terceira semana (Andrews & Ojeda, 1981 e Andrews *et al*, 1981).

Durante a terceira semana, os folículos primordiais sofrem alterações estimuladas pelos elevados níveis de FSH, preparando-os a responder ao primeiro aumento “ovulatório” de LH, ou seja, tornando-os folículos pré-ovulatórios. Esse processo envolve o crescimento das duas principais regiões, a camada de células da teca (exterior) e a camada de células granulosas.

Na quarta semana ocorre uma mudança nos efeitos de retro-alimentação do estradiol e o hipotálamo e a pituitária, passam a responder positivamente, resultando num estímulo da liberação de LH (Andrews *et al*, 1981 e Kawagoe & Hiroi, 1983). Este estímulo, juntamente com a ocorrência da abertura de vagina, culmina com o aparecimento do primeiro aumento pré-ovulatório de LH (Ojeda & Urbanski, 1994), e com o início de mudanças cíclicas de comportamentos endócrinos, semelhantes às que ocorrem na fase adulta.

O LH estimula as células da teca a sintetizarem e secretarem andrógenos, que são então transportados para as células granulosas, onde serão convertidos em estrógenos pela ação das aromatases do citocromo P450.

1.5.2 Alterações promovidas por xenoestrógenos

O desenvolvimento sexual feminino é um processo complexo e multifatorial, envolvendo uma cascata de eventos regulados pelos hormônios do eixo hipotalâmico-pituitário. A regulação da síntese e secreção de gonadotropinas, que vão iniciar a puberdade e, já na fase adulta, dar continuidade ao processo de maturação e ovulação, é feita pelos estrógenos de forma clássica ou genômica, *i.e.* requer a ligação aos seus receptores específicos (REs).

Os xenoestrógenos podem causar efeitos nocivos alterando os processos fisiológicos reprodutivos normais, ou mesmo o desenvolvimento dos órgãos sexuais, a partir da sua ligação a RE.

A susceptibilidade a estrógenos em diferentes momentos do desenvolvimento sexual feminino pode ser antecipada – até certo ponto - a partir da quantificação dos REs presentes em diferentes tecidos, uma vez que, em grande parte esses compostos atuam mediante a ligação com receptores de estrogênio, principalmente do subtipo- α .

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações de expressão do receptor de estrogênio- α (RE α) em ovários, útero e vagina de ratas (Sprague-Dawley), por ocasião da abertura de vagina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o procedimento prático desse trabalho foi supervisionado pelo Prof. Dr. Ibrahim Chahoud e realizado no Departamento de Toxicologia, do Instituto de Farmacologia Clínica e Toxicologia da *Freie Universität*, Berlim, Alemanha, como parte de um convênio de cooperação científica entre a instituição alemã e o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Departamento de Ciências Biológicas) da Escola Nacional de Saúde Pública da FIOCRUZ.

3.1 Animais e grupos

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, fornecidos por *Fa. Winkelmann*, Borchon, Alemanha, adaptados previamente (duas semanas) às condições locais do biotério.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro constante (período claro de 07 às 19 horas), temperatura ambiente de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar em torno de $50\pm 5\%$. As trocas das camas de maravalha (Altromin GmbH, Lage, Alemanha) foram realizadas duas vezes por semana. Água da torneira e ração comercial (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Alemanha) foram fornecidas *ad libitum* e substituídas diariamente.

3.1.2 Acasalamento

O acasalamento dos animais foi realizado segundo o procedimento proposto por Chahoud e Kwasigroch (1977).

Duas fêmeas com aproximadamente 200g foram transferidas para a gaiola de um macho onde permaneceram durante as duas últimas horas do ciclo escuro, por três dias consecutivos.

Após a retirada da gaiola, as fêmeas foram examinadas para a verificação do cruzamento através da presença de *plug* espermático na abertura da vagina ou pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

As primeiras 24 horas após a confirmação do cruzamento foram consideradas como dia 0 (zero) de gravidez.

As fêmeas grávidas foram mantidas em gaiolas individuais.

3.1.3 Tratamento

Neste trabalho foram utilizadas fêmeas grávidas pertencentes ao grupo controle de outro estudo em andamento no laboratório. Esses animais foram tratados com veículo (amido de milho Mondamin®). Segundo estudos de teratologia realizados neste laboratório (dados não mostrados), não há evidências de que esse veículo altere o desenvolvimento embrionário.

O tratamento (10 ml/kg) foi feito por entubação gástrica, do dia 6 ao dia 21 de gestação.

Os animais foram tratados com 2% de amido de milho (Mondamin®). O amido de milho foi aquecido e dissolvido em água.

3.1.4 Ninhada

As fêmeas foram observadas diariamente, a fim de se registrar o dia de nascimento da ninhada (parto espontâneo), que foi considerado o dia 0 (zero) de vida pós-natal.

No dia 22 pós-natal (PN), os filhotes foram separados das mães e no dia 30 PN, separados por sexo e mantidos em gaiolas com filhotes pertencentes à mesma ninhada.

Neste estudo somente as fêmeas foram analisadas.

3.1.5 Grupos analisados

Três grupos de fêmeas foram analisados de acordo com o momento do desenvolvimento sexual em que os animais foram sacrificados: aos 21 dias de idade (21 DPN), vagina fechada (VF) e vagina aberta (VA).

- 21 DPN – fêmeas com 21 dias de vida pós-natal, escolhidas aleatoriamente, foram sacrificadas (n=6).
- VA (vagina aberta) – fêmeas com idade variando entre 37 e 45 dias e com a vagina aberta. Para detectar a abertura da vagina, os animais foram examinados diariamente, às 10 horas da manhã. Assim que um pequeno orifício no canal vaginal era identificado o animal era sacrificado imediatamente (n=12).
- VF (vagina fechada) – fêmeas com idade variando entre 37 e 45 dias e com a vagina fechada. Esse grupo foi constituído da seguinte maneira: para cada animal sacrificado no dia da abertura de vagina, foi sacrificada uma fêmea com a mesma idade e preferencialmente da mesma ninhada, mas com a vagina ainda fechada (n=12).

Todos os animais foram pesados e logo depois sacrificados por decapitação.

3.1.6 Retirada e armazenamento dos órgãos

Na ocasião do sacrifício a vagina, o útero e os ovários de cada fêmea foram removidos e armazenados individualmente em tubos *ependorf*. Os tubos foram mergulhados em nitrogênio líquido e transferidos para congelador a temperaturas ultrabaixas (– 80°C).

3.2 Determinação semiquantitativa de receptores de estrogênio do subtipo- α

3.2.1 Extração de proteínas

A etapa inicial da purificação de proteínas consistiu da maceração dos órgãos realizada em condições de baixíssima temperatura. Todo o material utilizado nessa etapa foi previamente colocado em nitrogênio líquido, por aproximadamente 30 minutos.

Cada órgão foi macerado individualmente (com exceção dos ovários) e recolhido em um tubo *ependorf*. Tampão com inibidor de proteases (Complete Mini Reagent CMR, Roche) foi adicionado, sendo o volume ajustado ao peso do tecido macerado, *i.e.* 2,5 μ l de tampão por mg de tecido.

As amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 20 minutos a 4° C e depois centrifugadas por 30 minutos a 20800g a 4°C.

O sobrenadante foi armazenado a – 80°C para posterior análise.

3.2.2 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi calculada utilizando o *BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit* da Pierce[®], para detecção colorimétrica. Em microplacas de plástico de fundo chato (96 poços) foram pipetados em triplicata o tampão (branco), seis diluições de albumina (BSA) e duas diluições diferentes de cada amostra. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e depois permaneceu por 5 minutos a temperatura ambiente.

As absorbâncias das amostras (540nm) foram lidas em um espectrofotômetro para placas e analisadas pelo Software *Microplate Manager* [®]/PC version 4.0.

3.2.3 Eletroforese

O método descrito a seguir foi realizado baseado em Laemmli, 1970.

A corrida eletroforética foi realizada em cuba da marca *Bio-Rad*[®] Mini-Protean III.

Duas placas de vidro com espaçadores laterais de 1,5 mm foram acomodados no aparato específico para polimerização do gel. O gel de resolução (SDS a 10%) foi preparado e imediatamente aplicado entre as placas de vidro.

Depois de verificada a polimerização, o gel de armazenamento foi preparado e acomodado sobre o gel de resolução e o pente (de 1,5 mm de espessura e 15 canaletas) devidamente colocado.

Após a polimerização o conjunto de placas de vidro e gel foi cuidadosamente retirado e colocado em cuba eletroforética contendo tampão de eletroforese.

O padrão de proteínas – que consistia de sete proteínas, conjugadas a um corante azul, de pesos moleculares variando de 26,6 a 180 kD - foi adicionado (5µl) a primeira canaleta de ambos os géis. As amostras de proteína foram diluídas em tampão *Laemmli* (1:1) e aquecidas com agitação durante 5 minutos a 95°C e pipetadas nas canaletas correspondentes. Amostras de todos os grupos de um mesmo tecido foram distribuídas no mesmo gel. A quantidade de proteína utilizada por canaleta foi de 50µg, valor esse definido em experimentos anteriores (dados não mostrados).

A voltagem da fonte Power Pac 200/Bio Rad[®] foi mantida em 150V nos 10 minutos iniciais e, posteriormente, reajustada para 100V até o final da corrida. A cuba foi mantida durante toda a corrida em recipiente com gelo.

A corrida foi encerrada quando a linha azul correspondente ao corante presente nas amostras atingiu a borda inferior do gel.

3.2.4 Immunoblotting

Cessada a corrida, 45 a 90 minutos depois, as placas foram retiradas, os géis foram devidamente identificados e colocados sobre uma membrana de nitrocelulose previamente umedecida em tampão de transferência. A membrana de celulose, por sua vez, foi acomodada sobre três pedaços de papel filtro também previamente umedecidos. Sobre o gel foi colocado um outro conjunto de três papéis de filtro (Figura 10).

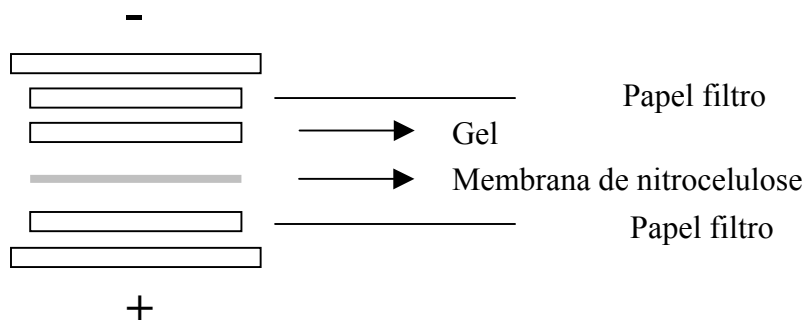


Figura 10: Disposição da membrana e do gel durante a transferência.

A transferência foi realizada em aparelho de transferência a aproximadamente 4°C durante 70 minutos.

Após a transferência o gel foi corado com *Coomassie blue* por 15 minutos e a membrana de nitrocelulose corada em *Ponceau S red* por 10 minutos aproximadamente e copiadas a fim de registrar o padrão e confirmar a transferência. As membranas foram lavadas por 10 minutos (com agitação) em solução tampão de Tris (TBS) e colocadas em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado) por 60 minutos.

Foi utilizado o anticorpo primário policlonal desenvolvido em coelhos contra um peptídeo da região carboxi-terminal do receptor de estrogênio subtipo α de camundongo, fornecido pela *Santa Cruz Biotechnology*[®], ER α (MC-20) sc-542.

A solução de anticorpo primário (diluído 200 vezes em solução de leite em pó desnatado a 5%) foi adicionada a membrana e esta mantida durante a noite sob agitação a 4°C.

As membranas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em solução tampão de Tris com Tween (TTBS) e mais duas vezes por 10 minutos em TBS.

As membranas foram incubadas, com agitação e protegidas da luz, por 90 minutos em solução de anticorpo (1:5000) anti-coelho desenvolvido em asno, conjugado a peroxidase, da *Santa Cruz Biotechnology*[®] (Donkey anti-rabbit IgG-HRP, sc-2077).

Depois da incubação as membranas foram lavadas novamente, duas vezes em TTBS por 10 minutos e mais duas vezes, também por 10 minutos, em TBS.

A solução de substrato de quimioluminescência para peroxidase foi preparada, como recomendado pelo fabricante (*kit UP99619 UptiLight HRP blot substrate, Uptima*), e colocada sobre as membranas, com agitação e protegidas da luz por 1 minuto.

As membranas foram levemente escurridas e colocadas, protegidas por plástico, em uma caixa de revelação. O material foi levado a uma sala escura e revelado no aparelho de revelação de raios-X da *Optimax*, em filme de raios-X do tipo R da KODAK®.

Como controle da concentração de proteínas colocadas no gel, foram analisadas as bandas obtidas a partir da incubação com um anticorpo anti β -actina, um peptídeo presente em uma grande variedade de tecidos e espécies.

Para esse procedimento, depois da revelação, as membranas foram incubadas com solução de substrato de quimioluminescência até o dia seguinte, protegidas da luz. Após a confirmação da ausência de bandas, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo monoclonal (1:30000), proveniente de hibridoma de camundongo, anti- β actina. (Clone AC-15, A5441 Sigma).

As membranas foram lavadas como descrito anteriormente, com TTBS e TBS, e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo (Anti-Maus-IgG POD Konjugat-Ziege, da Bio Genes GmbH) por 90 minutos. As membranas foram lavadas e incubadas com quimioluminescência, com agitação e protegidas da luz. Os filmes foram revelados como descrito anteriormente.

3.2.5 Análise semiquantitativa das bandas

Os filmes foram captados pelo Software *DIANA/95 version 1.6* a partir de uma Câmera *Raytest CCD*. A densidade das bandas foi analisada pelo *Software Advanced Image Data Analyzer, AIDA version 2.11* e os valores foram expressos em Unidades arbitrárias de densidade óptica (UDO).

3.2.6 Análise estatística

Os pesos absolutos dos órgãos – ovários, útero e vagina – dos grupos VF e VA, foram tratados estatisticamente pela análise de variância de uma via (ANOVA) e, em seguida, a diferença significativa entre dois grupos determinada pelo Teste *t* de Student.

Os pesos relativos dos órgãos, assim como a diferença das densidades das bandas imunorreativas mostradas pelos órgãos entre os três grupos analisados (21 DPN, VF e VA), não obedecem a uma distribuição normal. Dessa maneira, esses dados foram analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguidos do Teste *U* de Mann-Whitney.

As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio do programa MINITAB® 10.5 (MINITAB Statistical Software, MTB Inc., PA, USA, 1995).

Os dados de peso corpóreo foram analisados pelo teste de Wilcoxon Signed-Rank, pareando-se o peso corpóreo de cada animal do grupo VA com um animal do grupo VF, com a mesma idade e quase sempre pertencente à mesma ninhada.

3.2.7 Equipamentos e reagentes

3.2.7.1 Equipamentos

- Cuba eletroforética *Mini Protean III*® - Bio Rad
- Espectofotômetro
- Máquina de revelação *Optimax Typ TR* – MS Laborgeräte
- Power Pac 200/Bio Rad®
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell – Bio Rad

3.2.7.2 Software

- Advanced Image Data Analyzer, AIDA version 2.11
- DIANA/95 version 1.6
- Microplate Manager ®/PC version 4.0
- MINITAB® 10.5 (MINITAB Statistical Software, MTB Inc., PA, USA, 1995).

3.2.7.3 Reagentes

- **Ácido acético Glacial**

$C_2H_4O_2$

PM: 60,05

Roth 3738.1

CAS 64-9-7

Lote: 51152031

- **Agarose**

Gibco Brl 15510-027

Lote: 3048959

- **Azul de bromofenol**

$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$

PM: 691,9

Sigma B-8026

CAS 62625-28-9

Lote:65H3577

- **BCA Protein Assay Reagent**

Pierce 23225

- **1-Butanol**

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

PM: 74,12

Merck

CAS 71-36-3

Lote: 29579088 148

- **Clorofórmio**

CHCl_3

PM: 119,4

Sigma C-2432

CAS 200-663-8

Lote: 59H0358

- **Cloreto de magnésio**

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sigma M-2670

PM: 203,3

CAS 7786-30-3

Lote: 67H10242

- **Cloreto de potássio**

KCl

PM: 74,56

Roth 6781.1

CAS 7447-40-7

Lote: 31732523

- **Cloreto de sódio**

NaCl

PM: 58,44

Merck 1.06404.5000

CAS 7647-14-5

Lote: K29051704

- **CMR (complete mini reagent)**

Cocktail de inibidor de proteases

Roche 1 836 153

- **Coomassie Blue**

$C_{47}H_{48}N_3O_7S_2.Na$

PM: 854,0

Serva 17524

CAS 6104-58-1

Lote: 08835

- **Glicina**

$C_2H_5NO_2$

PM: 75,07

Roth 3908.1

CAS 56-40-6

Lote: 072530020

- **Leite em pó desnatado**

Spinnrad 11018

Lote: 396080

- **2-Mercaptoetanol**

2-Hidroxi-etil-mercaptano

Sigma M-3148

CAS 60-24-2

Lote: 27H1172

- **Metanol**

CH₃OH

PM: 32,04

J.T.Baker

CAS 67-56-1

Lote: 0106030004

- **Ortovanadate sódica**

Na₃VO₄

Sigma S-6508

CAS 237-287-9

Lote: 99H0852

- **Padrão de proteína**

Proteínas conjugadas a um corante azul e seus pesos moleculares aproximados

(em kD):

Isomerase triosefosfato (músculo de coelho)	26,6
Desidrogenase láctica (músculo de coelho)	36,5
Fumarase (coração suíno)	48,5
Piruvato quinase (músculo de galinha)	58,0
Frutose-6-fosfato quinase (músculo de coelho)	84,0
B-galactosidase (<i>Escherichia. coli</i>)	116,0
α ₂ -macroglobulina (plasma humano)	180,0

- **Paraformaldeído**

$\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$

Merck 1.04005.1000

CAS 30525-89-4

Lote: K22367805 544

- **Persulfato de amônio**

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Sigma A-3678

CAS 7727-54-0

Lote: 20K0244

- **Ponceau-S concentrado**

CAS 6226-78-4

Sigma P 7767

Lote: 063H6199

- **2-Propanol**

$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$

Roth 6752.1

CAS 67-63-0

Lote: 27149081

- **SDS (dodecil sulfato de sódio)**

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S.Na}$

PM: 288,4

Serva 20783

CAS 151-21-3

Lote: 13508

- **Substrato quimioluminescente para *blotting* com peroxidase**

UP 99619 Uptilight HRP blot substrate

- **TEMED**

1,2-Bis(dimetilamino)etano

CAS 110-18-9

Sigma T-9281

Lote: 90K1699

- **Tris (hidroximetilaminometano)**

$C_4H_{11}NO_3$

PM: 121,14

Roth 5429.1

CAS 77-86-1

Lote: 45150561

- **Tris (hidroximetilaminometano) HCl**

$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$

PM: 157,61

ICN Biomedicals 816124

CAS 1185-53-1

Lote: 84270

- **Tween 20**

Roth 9127.1

CAS 9005-64-5

Lote: 03252523

3.2.7.4 Anticorpos

- **Anti-receptor de estrogênio α**

ER- α (MC-20): sc-542

IgG coelho policlonal, 200 μ g/ml

Santa Cruz Biotechnology

Armazenar a 4°C

Lote: K191

- **Anti- β - actina**

Clone AC-15

Mouse ascites fluids

Sigma A5441

Armazenar a 4°C ou por longos períodos, aliquotado a -20°C

Lote: 041K4818

- **Anti-coelho**

Donkey anti-rabbit IgG-HRP

200 μ g/0,5ml

cat # sc-2077

Santa Cruz Biotechnology

Armazenar a 4°C

Lote: 1029

- **Anti-camundongo**

Anti-Maus-IgG POD Konjugat (Ziege)

Bio Genes GmbH 22094.0001

AMP-1095-2

Armazenar a 4°C

3.2.8 Preparo de soluções

- **1-Butanol (1:3)**

1-Butanol 30 ml

Água bidestilada 60 ml

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Coomassie Blue 0,025%(p/v) 10% (v/v) ácido acético**

Ácido acético 200 ml

Água bidestilada 1800 ml

Coomassie Blue G-250 0,5g

Homogeneize por uma hora e filtre em papel Whatman nº 1.

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Gel de resolução**

Quantidade necessária para um gel:

Acrilamida/bisacrilamida 30% 3,3 ml

1,5 M Tris (pH 8,8) 2,5 ml

SDS 10% (p/v) 100 µl

Persulfato de amônio 10% (p/v) 100 µl

TEMED 4 µl

Água bidestilada 4,0 ml

- **Gel de empacotamento**

Quantidade necessária para um gel:

Acrilamida/bisacrilamida 30%	330 μ l
1,5 M Tris (pH 8,8)	250 μ l
SDS 10% (p/v)	20 μ l
Persulfato de amônio 10% (p/v)	20 μ l
TEMED	2 μ l
Água bidestilada	1,4 ml

- **Ortovanadate sódica 200 μ M**

Ortovanadate sódica	0,3678 g
Água bidestilada	10 ml

Armazenar a -20° C.

- **10 % de persulfato de amônio (p/v)**

Persulfato de amônio	300 μ g
Água bidestilada	300 μ l

Armazenar a 4° C.

- **10% SDS**

SDS	10 g
Água bidestilada autoclavada	90 ml

Cubra o recipiente, homogeneize misture e aqueça a 63° C.
 Água bidestilada autoclavada *qsp* 100 ml
 Armazenar a temperatura ambiente.

- **Solução bloqueadora 5% (v/v)**

Solução tampão TBS	80 ml
--------------------	-------

Leite em pó desnatado 4 g

OBS: Preparo na hora

- **Solução descolorante**

Metanol 300 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Água bidestilada 600 ml

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Solução de diluição de anticorpo 0,5% (v/v)**

Solução tampão TBS 80 ml

Leite em pó desnatado 0,4 g

OBS: Preparo na hora

- **Solução Ponceau S**

Ponceau S concentrado 20 ml

Água bidestilada *qsp* 180ml

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Solução tampão de eletroforese (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %)**

Água bidestilada *qsp* 1000 ml

Tris 3,03 g

Glicina 14,41 g

SDS 1 g

Armazenar a 4 °C.

- **Solução tampão de transferência (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0,037%, Metanol 20 %)**

Tris	3,03 g
Glicina	14,41 g
Metanol	200 ml
SDS 0,037% (v/v)	0,37 g
Água bidestilada <i>qsp</i>	1000 ml

Armazenar a 4 °C.

- **Solução tampão Tris (TBS)**

Tris	30,0 g
NaCl	2,0 g
Água bidestilada <i>qsp</i>	800 ml

Ajustar o pH para 8,0 com HCl 6 N

Água bidestilada <i>qsp</i>	1000 ml
-----------------------------	---------

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Solução tampão Tris/Tween (TTBS)**

Solução TBS	1000 ml
Tween	0,5 ml

Armazenar a temperatura ambiente.

- **Solução Tris 1,5M pH 8,8**

Tris	181,78 g
Água bidestilada <i>qsp</i>	800 ml

Homogeneizar e ajustar o pH para 8,8 com HCl 6 N

Água bidestilada <i>qsp</i>	1000 ml
-----------------------------	---------

Armazenar 4° C.

- **Solução Tris 50mM pH 7,4**

Tris-HCl	7,88 g
Água bidestilada <i>qsp</i>	800 ml
Homogeneizar e ajustar o pH para 7,4 com KOH 1N	
Água bidestilada <i>qsp</i>	1000 ml

Armazenar 4° C.

- **Tampão de inibidor de proteases ortovanadate sódica 200µM**

1 tablete CMR (Complete Mini Reagent)

Ortovanadate sódica 10mM	200µl
Solução Tris 50mM pH 7,4	10ml

Armazenar 4° C.

- **Tampão Laemmli**

Água bidestilada	3,8ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1,0ml
Glicerol	0,8ml
SDS 10% (p/v)	1,6ml
2-mercaptoetanol	0,4ml
Azul de bromofenol 1% (p/v)	0,4ml

Armazenar a – 20 °C.

4. RESULTADOS

4.1 *Peso corpóreo*

Todas as ratas pertencentes aos grupos 21 DPN (dias pós-natal), VF (vagina fechada) e VA (vagina aberta), foram pesadas imediatamente antes do sacrifício por decapitação.

Como pode ser visto na Tabela 2 e na Figura 11, embora pareadas quanto à idade e – sempre que possível também quanto à ninhada - as fêmeas do grupo com vagina aberta (VA - Média±DP; 103±9) pesavam mais do que aquelas com a vagina ainda fechada (VF; 92±15) como confirmado pelo teste de Wilcoxon Signed-Rank ($p<0,05$).

Somente duas ratas (de um total de doze) do grupo VA que possuíam a mesma idade, porém não pertenciam à mesma ninhada, apresentaram peso corpóreo inferior ao de suas respectivas controles (VF) pareados.

4.2 *Peso dos órgãos (ovários, útero e vagina)*

Depois do sacrifício, os ovários, o útero e a vagina de cada fêmea foram removidos e armazenados a temperaturas ultrabaixas (-80°C).

Como os ovários, úteros e vaginas não foram pesados logo após terem sido retirados, dispomos apenas do peso dos órgãos congelados.

As médias e os desvios-padrão dos pesos absolutos (mg) dos três órgãos analisados são mostrados na Figura 11.

Tabela 2: Peso corpóreo (g) das ratas sacrificadas aos 21 DPN, no dia da abertura da vagina (VA) e das fêmeas ainda com a vagina fechada (VF) pareadas quanto à idade com fêmeas do grupo VA.

21 DPN		VF				VA			
Animal	Peso	Animal	Peso	Idade	Ninhada	Animal	Peso	Idade	Ninhada
7	21	19	84	37	1B	13	100	37	1B
8	21	21	102	37	3B	15	107	37	3B
9	23	20	79	38	1B	14	105	38	1B
10	24	22	101	38	4B	16	106	38	4B
11	31	8	109	39	5	2	106	39	3
12	32	9	71	40	3	3	99	40	3
		10	88	40	6	4	96	40	6
		7	76	41	2	1	105	41	2
		12	96	41	3	6	91	41	5
		24	117	41	3B	18	122	41	3B
		23	107	41	4B	17	109	41	4B
		11	75	44	1	5	86	44	1
Média ± DP	25 ± 5		92 ± 15				103 ± 9^a		

a ≠ VF (p<0,05) teste de Wilcoxon Signed-rank

PESO CORPÓREO

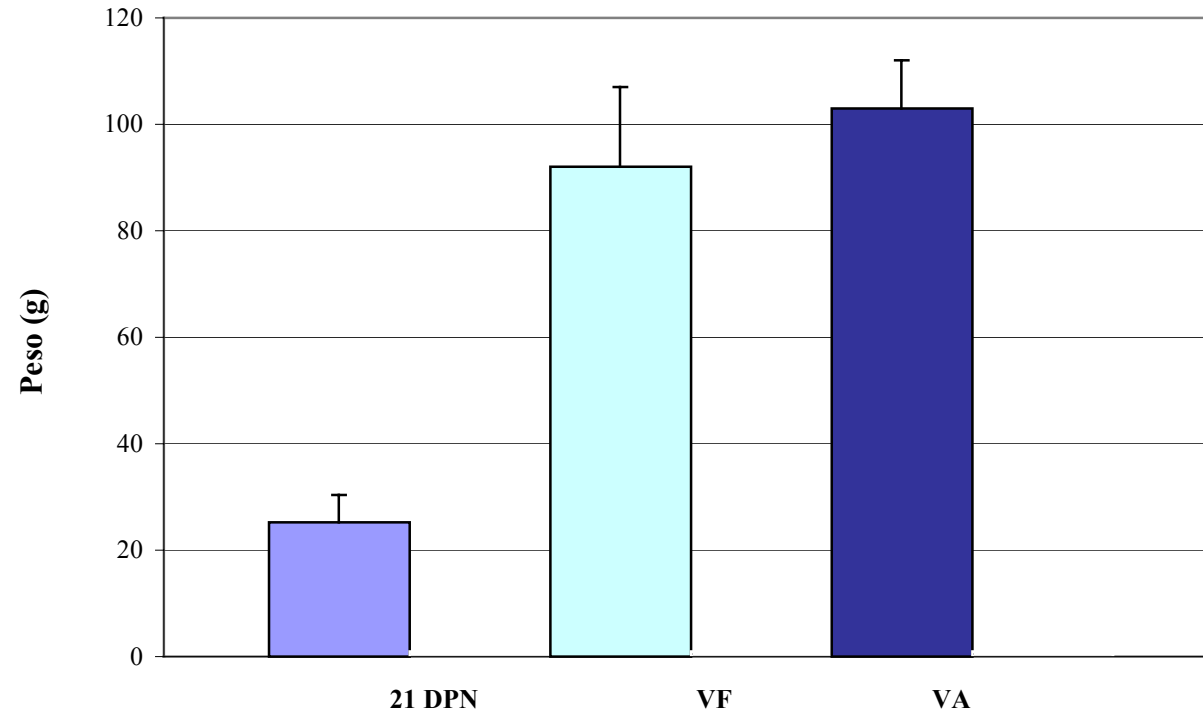


Figura 11: Média e desvio-padrão do peso corpóreo (g) de fêmeas sacrificadas em três momentos diferentes do desenvolvimento pós-natal: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da abertura da vagina (VA) e com a mesma idade do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

a ≠ VF (teste de Wilcoxon Signed-rank, $p < 0,05$)

PESO ABSOLUTO DOS ÓRGÃOS

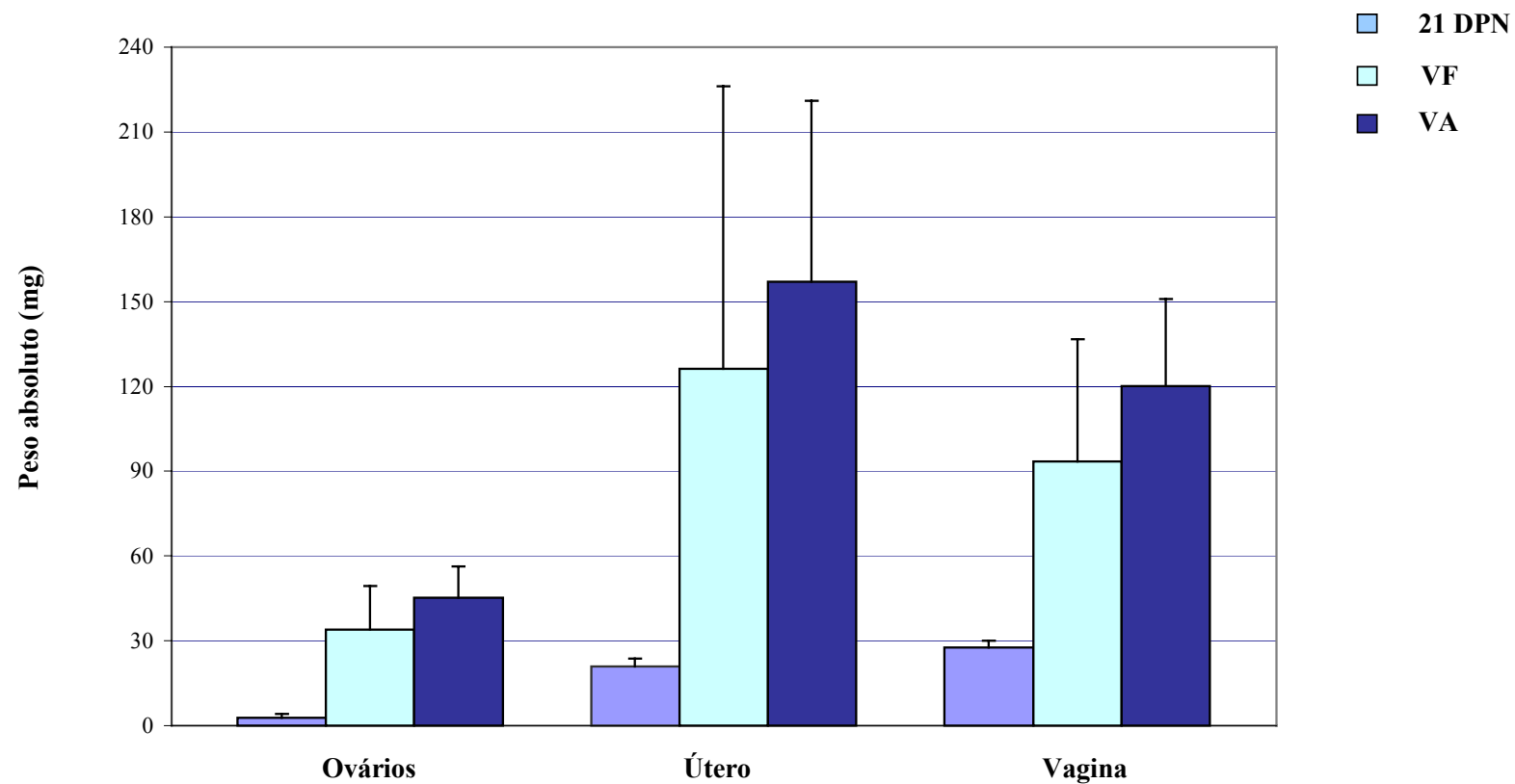


Figura 12: Média e desvio-padrão do peso absoluto (mg) do útero, vagina e ovários de fêmeas sacrificadas em três momentos diferentes do desenvolvimento pós-natal: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia de abertura da vagina (VA), com a mesma idade do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

4.2.1 Ovários

Os ovários direito e esquerdo foram pesados isoladamente, mas na Tabela 3 são apresentados os pesos absolutos (mg) e relativos (%) dos dois ovários somados.

Somente quatro animais do grupo VA apresentaram pesos absolutos dos ovários, menores do que os seus respectivos controles pareados (com a mesma idade e, quase sempre, mesma ninhada) do grupo VF. Esses mesmos animais também apresentaram pesos relativos menores que os animais correspondentes do grupo VF. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos ($p < 0,05$) VA e VF quanto ao peso absoluto dos ovários.

Como pode ser visto na Tabela 2, houve aumento no peso relativo dos ovários, com a idade, sendo o peso do grupo 21 DPN (Média \pm DP; $0,0110 \pm 0,0064$) menor que dos grupos VF ($0,0366 \pm 0,0149$) e VA ($0,0440 \pm 0,0095$).

Não houve entretanto diferença entre animais de mesma idade mas em situação diferente quanto à abertura de vagina (*i.e.*, VA *versus* VF). Somente houve diferença entre os grupos 21 DPN e VA (teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

4.2.2 Útero

A Tabela 4 mostra os pesos absolutos e relativos dos úteros das ratas dos grupos 21 DPN, VF e VA.

Somente cinco animais do grupo VA apresentaram pesos absolutos dos úteros, menores do que seus respectivos controles pareados (todos da mesma idade e da mesma ninhada) do grupo VF. Esses animais foram também os únicos que apresentaram peso relativo do útero inferior aos dos respectivos controles pareados do grupo VF. A ANOVA não mostrou diferença entre os pesos absolutos dos úteros dos grupos VF e VA ($p < 0,05$).

Como pode ser visto na Tabela 3, houve aumento do peso relativo dos úteros entre o dia 21 de vida pós-natal ($0,087 \pm 0,026$) e o dia de abertura da vagina, VF ($0,1385 \pm 0,1104$) e VA ($0,1528 \pm 0,0603$).

Não houve, entretanto diferença de peso relativo de útero entre animais de mesma idade com vagina aberta (VA) e vagina fechada (VF). Somente houve diferença entre os grupos 21 DPN e VA ($p < 0,05$).

4.2.3 Vagina

Como mostrado na Tabela 5, somente cinco ratas do grupo VA apresentaram peso absoluto da vagina, menor que seus respectivos controles pareados do grupo VF. Todos esses animais possuíam a mesma idade quando sacrificados e pertenciam à mesma ninhada, com uma única exceção, que apresentou peso absoluto pouco maior. Esses animais foram os que também apresentaram peso relativo inferior aos do grupo VF. A ANOVA não mostrou diferença entre os pesos absolutos das vaginas dos grupos VF e VA ($p < 0,05$).

Como poder ser visto na Tabela 4, não houve aumento no peso relativo das vaginas, entre o dia 21 de vida pós-natal ($0,114 \pm 0,029$) e o dia de abertura de vagina, VF ($0,1023 \pm 0,0479$) e VA ($0,1166 \pm 0,0268$). Também não houve diferença de peso relativo entre animais de mesma idade com a vagina aberta (VA) e fechada (VF).

Os animais do grupo VA que apresentaram peso relativo da vagina menor que o respectivo controle pareado do grupo VF, são os mesmos que apresentaram pesos relativos dos úteros menores que os controles do grupo VF.

Tabela 3: Pesos absolutos e relativos dos ovários direito e esquerdo de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

21 DPN				VF						VA					
Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)
7	4,5	0,0217	20,7	19	37,2	0,044	84	1B	37	13	34,4	0,0340	100	1B	37
8	3,2	0,0142	20,5	21	36,3	0,036	102	3B	37	15	51,6	0,048	107	3B	37
9	1,0	0,0049	22,5	20	30,5	0,039	79	1B	38	14	66,2	0,063	105	1B	38
10	1,7	0,0070	24,4	22	36,6	0,036	101	4B	38	16	62,4	0,059	106	4B	38
11	3,8	0,0121	31,3	8	26,6	0,024	109	5	39	2	47,3	0,045	106	3	39
12	1,9	0,0060	31,9	9	19,1	0,027	71	3	40	3	31,8	0,032	99	3	40
				10	29,7	0,034	88	6	40	4	37,8	0,039	96	6	40
				7	47,8	0,063	76	2	41	1	38,2	0,036	105	2	41
				12	18,2	0,019	96	3	41	6	37,8	0,042	91	5	41
				24	55,2	0,047	117	3B	41	18	44,8	0,037	122	3B	41
				23	61,6	0,058	107	4B	41	17	52,5	0,048	109	4B	41
				11	9,5	0,013	75	1	44	5	38,6	0,045	86	1	44
Média ± DP	2,7 ± 1,4	0,0110 ± 0,0064^b	25,2 ± 5,1		34,0±15,3	0,0366 ± 0,0149	92 ± 15				45,28 ± 11,01	0,0440 ± 0,0095	103 ± 9^a		

a≠VF (teste Wilcoxon Signed-rank); b≠VA (p<0,05) segundo teste de Kruskal Wallis, seguido de teste U de Mann-Whitney.

Tabela 4: Pesos absolutos e relativos dos úteros de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

21 DPN				VF						VA					
Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)
7	21,2	0,102	20,7	19	77,4	0,092	84	1B	37	13	152,5	0,153	100	1B	37
8	26,0	0,127	20,5	21	55,6	0,055	102	3B	37	15	176,1	0,165	107	3B	37
9	19,8	0,088	22,5	20	42,2	0,053	79	1B	38	14	153,0	0,1460	105	1B	38
10	21,4	0,088	24,4	22	203,9	0,202	101	4B	38	16	158,6	0,150	106	4B	38
11	19,5	0,062	31,3	8	36,8	0,034	109	5	39	2	109,5	0,103	106	3	39
12	17,9	0,056	31,9	9	48,5	0,068	71	3	40	3	299,3	0,302	99	3	40
				10	264,6	0,301	88	6	40	4	186,4	0,194	96	6	40
				7	203,9	0,268	76	2	41	1	80,5	0,077	105	2	41
				12	331,4	0,345	96	3	41	6	114,1	0,125	91	5	41
				24	83,8	0,072	117	3B	41	18	246,5	0,202	122	3B	41
				23	124,5	0,116	107	4B	41	17	103,0	0,094	109	4B	41
				11	41,5	0,055	75	1	44	5	106,0	0,123	86	1	44
Média±DP	21,0 ± 2,8^b	0,087 ± 0,026	25,2 ± 5,1		126,2 ± 100,3	0,1385 ± 0,1104	92 ± 15				157,1 ± 64,0	0,1528 ± 0,0603	103 ± 9^a		

a≠VF (teste Wilcoxon Signed-rank); b≠VA (p<0,05) segundo teste de Kruskal Wallis, seguido de teste U de Mann-Whitney.

Tabela 5: Pesos absolutos e relativos das vaginas de fêmeas em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: aos 21 dias de vida (21 DPN), no dia da detecção da abertura de vagina (VA) e animais com a mesma idade e, preferencialmente, da mesma ninhada dos animais do grupo VA, porém com a vagina ainda fechada (VF).

21 DPN				VF						VA					
Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)	Animal	Peso absoluto (mg)	Peso relativo (%)	Peso corpóreo (g)	Ninhada	Idade (dias)
7	31,2	0,151	20,7	19	71,9	0,086	84	1B	37	13	952,0	0,095	100	1B	37
8	29,9	0,146	20,5	21	57,7	0,057	102	3B	37	15	127,2	0,119	107	3B	37
9	26,2	0,116	22,5	20	40,0	0,051	79	1B	38	14	112,2	0,1070	105	1B	38
10	25,2	0,103	24,4	22	144,7	0,143	101	4B	38	16	114,1	0,108	106	4B	38
11	27,5	0,088	31,3	8	98,2	0,090	109	5	39	2	143,7	0,136	106	3	39
12	26,4	0,083	31,9	9	48,5	0,068	71	3	40	3	159,6	0,161	99	3	40
				10	142,9	0,162	88	6	40	4	145,9	0,152	96	6	40
				7	139,4	0,183	76	2	41	1	86,0	0,082	105	2	41
				12	156,5	0,163	96	3	41	6	111,3	0,122	91	5	41
				24	62,3	0,053	117	3B	41	18	172,7	0,142	122	3B	41
				23	106,1	0,099	107	4B	41	17	105,1	0,096	109	4B	41
				11	54,1	0,072	75	1	44	5	68,5	0,080	86	1	44
Média±DP	27,7 ± 2,3	0,114 ± 0,029	25,2 ± 5,1		93,5±43,1	0,1023 ± 0,0479	92 ± 15				120,1 ± 30,8	0,1166 ± 0,0268	103 ± 9^a		

a≠VF (teste Wilcoxon Signed-rank).

4.3 Expressão do receptor de estrogênio subtipo α (RE α) analisada por Western Blotting

A expressão do receptor de estrogênio α foi analisada semiquantitativamente em três tecidos de ratas Sprague-Dawley: ovário, vagina e útero. Para esta análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e “immunoblot” utilizamos anticorpos contra receptor de estrogênio- α de camundongos.

As membranas de nitrocelulose obtidas a partir das transferências dos géis, foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-receptor de estrogênio- α de camundongos, desenvolvido em coelho e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário anti IgG de coelho, conjugado a peroxidase. O substrato quimioluminescente foi colocado sobre as membranas protegidas da luz e estas, por sua vez, expostas a um filme sensível a raios-X revelado em aparelho apropriado. Após a revelação os grupos analisados mostraram três bandas imunorreativas de pesos moleculares aparentes diferentes: 64, 56 e/ou 42 kD.

As imagens fotográficas foram escaneadas e as densidades ópticas de cada banda, medidas, integrando-se a densidade correspondente a cada banda dividida pela integral da área determinada como o *background*.

A fim de facilitar a análise e visualização dos resultados, todos os valores, de DO registrados foram divididos por 10^5 . Os valores são apresentados em unidades arbitrárias de densidade óptica (UDO).

4.3.1 Ovários

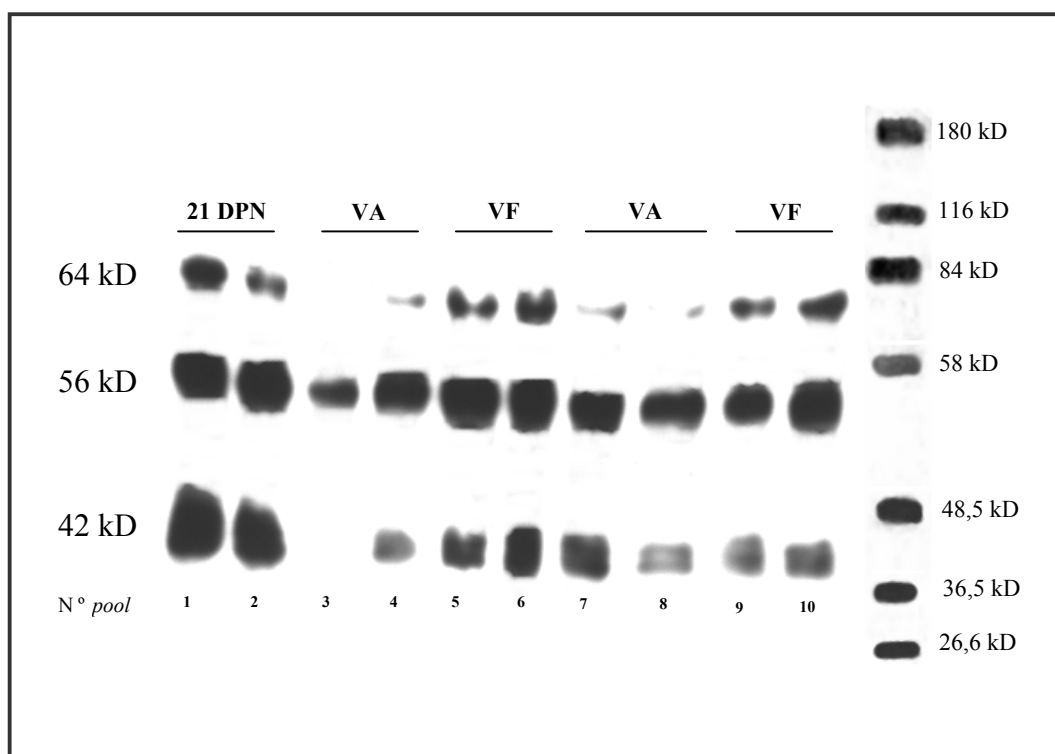
Devido ao tamanho reduzido dos ovários, principalmente do grupo 21 DPN, foram formados *pools* de três ovários (direito ou esquerdo, escolhido aleatoriamente) provenientes de diferentes fêmeas do mesmo grupo. No total foram obtidos dois *pools* do grupo 21 DPN (números 1 e 2) e quatro *pools* dos grupos VF (números 3, 4, 7 e 8) e VA (números 5, 6, 9 e 10).

Cada *pool* obtido foi analisado individualmente e teve sua concentração de proteína determinada. Foram pipetados 50 μ g de proteína, por canaleta do gel, de cada *pool*.

Após a revelação da imagem de raio-X referente aos *pools* de ovários dos grupos analisados, foram visualizadas três bandas imunorreativas de pesos moleculares aparentes: 64, 56 e/ou 42 kD (Figura 13).

A Tabela 6 mostra os valores arbitrários de densidade óptica obtidos de cada *pool*, assim como a média, o desvio-padrão (DP), a mediana e o primeiro e terceiro quartis de cada grupo.

Figura 13: Bandas imunorreativas ao RE α obtidas de *pools* de ovários de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal: 21 DPN, VF e VA.



Todas as bandas de pesos moleculares aparentes 64, 56 e 42 kD, obtidas em pools de ovários do grupo VA (Média±DP: 2,17±1,42, 39,23±11,00 e 11,49±10,03, respectivamente) apresentaram valores de densidade óptica inferiores àqueles obtidos em ovários de ratas do grupo VF (12,68±2,65, 48,27±9,52 e 19,38±6,97, respectivamente). O grupo VF, por sua vez apresentou valores arbitrários de DO inferiores aos obtidos pelo grupo 21 DPN para todas as três bandas (14,22±5,64, 53,68±2,74 e 45,07±6,85, respectivamente).

A Figura 14 mostra os valores dos *pools*, obtidos para cada animal de cada grupo, para as diferentes bandas visualizadas.

A banda de 64 kD do grupo VF foi claramente mais densa do que a banda correspondente do grupo VA (testes de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Tabela 6: Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, em *pools* de três ovários de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

	Nº <i>pool</i>	64 kD*	56 kD	42 kD
21 DPN	1	18,20	55,61	45,07
	2	10,23	51,74	35,38
Média		14,22	53,68	45,07
DP		5,64	2,74	6,85
VF	3	12,80	57,88	18,88
	4	15,11	49,51	29,17
	5	8,97	35,12	12,94
	6	13,84	50,55	16,53
Média		12,68^b	48,27	19,38
DP		2,65	9,52	6,97
Mediana		13,32	50,03	17,71
Q1-Q3		12,80-12,80	49,51-49,51	16,53-16,53
VA	7	0,57	24,76	0,00
	8	2,90	43,62	10,36
	9	3,74	50,74	24,47
	10	1,45	37,79	11,13
Média		2,17	39,23	11,49
DP		1,42	11,00	10,03
Mediana		2,18	40,71	10,75
Q1-Q3		2,90-1,45	37,79-37,79	10,36-10,36

b \neq VA (Kruskal Wallis seguido de U de Mann-Whitney)

* Os valores expressos em UDO (unidades arbitrárias de densidade óptica). A leitura original foi multiplicada por 10⁻⁵.
21 DPN - fêmeas sacrificadas aos 21 dias de vida; VA – fêmeas sacrificadas no dia da abertura de vagina; VF - fêmeas com a vagina ainda fechada, sacrificadas com a mesma idade em que ocorreu a abertura de vagina de outro animal com a mesma idade e da mesma ninhada.

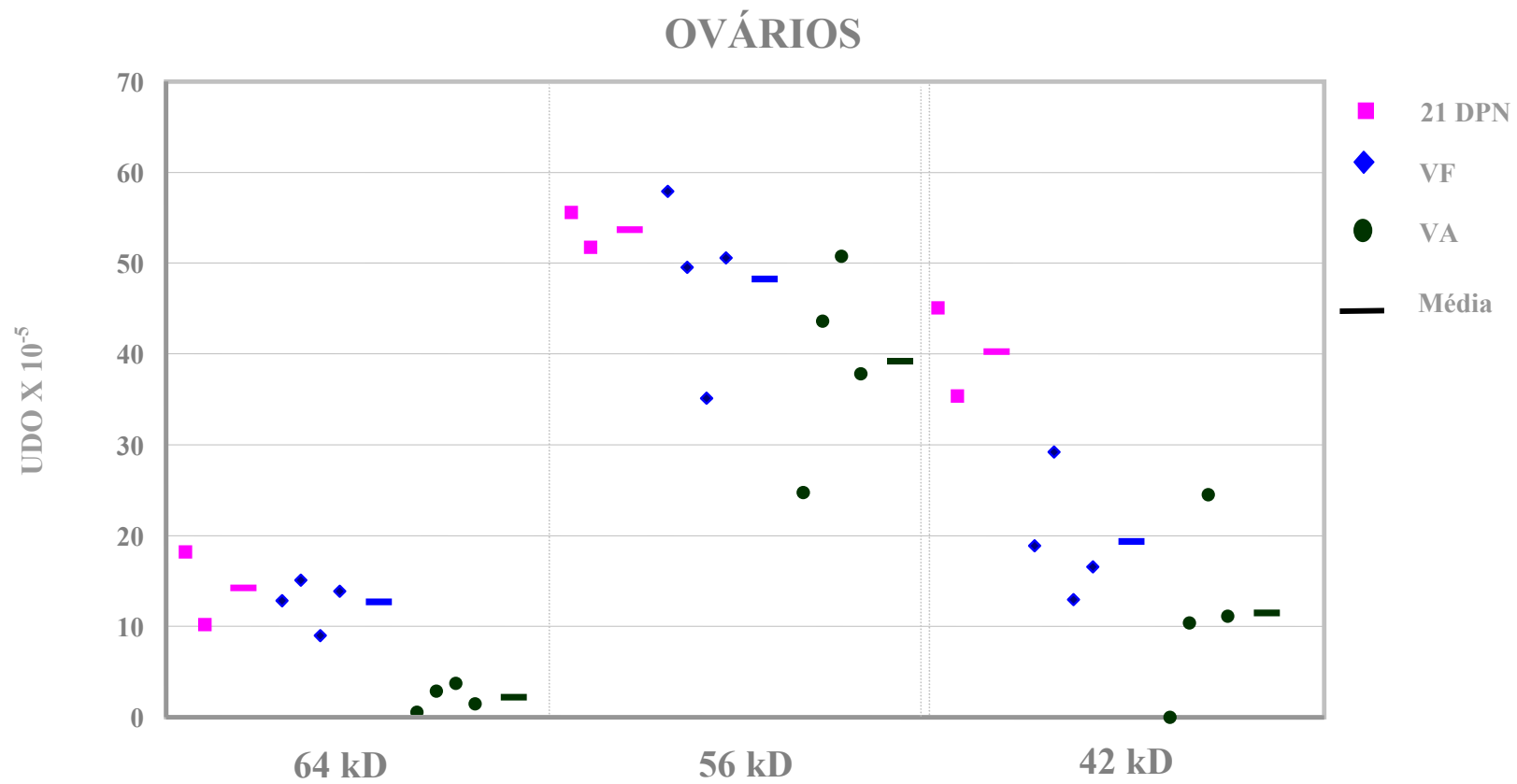


Figura 14: Valores individuais de ovários de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de “immunoblots”.

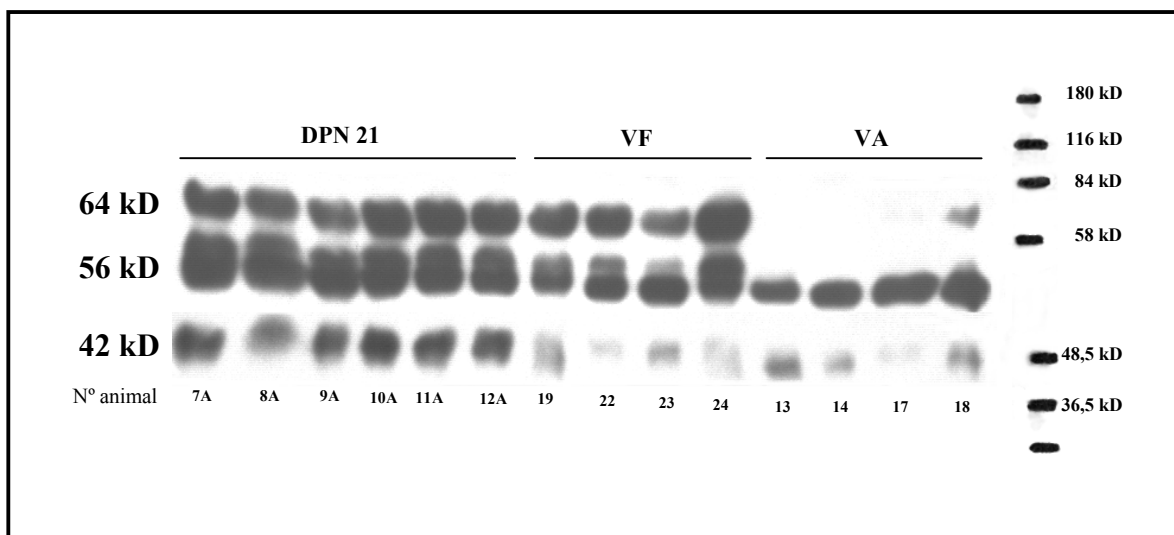
21 DPN - 21 dias pós-natal; VF - vagina fechada; VA - vagina aberta; UDO - unidades arbitrárias de densidade óptica (a leitura original foi dividida por 10⁵).

4.3.2 Útero

No caso dos úteros foram analisadas as amostras individuais de cada fêmea. Em cada canaleta do gel, foram pipetados 50 µg de proteína obtidas do útero de cada animal.

Após a revelação da imagem de raio-X referente aos úteros dos grupos analisados, três bandas imunorreativas de pesos moleculares aparentes: 64, 56 e/ou 42 kD, foram visualizadas. A [Figura 15](#) mostra os valores obtidos pelos animais do grupo 21 DPN (n=6), e por 4 animais dos grupo VF e VA, pertencentes a mesma ninhada, analisados em uma única corrida eletroforética.

[Figura 15](#): Bandas imunorreativas ao RE α obtidas de úteros de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: 21 DPN, VF e VA.



Na Tabela 7 são mostrados os valores de densidade óptica obtidos para os úteros de cada fêmea assim como a média, o desvio-padrão (DP), a mediana e o primeiro e terceiro quartis de cada grupo.

Todas as bandas de pesos moleculares aparentes 64 e 56 kD, obtidas para o grupo VA (Média±DP: 10,60±3,94 e 37,94±5,77, respectivamente) apresentaram valores de densidade óptica inferiores aos obtidos para o grupo VF (34,60±7,86 e 43,01±6,42, respectivamente). A banda de 42 kD apresentou uma densidade óptica pouco maior (7,56±3,74) que a apresentada pelo grupo VF (5,60±2,65).

O grupo VF por sua vez, apresentou valores de todas as três bandas (34,60±7,86, 43,01±6,42 e 5,60±2,65, respectivamente) inferiores aos obtidos pelo grupo 21 DPN (36,92±3,48, 58,89±6,12).

A Figura 16 mostra os valores individuais, obtidos por cada animal de cada grupo analisado distribuídos de acordo com as diferentes bandas obtidas.

A banda correspondente a 64 kD do grupo VA foi menos densa do que aquelas dos grupos VF e 21 DPN. A banda correspondente a 56 kD foi mais densa no grupo 21 DPN do que nos grupos VA e VF que, aparentemente, não diferiram entre si. A banda correspondente a 42 kD também foi mais densa no grupo 21 DPN do que nos grupos VA e VF que não diferiram entre si.

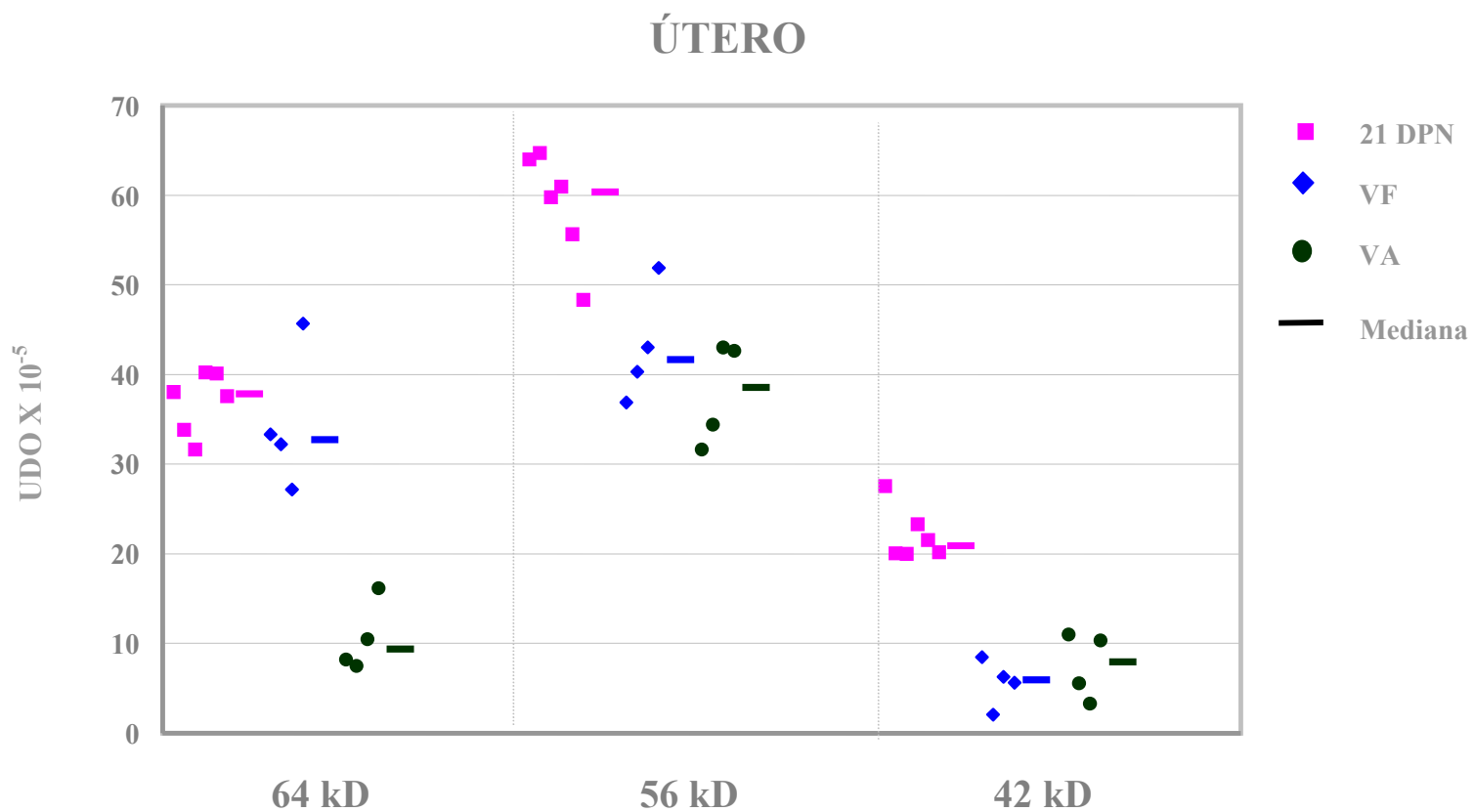


Figura 16: Valores individuais de úteros de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de “immunoblots”
 21 DPN - 21 dias pós-natal; VF - vagina fechada; VA - vagina aberta; UDO - unidades arbitrárias de densidade óptica (a leitura original foi dividida por 10⁵).

Tabela 7: Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, obtidos de úteros de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

Nº animal	Ninhada		64 kD[*]	56 kD	42 kD
21 DPN					
7A	ND		38,02	63,99	27,53
8A	ND		33,83	64,71	20,08
9A	ND		31,66	59,77	20,01
10A	ND		40,27	60,94	23,26
11A	ND		40,12	55,63	21,56
12A	ND		37,62	48,31	20,21
		Média	36,92^b	58,89^{a, b}	22,11^{a, b}
		DP	3,48	6,12	2,93
		Mediana	37,82	60,35	20,89
		Q1-Q3	37,62-37,62	59,77-59,77	20,21-20,21
VF					
Nº animal	Ninhada	Idade (dias)	64 kD	56 kD	42 kD
19	1B	37	33,31	36,86	8,47
22	4B	38	32,21	40,28	2,08
23	4B	41	27,20	43,03	6,26
24	3B	41	45,69	51,87	5,60
		Média	34,60^b	43,01	5,60
		DP	7,86	6,42	2,65
		Mediana	32,76	41,66	5,93
		Q1-Q3	32,21-32,21	40,28-40,28	5,60-5,60
VA					
Nº animal	Ninhada	Idade (dias)	64 kD	56 kD	42 kD
13	1B	37	8,20	31,66	11,03
14	1B	38	7,50	34,44	5,58
17	4B	41	10,50	43,04	3,28
18	3B	41	16,19	42,64	10,34
		Média	10,60	37,94	7,56
		DP	3,94	5,77	3,74
		Mediana	9,35	38,54	7,96
		Q1-Q3	8,20-8,20	34,44-34,44	5,58-5,58

^a ≠ VF; ^b ≠ VA (Kruskal Wallis seguido de U de Mann-Whitney)

* Os valores foram expressos em UDO (unidades arbitrárias de densidade óptica). A leitura original foi multiplicada por 10⁵.

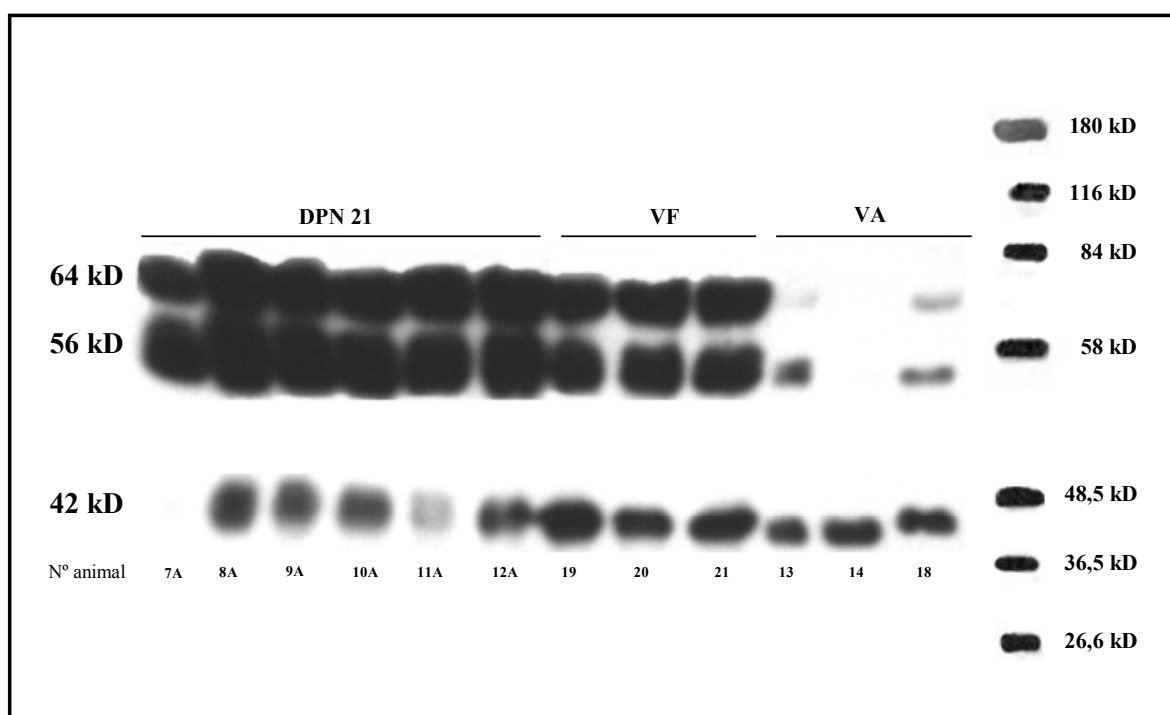
21 DPN - fêmeas sacrificadas aos 21 dias de vida; VA – fêmeas sacrificadas no dia da abertura de vagina; VF - fêmeas com a vagina ainda fechada, sacrificadas com a mesma idade em que ocorreu a abertura de vagina de outro animal da mesma ninhada.

4.3.3 Vagina

As vaginas também foram analisadas individualmente. Em cada canaleta do gel, foram pipetados 50 µg de proteína, de cada animal.

Após a revelação da imagem de raio-X referente as vaginas dos grupos analisados, três bandas imunorreativas de pesos moleculares aparentes: 64, 56 e/ou 42 kD, foram visualizadas. A [Figura 17](#) mostra os valores obtidos pelos animais do grupo 21 DPN (n=6), e por 3 animais dos grupo VF e VA, escolhidos aleatoriamente, analisados em uma única corrida eletroforética.

Figura 17: Bandas imunorreativas ao RE α mostradas pelas vaginas de ratas Sprague-Dawley em diferentes momentos do desenvolvimento sexual: 21 DPN, VF e VA.



Na Tabela 8 são mostrados os valores arbitrários de densidade óptica obtidos para cada vagina, assim como a média, o desvio-padrão (DP), a mediana e o primeiro e terceiro quartis de cada grupo.

Todas as bandas de pesos moleculares aparentes 64, 56 e 42 kD, mostradas pelo grupo VA (Média±DP: 3,35±1,69, 3,55±2,13 e 9,46±2,55, respectivamente) foram menos densas do que aquelas do grupo VF (36,49±0,47, 33,45±0,48 e 19,22±4,94 respectivamente).

As densidades das bandas 64 e 56 kD do grupo VF, por sua vez, foi inferior (36,49±0,47 e 33,45±0,48, respectivamente) aquelas obtidas para o grupo 21 DPN (42,01±6,43 e 54,16±7,35). A banda de 42 kD do grupo VF (19,22±4,94) foi mais densa do que a banda correspondente do grupo 21 DPN (5,73±4,73).

A Figura 18 mostra os valores individuais, obtidos para cada animal de cada grupo, para as diferentes bandas visualizadas.

Os valores de densidade foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. As bandas de 64 e 56 kD apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre os grupos 21 DPN e VA. Também ocorreu diferença nas bandas 56 e 42 kD, entre os grupos 21 DPN e VF.

A banda correspondente a 64 kD do grupo VA foi menos densa do que aquelas dos grupos VF e 21 DPN. A banda correspondente a 56 kD foi mais densa no grupo 21 DPN do que nos grupos VA e VF que, aparentemente, não diferiram entre si. A banda correspondente a 42 kD foi menos densa no grupo 21 DPN do que nos grupos VA e VF, este último, por sua vez, foi mais denso que o grupo VA.

Tabela 8: Análise semiquantitativa de *immunoblots* usando anticorpo contra RE α de camundongos, obtidos de vaginas de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

	Nº animal	Ninhada		64 kD*	56 kD	42 kD
21 DPN						
	7A	ND		28,96	45,64	0,00
	8A	ND		45,36	66,08	10,87
	9A	ND		44,65	58,85	6,21
	10A	ND		43,44	53,98	6,97
	11A	ND		44,33	49,12	0,16
	12A	ND		45,32	51,27	10,16
			Média	42,01^b	54,16^{a,b}	5,73^a
			DP	6,43	7,35	4,73
			Mediana	44,49	52,63	6,59
			Q1-Q3	44,33-44,33	51,27-51,27	6,21-6,21
VF						
	Nº animal	Ninhada	Idade (dias)	64 kD	56 kD	42 kD
	19	1B	37	36,00	33,72	24,03
	20	1B	38	36,93	33,74	14,17
	21	3B	37	36,55	32,90	19,47
			Média	36,49	33,45	19,22
			DP	0,47	0,48	4,94
			Mediana	36,55	33,72	19,47
			Q1-Q3	36,28-36,28	33,31-33,31	16,82-16,82
VA						
	Nº animal	Ninhada	Idade (dias)	64 kD	56 kD	42 kD
	13	1B	37	2,12	4,89	6,52
	14	1B	38	2,66	1,10	11,03
	18	3B	41	5,28	4,67	10,84
			Média	3,35	3,55	9,46
			DP	1,69	2,13	2,55
			Mediana	2,66	4,67	10,84
			Q1-Q3	2,39-2,83	2,89-2,89	8,68-8,68

a \neq VF; b \neq VA (Kruskal Wallis seguido de U de Mann-Whitney)

* Os valores foram expressos em UDO (unidades arbitrárias de densidade óptica). A leitura original foi multiplicada por 10⁻⁵.

21 DPN - fêmeas sacrificadas aos 21 dias de vida; VA – fêmeas sacrificadas no dia da abertura de vagina; VF - fêmeas com a vagina ainda fechada, sacrificadas com a mesma idade em que ocorreu a abertura de vagina de outro animal da mesma ninhada.

VAGINA

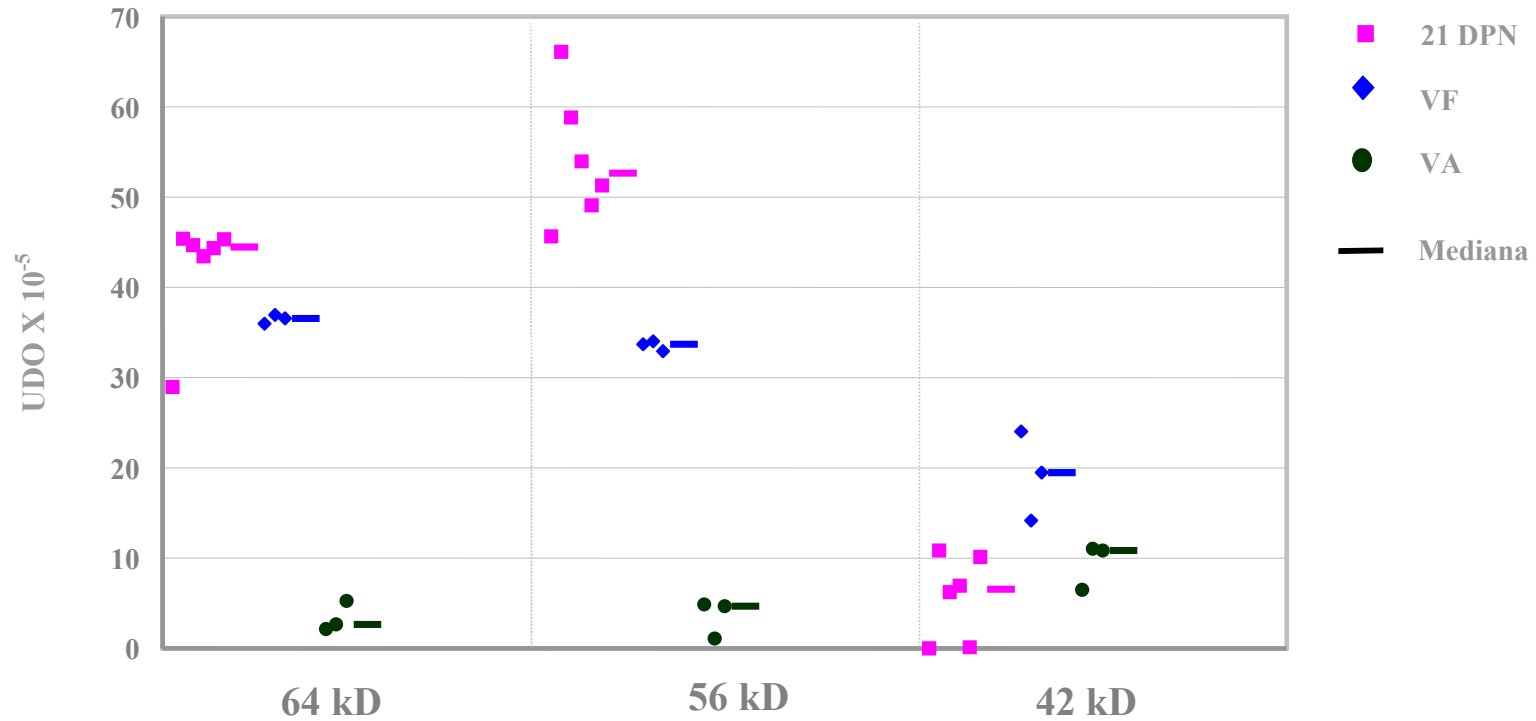


Figura 18: Valores individuais de vaginas de ratas Sprague-Dawley, sacrificadas em diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal, obtidos da análise semiquantitativa de “immunoblots”.

DPN 21 - 21 dias pós-natal; VF - vagina fechada; VA - vagina aberta; UDO - unidades arbitrárias de densidade óptica (a leitura original foi dividida por 10⁵).

5. DISCUSSÃO

5.1. Puberdade em ratas

5.1.1 Regulação da puberdade

A puberdade em ratas é determinada pela interação de vários processos neuroendócrinos, entre os quais está a secreção de gonadotropinas no eixo hipotalâmico-hipofisário, processo este mediado por neurotransmissores - *e.g.* catecolaminas, acetilcolina e GABA (ácido γ -aminobutírico). Fatores de crescimento como o TGF- β (fator de crescimento transformador) e o IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina) também parecem desempenhar um importante papel na determinação da puberdade (Goldman *et al*, 2000).

No período pré-puberdade o GABA inicialmente estimula a secreção de gonadotropinas, provavelmente por promover a secreção de GnRH. Entretanto, na semana que precede o início da puberdade, por volta do 30º dia de vida, o sinal enviado pelo GABA passa a ser inibitório (Goldman *et al*, 2000).

Os fatores de crescimento como o TGF- β e o IGF-I, entre outras ações, contribuem para a maturação folicular do ovário (Mayerhofer *et al*, 1997).

Outros eventos também podem influenciar o início da puberdade. Reduções no ganho de peso corpóreo durante o desenvolvimento pós-natal, por exemplo, podem retardar o início da puberdade (Goldman *et al*, 2000).

5.1.1.1 Relação entre peso corpóreo e puberdade

A relação entre início da puberdade e ganho de peso corpóreo foi relatada primeiramente na década de 50, quando Kennedy (1957) verificou que a época de abertura de vagina estava mais relacionada ao peso corpóreo do que à idade cronológica do indivíduo. Desde então vários estudos tentaram explicar essa relação (Kennedy & Mitra, 1963; Frisch *et al*, 1975; Frisch *et al*, 1977; Glass *et al*, 1979; Wilen & Naftolin, 1978). Mesmo chegando, algumas vezes, a resultados divergentes, todos os estudos concluíram que distúrbios metabólicos associados com perda de peso ou diminuição da

taxa de crescimento corpóreo são inibidores do sistema reprodutor, como pode ser visto na revisão de Steiner *et al*, 1983.

Ainda em 1963, Kennedy & Mitra formularam a hipótese de que sinais químicos derivados da atividade metabólica do organismo influenciavam o hipotálamo reprodutivo e contribuíam para a sua ativação durante a puberdade. Vários estudos subsequentes mostraram que algumas substâncias são capazes de alterar a liberação de LHRH de maneira direta ou indireta (Ojeda & Urbanski, 1994). A insulina, por exemplo, aumenta a ligação do estrogênio em certas áreas do cérebro (Sieger & Wade, 1979) e facilita a liberação de gonadotropina induzida pelo LHRH (Adashi *et al*, 1981). A deficiência de ácidos graxos durante o período pré-natal, pode retardar a abertura de vagina e a manifestação do primeiro estro (Smith White & Ojeda, 1983).

Recentemente, Zhang e colaboradores (1994) identificaram uma proteína constituída por 167 aminoácidos e secretada principalmente por adipócitos, que recebeu o nome de leptina. Essa proteína, responsável pela regulação do consumo de alimento e metabolismo e importante na prevenção da obesidade (Ahima *et al*, 1998), também parece estar associada à ocorrência da puberdade (Cunningham *et al*, 1999). A leptina estimula a secreção de gonadotropinas e parece atuar no controle por retroalimentação da síntese de esteróides.

A leptina atua no hipotálamo e possui ação anorexigênica (inibidora de apetite). Os receptores de leptina são encontrados em grande número no hipotálamo, mas também em outras regiões do sistema nervoso central (Elmqvist *et al*, 1998). Ela aparentemente informa o cérebro sobre a existência de reserva energética suficiente para promover os processos reprodutivos (Ahima *et al*, 1997).

Níveis baixos de leptina, em decorrência de deficiências nutricionais, levam a uma diminuição da produção de hormônios tireoideanos (diminuindo o metabolismo basal) e de hormônios sexuais (inibindo a reprodução), e também a um aumento de glicocorticóides (mobilizando as fontes produtoras de energia do organismo) (Nelson & Cox, 2000).

O aumento da concentração de leptina pode explicar a redução do consumo de alimento observado em animais expostos ao estradiol (Donohoe *et al*, 1984). Por outro lado, é conhecido que a ausência de estradiol circulante, decorrente de ovariectomia, estimula o apetite e o aumento de peso corpóreo (Goldman *et al*, 2000).

O ganho de peso corpóreo é considerado um desfecho importante na avaliação de efeitos adversos de xenobióticos, sendo um indicador sensível, mas pouco específico, de toxicidade sistêmica. Xenoestrógenos administrados logo após o desmame podem

antecipar a abertura de vagina e reduzir o peso corpóreo, como mostrado por Marty e colaboradores (1999). Nesse caso é possível que tenha havido um aumento de leptina decorrente da ação estrogênica, levando a uma diminuição do apetite e, conseqüentemente, a uma redução do peso corpóreo. O mesmo estudo mostrou ainda a situação inversa: o retardo da abertura de vagina e o aumento do peso corpóreo após tratamento com o inibidor de aromatase Fadrozola (que causa um bloqueio na produção de estradiol). Neste caso, portanto, a diminuição do peso corpóreo depois da administração de estrógenos, parece estar relacionada à desregulação endócrina.

O neuropeptídeo Y (NPY) possui ação orexigênica (estimulante de apetite) e sua produção é regulada pela leptina (Nelson & Cox, 2000). Esse peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos, também encontra-se envolvido na relação entre peso corpóreo e puberdade, estimulando a liberação de GnRH (Goldman *et al*, 2000)

5.1.2 Início da puberdade

Nas ratas, o início da puberdade pode ser definido como o período de transição entre a abertura de vagina e a primeira ovulação (Goldman *et al*, 2000).

A importância da abertura (ou canalização) da vagina, em estudos do sistema reprodutivo, deve-se ao fato deste ser o único sinal externo da ocorrência da puberdade em roedores. O pequeno orifício existente no canal vaginal só se torna patente a partir da estimulação estrogênica que marca o início da puberdade (Ojeda & Urbanski, 1994).

A abertura de vagina em ratas ocorre, na maioria dos casos, entre 30 e 37 dias de vida (Goldman *et al*, 2000), embora pequenas variações entre diferentes linhagens ou colônias não sejam incomuns (Rivest, 1991).

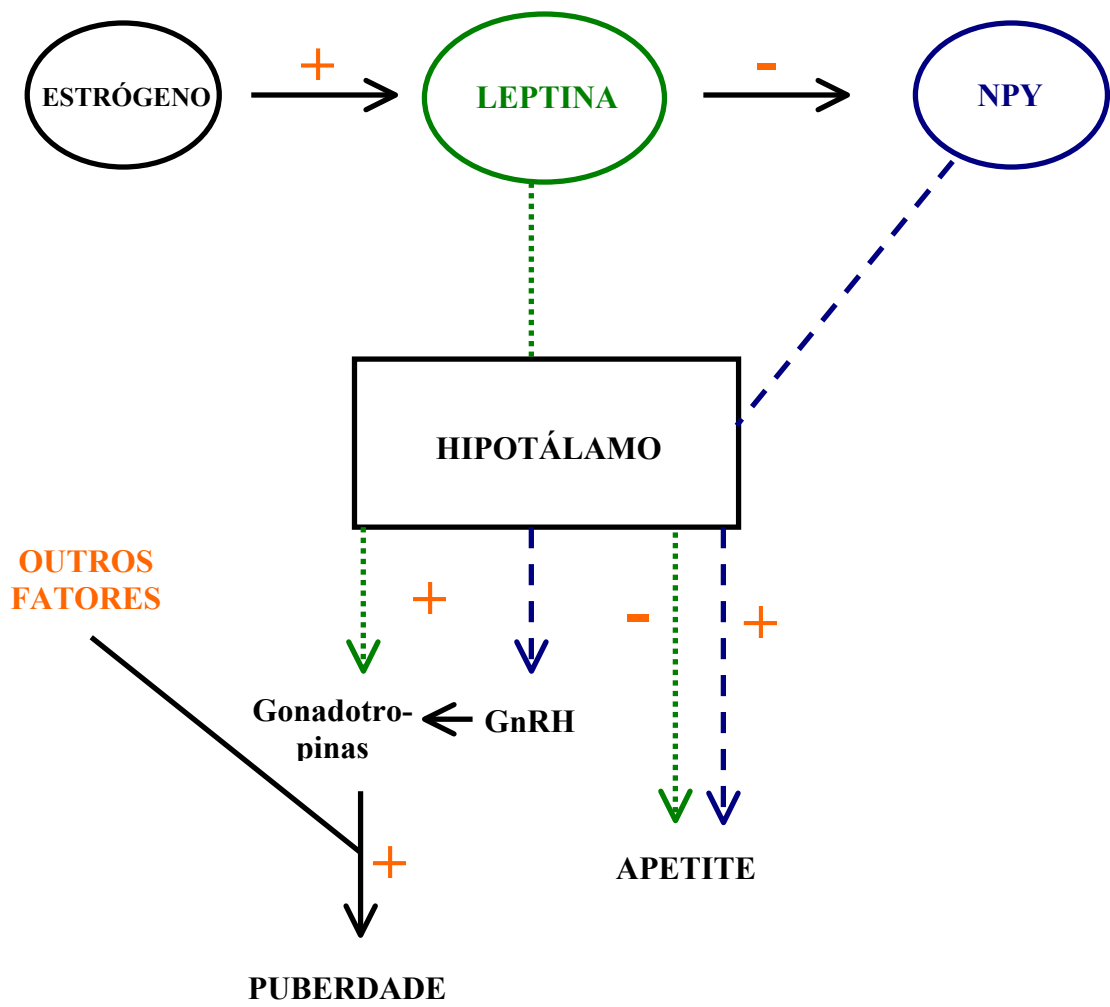


Figura 19: Papel da leptina e do neuropeptídeoY na puberdade

5.1.3 Peso corpóreo e abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley

Nossos dados mostraram que houve diferença ($p < 0,05$) de peso corpóreo entre os grupos VA e VF, (pareados quanto à idade e com idade média de 39 dias). Ou seja, ratas com a vagina aberta (VA), com a mesma idade e provenientes da mesma ninhada daquelas com a vagina fechada (VF), possuíam peso corpóreo maior.

Alguns autores também mostraram que a puberdade de ratas com restrição nutricional ocorre tardiamente (Wilén & Naftolin, 1978 e Holehan & Merry, 1985). Efeitos semelhantes como amenorréia e infertilidade também foram observados em mulheres com baixo peso corpóreo, devido à restrição calórica ou à atividades físicas intensas (Frisch *et al*, 1980; Bates *et al*, 1982 e Warren *et al*, 1999).

5.2 Expressão do RE α em ovários, útero e vagina de ratas Sprague-Dawley

5.2.1 Especificidade do anticorpo usado para evidenciar RE α

No nosso estudo, todas as membranas obtidas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelhos desenvolvido contra um peptídeo presente na extremidade C-terminal do receptor de estrogênio subtipo- α (RE α) de origem murina. A especificidade do anticorpo, segundo informações do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), abrange receptores de camundongo, ratos e humanos e não permite reação cruzada com o subtipo RE β .

Não houve expressão de bandas imunorreativas quando o anticorpo foi pré-incubado com o peptídeo correspondente à extremidade carbóxi terminal do RE α (ER α -peptide - MC-20 - sc-542P, Santa Cruz Biotechnology), confirmando que as bandas mostradas em todos os resultados obtidos são provenientes da expressão de RE α (dados não mostrados).

A β -actina é uma variante da actina presente em células não-musculares de seres humanos, ratos, camundongos, porcos, bovinos etc. Nós realizamos a análise densitométrica da banda imunorreativa ao anticorpo monoclonal anti- β -actina, proveniente de camundongos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre as quantidades de proteína inseridas nos poços do gel de empacotamento, correspondentes aos órgãos de cada animal (dados não mostrados).

5.2.2 Expressão das variantes de RE α

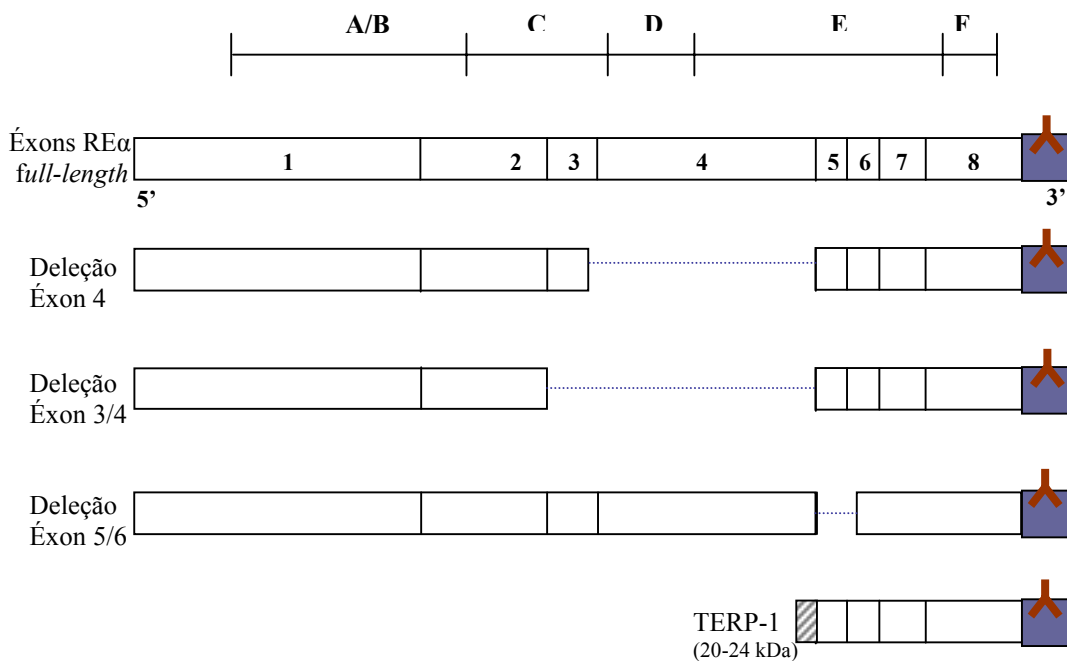
O RE α (*full-length*) apresenta peso molecular aproximado de 64 a 67 kD (Friend *et al*, 1997; Mitchner *et al*, 1998; Wu *et al*, 2000) e RNAm com 8 éxons (Friend *et al*, 1997).

Nossos resultados mostraram três bandas imunorreativas com pesos moleculares aproximados de 64, 56 e 42 kD, que provavelmente constituem variantes de RE α . Essas bandas foram detectadas em todos os órgãos analisados tanto nos animais sacrificados aos 21 dias de vida (21 DPN) quanto naqueles mortos no momento da abertura de vagina (VA e VF). Seguindo a nomenclatura comumente utilizada (*e.g.* Li *et al*, 2003) podemos nos referir da seguinte maneira às três variantes encontradas: RE64, RE56 e RE42. Estas correspondem, respectivamente, às bandas imunorreativas de pesos moleculares aparentes: 64, 56 e 42 kD.

A Tabela 9 mostra a diferença da expressão das três bandas imunorreativas encontradas nos órgãos analisados dos três grupos estudados.

A [Figura 20](#) mostra a representação esquemática *full-length* do RNAm do RE α e de 4 variantes segundo o estudo de Friend e colaboradores (1997). As três primeiras variantes mostradas se originaram de um *splicing* alternativo. Por outro lado, a TERP-1 representa um RNAm codificado a partir de um sítio de iniciação diferente do correspondente ao éxon 1. A deleção do éxon 4 também aparece em tecidos de ratos machos e fêmeas como útero, pituitária, fígado, coração, cérebro, hipotálamo, ovários e testículos. A deleção 5/6 aparece em todos os tecidos, mas em níveis baixos no hipotálamo, e a deleção 3/4 foi detectada em todos os órgãos com exceção do coração (Friend *et al*, 1997).

A [Figura 20](#) mostra ainda o mesmo anticorpo utilizado no nosso estudo ligado à extremidade C-terminal do receptor, o que explica como as variantes, com pesos moleculares menores que o do receptor *full-length*, foram detectadas nos vários tecidos.



[Figura 20](#): Variantes do RE α (modificado de Friend *et al*, 1997).

5.2.3 Expressão do RE α no período pré-puberdade

Nos ratos, os maiores picos de estradiol ocorrem por volta dos 21 dias de vida (Rodriguez *et al*, 1993 e Noda *et al*, 2002), quando tem início a secreção de andrógenos e a aromatização destes em estrógenos (ver [Figura 8](#)).

O pico de estradiol aos 21 dias de vida não desencadeia mudanças marcantes no desenvolvimento sexual, mesmo na presença de receptores específicos, já que durante esse período ainda existe alta concentração de α -fetoproteína (AFP) (Noda *et al*, 2002). A AFP, presente em ratos e humanos, se liga ao estrogênio, diminuindo a concentração do hormônio livre no plasma (Andrews & Ojeda, 1977 e Meijs-Roelofs & Kramer, 1979). O hormônio ligado à proteína não é ativo ao nível de receptores, sendo a fração livre que determina alguns eventos estrógeno-dependentes, como os efeitos promotores de câncer de mama (Bennett *et al*, 1998). Por outro lado, dois xenoestrógenos, o etinilestradiol e o DES possuem pouca afinidade de ligação com a AFP (cerca de 100 vezes menos quando comparados ao estradiol) (Klaassen, 2001).

5.2.4 Regulação da expressão do RE α pelos níveis de estradiol

É bem conhecido que os níveis de ligantes podem regular a expressão de seus receptores específicos. O aumento ou a diminuição da expressão dependerá do tecido e das condições fisiológicas (Mitchner *et al*, 1998). Em geral o aumento da concentração acarreta a diminuição da expressão dos receptores e vice-versa.

Há evidências de que esta regulação também ocorre com receptores de estrogênio.

A regulação do RE α no útero e na pituitária está relacionada a concentração de estradiol livre, como já foi descrito anteriormente por outros autores (Shupnik *et al*, 1989; Friend *et al*, 1995; Cotroneo *et al*, 2001).

Shupnik e colaboradores (1989) mostraram que, após a ovariectomia, os níveis de RNAm do RE α *full length* aumentaram no útero e diminuíram na pituitária.

O estudo de Friend e colaboradores (1995) com pituitárias de ratos CD1, evidenciou uma banda imunorreativa de 67 kD (equivalente a *full-length*) e ainda duas bandas de 59 e 37 kD. As expressões dessas duas últimas bandas diminuíram após tratamento com 17 β -estradiol.

Tabela 9: Diferenças da expressão do RE α em ovários, útero e vagina em três diferentes momentos do desenvolvimento pós-natal.

		RE64	RE56	RE42
VF em relação ao dia do desmame (21 DPN)	OVÁRIOS	ñ	ñ	ñ
	ÚTERO	ñ	↓	↓
	VAGINA	ñ	↓	↑
VA em relação ao dia do desmame (21 DPN)	OVÁRIOS	ñ	ñ	ñ
	ÚTERO	↓	↓	↓
	VAGINA	↓	↓	ñ
VA em comparação com VF de mesma idade	OVÁRIOS	↓	ñ	ñ
	ÚTERO	↓	ñ	ñ
	VAGINA	ñ	ñ	ñ

↑ ou ↓ - aumento ou diminuição, respectivamente, da expressão de RE α analisados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste *U* de Mann-Whitney ($p < 0,05$); ñ – não houve diferença.

A Tabela 9 mostra que em ovários e úteros ocorreu uma diminuição da expressão do RE α *full length* (RE64) nos animais do grupo VA em relação aqueles de mesma idade (VF) que ainda não haviam iniciado a puberdade. Esses resultados sugerem que ocorrem alterações da expressão de RE64 no início da puberdade. Não houve, entretanto, diferenças entre os grupos VF e VA quanto à expressão das duas variantes RE56 e RE42.

A diminuição da expressão de RE56 que ocorre em útero e vagina dos grupos VF e VA, quando comparados ao grupo 21 DPN, indica que a expressão dessa variante é maior aos 21 dias de vida (ver Tabelas 7 e 8). Além disso, a ausência de diferença entre os grupos VF e VA quanto à expressão de RE56, sugere que essa variante não está relacionada a alterações que ocorrem no início da puberdade.

O mesmo fato é observado quanto a variante RE 42 no útero, onde a expressão é maior no grupo 21 DPN. Em relação à esta variante também não ocorrem diferenças de expressão entre os grupos VF e VA.

A expressão do RE α *full-length* em ovários, observada nos grupos 21 DPN e VF no nosso estudo, é menor quando comparada ao útero e à vagina (ver Tabelas 6 a 8), como foi mostrado também por O'Brien *et al* (1999) e Byers *et al*, (1997).

Há poucos estudos anteriores ao nosso relatando a expressão das variantes RE56 e RE42 assim como suas funções e afinidades de ligação a xenoestrógenos.

Estudos utilizando outros métodos (*e.g.* RT-PCR) devem ser realizados a fim de identificar as variantes que encontramos, assim como os seus domínios estruturais e/ou éxons deletados, seja pela remoção errada de íntrons, ou existência de códon de iniciação alternativos. Dessa maneira seria possível identificar a capacidade de ligação ao DNA, a proteínas coreguladoras e também a xenoestrógenos, esclarecendo assim o papel desempenhado por elas no desenvolvimento sexual e possíveis interações com desreguladores endócrinos (DEs).

5.2.5 Expressão das variantes de RE α em outros estudos

O estudo de Friend e colaboradores (1997), utilizando um anticorpo específico para a extremidade C-terminal do RE α , mostrou bandas imunorreativas em úteros de ratas CD-1 adultas com pesos moleculares aparentes de 64-66, 50-55 e 40-45 kD (ver Tabela 10 para outros estudos). No mesmo estudo, usando RT-PCR, foram também identificadas variantes de RE α na pituitária. As variantes de RE α tem sido encontradas principalmente em células neoplásicas, porém as suas funções ainda não são bem conhecidas (Lemieux & Fuqua, 1996 e Pfeffer *et al*, 1996).

Tabela 10: Expressão das variantes do RE α em *immunoblots* de diferentes tecidos.

ESPÉCIE/ CEPA (idade)	TECIDO/TIPO CELULAR	VARIANTE	FONTE
Galinha	<ul style="list-style-type: none"> • Fígado • Células do oviducto 	<ul style="list-style-type: none"> • 61 kD • 66 kD 	Griffin <i>et al</i> , 2001.
Humana	<ul style="list-style-type: none"> • Células endoteliais 	<ul style="list-style-type: none"> • 66 kD e 46 kD 	Li <i>et al</i> , 2003.
Rato/Sprague-Dawley (7-8 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Pituitária e útero 	<ul style="list-style-type: none"> • 66 kD 	Mitchner <i>et al</i> , 1998.
Rato/Sprague-Dawley (adulto)	<ul style="list-style-type: none"> • Útero • Pituitária 	<ul style="list-style-type: none"> • 64-66 kD; 50-55 kD; 40-45 kD • 64-44 kD; 40-45 kD; 20-24 kD 	Friend <i>et al</i> , 1997.
Rato/Sprague-Dawley (4 meses)	<ul style="list-style-type: none"> • Vagina 	<ul style="list-style-type: none"> • 64, 56 e 42 kD 	Schönfelder <i>et al</i> , 2002.
Rato/Wistar (28 dias)	<ul style="list-style-type: none"> • Pituitária 	<ul style="list-style-type: none"> • 66 e 24 kD 	Tiffoche <i>et al</i> , 2001.
Rato/Wistar (8 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Pituitária e ovário 	<ul style="list-style-type: none"> • 66 kD 	Nishihara <i>et al</i> , 2000.
Rato/Sprague-Dawley (8-12 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Ovário e útero 	<ul style="list-style-type: none"> • 66 kD 	Hiroi <i>et al</i> , 1999.

A partir do período pré-puberdade os níveis de estradiol sérico aumentam e mantém-se elevados até o final da puberdade. Noda e colaboradores (2002) encontraram níveis de estradiol sérico elevados em ratas Sprague-Dawley, no mesmo período em que foi detectada a abertura de vagina (34 a 36 dias de vida) e níveis um pouco menores aos 30 dias. Entretanto, esses dois períodos apresentaram níveis de estradiol mais elevados que os encontrados aos 21 dias de vida (Figura 21).

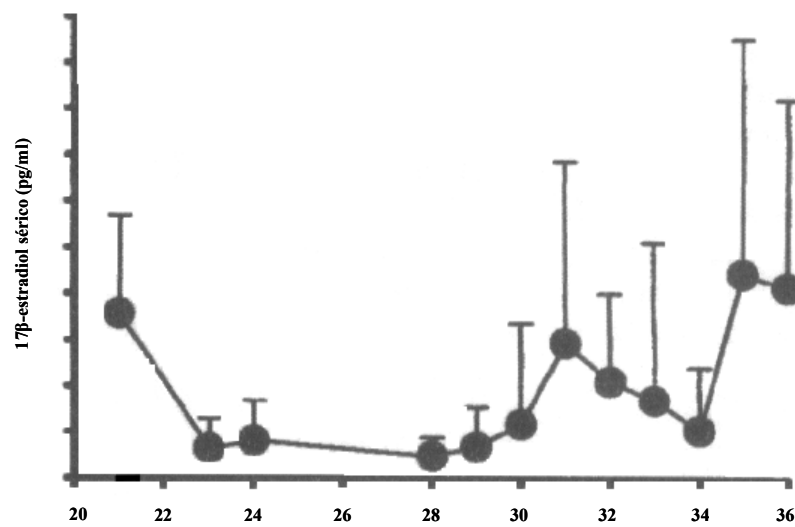


Figura 21: Níveis de estradiol sérico em ratas Sprague-Dawley (n=20).
(modificado de Noda *et al*, 2002).

O tratamento com estrógenos também pode promover a regulação da expressão de RE α . No estudo de Shupnik e colaboradores (1989) o tratamento com estrógenos levou a diminuição da expressão do receptor em úteros, porém ao aumento na pituitária.

Uma redução na expressão de RE α em úteros de ratos também foi encontrada após tratamento com estrógenos por outros autores (Manni *et al*, 1981; Kraus & Katzenellenbogen, 1993 ; Zhou *et al*, 1993 e Zhou *et al*, 1995).

Cotroneo e colaboradores (2001) mostraram que os grupos tratados com genesteína (um fitoestrógeno) e com benzoato de estradiol, apresentaram uma diminuição da expressão de RE α em útero, quando comparados ao grupo tratado com veículo. A diminuição da expressão, segundo o autor, poderia ocorrer devido à proteólise do receptor.

Um estudo *in vitro* (Alarid *et al*, 1999) mostrou uma *down-regulation* da expressão de RE α em resposta a estrógenos sem alteração do RNAm, *i.e.*, através de rápida proteólise, que pode ser um evento inicial na ação estrogênica.

Nossos resultados mostraram uma diminuição da expressão do RE α *full-length* (RE64) dos 21 dias de vida pós-natal até o momento em que a abertura de vagina foi detectada, em todos os órgãos analisados (Tabelas 6 a 8).

A diminuição da expressão do RE α *full-length* no período peri-puberdade (grupos VA e VF), em comparação com o grupo 21 DPN, pode ser explicada pela elevação dos níveis de estradiol livre que ocorre nesse período.

Os níveis de estradiol aos 21 dias de vida, apesar de elevados, não diminuem a expressão do RE, já que grande parte do hormônio encontra-se ligado a AFP, como vimos anteriormente.

No momento da abertura de vagina os níveis de estradiol encontram-se mais elevados que nos dias que a antecedem. Isso poderia explicar a diminuição da expressão do RE α *full-length* no grupo VA ao compararmos com o grupo VF.

Em nosso estudo encontramos algumas diferenças na expressão das variantes RE56 e RE42. Entretanto, devido à inexistência de estudos mais aprofundados, principalmente em ovários, útero e vagina, há dificuldade em estabelecer uma relação entre os níveis de estradiol e a expressão dessas variantes nos tecidos estudados.

5.2.6 Homologia interespecies

A grande homologia interespecífica de RE α (ratos e humanos principalmente) ressalta a importância dos estudos experimentais desse receptor em animais de laboratório.

O rato é um animal muito usado em estudos de desenvolvimento sexual, em virtude do rápido crescimento, reprodução frequente e sinais externos de maturação sexual facilmente detectáveis. Alguns dos mecanismos básicos que envolvem o processo de maturação sexual são preservados entre espécies, permitindo assim que resultados obtidos com ratos possam, - dentro de certos limites - ser extrapolados para humanos (Ojeda & Urbanski, 1994).

5.3 Expressão de variantes de RE α em tumores de mama em mulheres

O RE α humano (REh) é um fator de transcrição ativado por hormônio que desempenha um papel importante no crescimento e diferenciação de células responsivas a estrógenos, como visto anteriormente. Na ausência do ligante natural, o REh encontra-se associado a proteínas de choque térmico (HSP – heat shock proteins), como a HSP 90 (Beato, 1989).

O tamoxifeno, um antiestrogênio amplamente usado no tratamento de câncer de mama, se liga ao REh de maneira semelhante ao estrogênio. Entretanto, diferentemente do estrogênio, o tamoxifeno inibe a ativação transcripcional dos genes-alvo do REh, reprimindo assim o crescimento de células tumorais mamárias (Van Dijk *et al*, 2000).

Segundo estudos clínicos (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998), o tratamento de pacientes com tumores de mama REh positivo (*e.g.* detectado por imunohistoquímica) com tamoxifeno diminui a taxa de recorrência e aumenta a sobrevida. O maior problema, entretanto, se deve ao fato de que aproximadamente 40% das pacientes com tumores REh positivo não respondem ao tamoxifeno (Saez *et al*, 1989).

Algumas variantes de REh, identificadas em células de câncer de mama (Dowsett *et al*, 1997), tem sido associadas ao desenvolvimento dos tumores e à resistência ao tamoxifeno (Van Dijk *et al*, 2000). Poucos estudos descrevem de maneira completa a expressão destas variantes em células mamárias normais, o que permitiria entender melhor o papel delas na tumorigênese e resistência no tratamento.

O estudo de Van Dijk e colaboradores (2000) compara a expressão de REh em células de tumores de mama benignos (n=7), células normais (n=14) e células de carcinomas (n=41). A expressão do REh *full-length* é maior ($p < 0,0001$, teste de Mann-Whitney) nos dois primeiros grupos (células normais) do que em pacientes com câncer de mama. Estas, por sua vez, apresentam percentual de variantes com mutação do domínio de ligação ao DNA maior do que aquele de células saudáveis. Esses resultados sugerem ainda que a responsividade a estrógenos em células mamárias pode estar alterada durante a progressão do tumor.

5.4 RE γ

Alguns autores refutam a existência do subtipo RE γ e tentam explicar porque camundongos ERKO duplo, *i.e.* RE α e RE β negativo, apresentam ligação de estrogênio no cérebro, mesmo na ausência de REs funcionais (Shughrue *et al*, 2002). Esses autores sugeriram que essa ligação provinha de uma variante do RE α e que seria muito improvável a existência de um terceiro subtipo de RE.

Os estudos que mostram a presença desse receptor (RE γ), revelam que eles se encontram em órgãos não-reprodutivos, onde há também a expressão de RE α (Giguere *et al*, 1988; Heard *et al*, 2000; Hong *et al*, 1999 e Sladek *et al*, 1997).

Um estudo comparativo da expressão dos subtipos de REs (α , β e γ) em células neoplásicas mamárias foi realizado por Ariazi e colaboradores (2002). Os resultados mostraram que a expressão de RE γ é maior em células tumorais do que em células mamárias normais.

5.5 Importância toxicológica do estudo da expressão do RE α

Uma vez que o sistema endócrino controla inúmeros processos fisiológicos, a ocorrência de distúrbios em “janelas” críticas de sensibilidade, pode vir a promover ou ainda potencializar os efeitos adversos da exposição a substâncias químicas considerados como xenoestrógenos.

O estudo da expressão do RE α em momentos críticos do desenvolvimento permite direcionar as ações-alvo dos estrógenos. Dessa maneira seria possível aumentar a especificidade e os benefícios de tratamento terapêuticos com esses compostos e, por

outro lado, diminuir os efeitos indesejáveis de estrógenos ambientais e dos próprios medicamentos.

Recentemente tem sido reconhecida a importância de estudos focalizando as variantes de RE α . Esse interesse parece ter origem em grande parte na constatação da presença destas variantes, algumas vezes em quantidade maior que o próprio RE *full length*, em células tumorais. Essas variantes podem estar envolvidas no desenvolvimento de neoplasias, e também na resistência que alguns pacientes apresentem aos medicamentos antineoplásicos.

A avaliação da exposição, principalmente a que envolve a saúde humana deve focalizar grupos mais susceptíveis, em consequência do estilo (*e.g.* dieta) ou do estágio da vida (gestação, adolescência e senescência). Schardein (2000) disse que os xenoestrógenos são capazes de causar malformações específicas durante períodos críticos do desenvolvimento com duração relativamente curta

Como mostrado na Tabela 11 há estudos sugerindo que a administração do fitoestrógeno genesteína no início do período pré-natal confere uma proteção significativa contra câncer de mama induzido quimicamente na vida adulta (Fritz *et al*, 1998 e Lamartiniere *et al*, 1995). Por outro lado, outros estudos indicam que a administração de genesteína *in utero* aumenta significativamente a formação de tumores em fêmeas (Hilakivi-Clarke *et al*, 1999).

As funções fisiológicas e afinidades por xenoestrógenos das variantes de RE α encontradas nesse estudo, ainda não foram estudadas. Estudos complementares (*e.g.* RT-PCR) são necessários para melhor caracterizar estas variantes.

Tabela 11: Substâncias consideradas como xenoestrógenos.

SUBSTÂNCIA	EFEITO	ESPÉCIE	FONTE
Bisfenol A	↑ receptores de progesterona	Rato	Gould <i>et al</i> , 1998
Bisfenol A	↑ peso próstata e da capacidade de ligação do receptor de androgênio	Camundongo	Gupta, 2000
Coumestrol	Inibição da liberação de FSH	Camundongo	Smith <i>et al</i> , 1979
Coumestrol	Antecipação da AV e do primeiro estro	Rato	Whitten & Naftolin, 1992
Daidzeína	Inibição de enzimas metabolizantes	Rato	Baker, 1991
Daidzeína e/ou Genesteína	Presença no líquido amniótico no segundo trimestre de gravidez	Humano	Foster <i>et al</i> , 2002
DES	↑ risco de esterilidade e anormalidades no trato urogenital	Camundongo	Greco <i>et al</i> , 1993
DES	Antecipação de AV seguido de diestro (d12-d17) e estro regulares	Rato	Nass <i>et al</i> , 1984
DES (100ng/kg/dia)	↑ peso próstata e da capacidade de ligação do receptor de androgênio	Camundongo	Gupta, 2000
DES (200µg/kg/dia)	↓ peso próstata e da capacidade de ligação do receptor de androgênio	Camundongo	Gupta, 2000
Estradiol	Antecipação de AV	Rato	Ashby <i>et al</i> , 1997
Fadrozola	Atraso na AV, ↓ peso de útero	Rato	Marty <i>et al</i> , 1999
Genesteína	Inibição da liberação de FSH	Camundongo	Smith <i>et al</i> , 1979
Genesteína	↑ expressão de RE α em útero	Rato	Cotroneo <i>et al</i> , 2001
Genesteína (<i>in utero</i>)	↑ formação de tumores	Rato	Hilakivi-Clarke <i>et al</i> , 1999

(continuação da Tabela 11)

Genesteína (pré-natal)	Proteção contra câncer de mama (induzido por químicos)	Rato	Fritz <i>et al</i> , 1998 e Lamartiniere <i>et al</i> , 1995
Lindano	Atraso na AV	Rato	Cooper <i>et al</i> , 1989
Metoxiclor	Antecipação da AV somente na via oral	Rato	Odum <i>et al</i> , 1997
Quetoconazola	Atraso na AV, ↓ peso de úteros	Rato	Marty <i>et al</i> , 1999
Tamoxifeno	Aumento do peso do útero	Rato	Wakeling & Bowler, 1988

AV - abertura de vagina; ↑ - aumento ↓ - diminuição.

6. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados deste estudo mostraram que ocorre a diminuição da expressão de RE α *full length* (RE64) em ovários e útero no momento da abertura de vagina (grupos VF e VA). Assim, o início da puberdade é, de certa forma, marcado por esta redução do número de receptores nestes órgãos-alvo.
- 2) Foram identificadas variantes RE56 e RE42 em ovários, útero e vagina de ratas por ocasião do desmame (21 DPN) e da abertura de vagina.
- 3) Aparentemente não ocorrem alterações da expressão de variantes RE56 e RE42 nos três órgãos analisados, concomitantes à abertura de vagina.
- 4) Aos 21 dias de vida a expressão de RE 56 é maior do que a de RE64 no útero e vagina.
- 5) Os nossos resultados, mostrando uma diminuição da expressão do RE α *full length* (RE64), no grupo VA em relação ao grupo VF, poderiam ser explicadas pelo aumento dos níveis de estradiol livre que marcaria o início da puberdade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E. Y., HSUEH, A. J. W. & YEN, S. S. C., 1981. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 108: 1441-1449.

AHIMA, R. S.; DUSHAY, J.; FLIER, S. N.; PRABAKARAN, D. & FLIER, J. S., 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 391-395.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D. & FLIER, J. S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding: Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *The Journal of Clinical Investigation* 101: 1020-1027.

ALARID, E. T; BAKOPOULOS, N. & SOLODIN, N., 1999. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular Endocrinology* 13: 1522-1534.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D., 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Nova York: Garland Publishing.

ANDREWS, W. W. & OJEDA, S. R., 1977. On the feedback actions of estrogen on gonadotropin and prolactin release in infantile female rats. *Endocrinology* 101: 1517-1523.

ANDREWS, W. W. & OJEDA, S. R., 1981. A quantitative analysis of the maturation of steroid negative feedbacks controlling gonadotropin release in the female rat: the infantile-juvenile periods, transition from an androgenic control. *Endocrinology* 108: 1313-1320.

ANDREWS, W. W.; MIZEJEWSKI, G. J. & OJEDA, S. R., 1981. Development of estradiol positive feedback on LH release in the female rat: a quantitative study. *Endocrinology* 109:1401-1410.

ARIAZI, E. A.; CLARK, G. M. & MERTZ, J. E., 2002. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Research* 62(22): 6510-6518.

ASHBY, J.; ODUM, J. & FOSTER, J. R., 1997. Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25: 226-231.

BAKER, M. E., 1991. Origins of regulation of gene transcription by steroid, retinoid and thyroid hormones. In: *The New Biology of Steroid Hormones* (R. B. Hochberg & N. F. Naftolin, eds), pp. 187-202, Nova York: Raven Press.

BARRET-CONNOR, E. & BUSH, T. L., 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *Journal of the American Medical Association* 265: 1861-1867.

BATES, G. W.; BATES, S. R. & WHITWORTH, N. S., 1982. Reproductive failure in women who practice weight control. *Fertility and Sterility* 37: 373-378.

BEATO, M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.

BENNETT, J. A.; ZHU, S.; PAGANO-MIRARCHI, A.; KELLOM, T. A. & JACOBSON, H. I., 1998. Alpha-fetoprotein derived from a human hepatoma prevents growth of estrogen-dependent human breast cancer xenografts. *Clinical Cancer Research* 4: 2877-2884.

BLOM, M. J.; WASSINK, M. G.; KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H.; LAMBERT, J. G. D. & GOOS, H. J. T. H., 2001. Metabolism of estradiol, ethynilestradiol, and moxestrol in rat uterus, vagina, and aorta: influence of sex steroid treatment. *Drug Metabolism and Disposition* 29(1): 76-81.

BYERS, M.; KUIPER, G. G.; GUSTAFSSON, J. A. & PARK-SARGE, O. K., 1997. Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Molecular Endocrinology* 11: 172-182.

BYSKOV, A. G., 1974. Does the rat ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature* 252: 396-397.

CALLE, E. E.; MIRACLE-McMAHILL, H. L.; THUN, M. J. & HEATH, C. W., 1995. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* 87: 517-523.

CARSON, R. & SMITH, J., 1986. Development and steroidogenic activity of preantral follicles in the neonatal rat ovary. *Journal of Endocrinology* 110: 87-92.

CHAHOU, I. & KWASIGROCH, T. E., 1977. Controlled Breeding of Laboratory Animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J. and KWASIGROCH, T. E. (Editors), *Methods in Perinatal Toxicology*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 78-91.

COOPER, R. L.; CHADWICK, R. W.; REHNBERG, G. L.; GOLDMAN, J. M.; BOOTH, K. C.; HEIN, J. F. & McELROY, W. K., 1989. Effects of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat. *Toxicology and applied pharmacology* 99: 384-394.

COTRONEO, M. S.; WANG, J.; ELTOUM, I. A. & LAMARTINIERE, C. A., 2001. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 173: 135-145.

COWARD, P.; LEE, D.; HULL, M. V. & LEHMANN, J. M., 2001. 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 98 (15): 8880-8884.

CUNNINGHAM, M. J., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A., 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction* 60: 216-222.

DONOHUE, T. P.; STEVENS, R.; JOHNSON, N. J. & BARKER, S., 1984. Effects of stereoisomers of estradiol on food intake, body weight and hoarding behavior in female rats. *Physiology and Behavior* 32: 589-592.

DOWSETT, M.; DAFFADA, A.; CHAN, C. M. W. & JOHNSTON, S. R. D., 1997. Oestrogen receptor mutants and variants in breast cancer. *European Journal of Cancer* 33: 1177-1183.

DUNKEL, L.; TILLY, J. L.; SHIKONE, T.; NISHIMORI, K. & HSUEH, A. J., 1994. Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biology of Reproduction* 50: 940-948.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 351: 1451-1467, 1998.

ELMQUIST, J. K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. & SAPER, C. B., 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 395: 535-547.

FINK, G. & SMITH, G. C., 1971. Ultrastructural features of the developing hypothalamo-hypophysial axis in the rat. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopie Anatomie* 119: 208-226.

FOSTER, W. G.; CHAN, S.; PLATT, L. & HUGHES JR, C. L., 2002. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicology Letters* 129: 199-205.

FRIEND, K. E.; ANG, L. W. & SHUPNIK, M. A., 1995. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92: 4367-4371.

FRIEND, K. E.; RESNICK, E. M.; ANG, L. W. & SHUPNIK, M. A., 1997. Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 131: 147-155.

FRISCH, R. E.; HEGSTED, D. M. & YOSHINAGA, K., 1975. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 72: 4172-4176.

FRISCH, R. E.; HEGSTED, D. M. & YOSHINAGA, K., 1977. Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: Body water, protein and fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 74: 379-383.

FRISCH, R.; WYSHAK, G. & VINCENT, L., 1980. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *New England Journal of Medicine* 303: 17-19.

FRITZ, W. A.; COWARD, L.; WANG, J. & LAMARTINIERE, C. A., 1998. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19: 2151-2158.

GARCIA-SEGURA, L. M.; NAFTOLIN, F.; HUTCHISON, J. B.; AZEOITIA, I. & CHOWEN, J. A., 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Journal of Neurobiology* 40: 574-584.

GEORGE, F. W. & OJEDA, S. R., 1987. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 84: 5803-5807.

GIUSTI, R. M.; IWAMOTO, K. & HATCH, E., 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Annals of Internal Medicine* 122(10): 778-788.

GLASS, A. R.; DAHMS, W. T. & SWERDLOFF, R. S., 1979. Body fat at puberty in rats: Alteration by changes in diet. *Pediatric Research* 13: 7-9.

GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L. & KAVLOK, R. J., 2000. Endocrine-Disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Reviews in Toxicology* 30(2): 135-196.

GOULD, J. C.; LEONARD, L. S.; MANESS, S. C.; WAGNER, B. L.; CONNER, K.; ZACHAREWSKI, T.; SAFE, S.; McDONNELL, D. P. & GAIDO, K. W., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 142: 203-214.

GRECO, T. L.; DUELLO, T. M. & GORSKI, J., 1993. Estrogen receptors, estradiol and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocrine Reviews* 14: 59-71.

GRIFFIN, C.; FLOURIOT, G.; SHARP, P.; GREENE, G. & GANNON, F., 2001. Distribution analysis of the two chicken estrogen receptor-alpha isoforms and their transcripts in the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Biology of Reproduction* 65: 1156-1163.

GRUBER, D. M. & HUBER, J. C., 2001. Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy. *Maturitas* 37: 151-157.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHENEEBERGER, C. & HUBER, J. C., 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine* 346(5): 340-352.

GUPTA, C., 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Experimental Biology and Medicine* 224: 61-68.

GIGUERE, V.; YANG, N.; SEGUI, P. & EVANS, R. M., 1988. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331 (6151): 91-94.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E., 1997. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.

HEARD, D. J.; NORBY, P. L.; HOLLOWAY, J. & VISSING, H., 2000. Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Molecular Endocrinology* 14 (3): 382-392.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CHO, E., ONOJAFE, I.; RAYGADA, M. & CLARKE, R., 1999. Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. *Oncology Reports* 6: 1089-1095.

HIROI, H.; INOUE, S.; WATANABE, T.; GOTO, W.; ORIMO, A.; MOMOEDA, M.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y. & MURAMATSU, M., 1999. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* 22: 37-44.

HOLEHAN, A. M. & MERRY, B. J., 1985. The control of puberty in the dietary restricted female rat. *Mechanisms of Ageing Development* 32: 179-191.

HONG, H.; YANG, L. & STALLCUP, M. R., 1999. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 22618-22626.

HUTZ, R. J.; WAGNER, N.; KRAUSE, P.; FISHER, C.; SYED, N.; DIERSCHKE, D. J.; MONNIAUS, D. & TOMANEK, M., 1993. Localization of estrogen receptors in rhesus monkey ovary. *American Journal of Primatology* 31: 299-309.

KATSUNG, B. G., 1998. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DeROSA, D.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T. & TILSON, H. A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104(suppl 4): 715-740.

KRAUS, W.L.; KATZENELLENBOGEN, B. S., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 122(6): 2371-2379.

KAWAGOE, S. & HIROI, M., 1983. Maturation of negative and positive estrogen feedback in the prepubertal female rat. *Endocrinologia Japonica* 30: 435-441.

KENNEDY, G. C., 1957. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *Journal of Endocrinology*, 16: 9-17.

KENNEDY, G. C. & MITRA, J., 1963. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *Journal of Physiology*, 166: 408-418.

KIM, H. P.; LEE, J. Y.; JEONG, J. K.; BAE, S. W.; LEE, H. K. & JO, I., 1999. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 257-262.

KLAASSEN, C. D. (ed.), 2001. *Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons*. Estados Unidos da América: McGraw-Hill Companies.

KOIKE, S.; SAKAI, M. & MURAKAMI, M., 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Research* 15: 2499-2513.

KUIPER, G. G. J. M.; ENMARK, E.; PELTO-HNIKKO, M.; NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A., 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93: 5925-5930.

KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-870.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B. & GUSTAFSSON, J. A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LAMARTINIERE, C. A.; MOORE, J. B.; BROWN, N. M.; THOMPSON, R.; HARDIN, M. J. & BARNES, S., 1995. Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 16: 2833-2840.

LEMIEUX, P. & FUQUA, S., 1996. The role of the estrogen receptor in tumor progression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 56: 87-91.

LI, L.; HAYNES, M. P. & BENDER, J. R., 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 100(8): 4807-4812.

LIEHR, J. G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews* 21: 40-54.

MANNI, A.; BAKER, R.; ARAFAH, B. M. & PEARSON, O. H., 1981. Uterine oestrogen and progesterone receptors in the ovariectomized rat. *Journal of Endocrinology* 91: 281-287.

MARTY, M. S.; CRISSMAN, J. W. & CARNEY, E. W., 1999. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17β -estradiol, steroid synthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicological Sciences* 52: 269-277.

MAYERHOFER, A.; DISSEN, G. A.; COSTA, M. E. & OJEDA, S. R., 1997. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138: 3320-3329.

McGUIRE, W. L.; CHAMNESS, G. C.; & FUQUA, S. A. W., 1991. Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Molecular Endocrinology* 5: 1571-1577.

- MEIJS-ROELOFS, H. M. & KRAMER, P., 1979. Maturation of the inhibitory feedback action of oestrogen on follicle-stimulating hormone secretion in the immature female rat: a role for alpha-fetoprotein. *Journal of Endocrinology*. 81: 199-208.
- MEINHARDT, U. & MULLIS, P. E., 2002. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Hormone Research* 57(5-6):145-152.
- MIGLIACCIO, S.; DAVIS, V. L.; GIBSON, M. K.; GRAY, T. K. & KORACHI, K. S., 1992. Estrogens modulate the responsiveness of osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) stably transfected with estrogen receptor. *Endocrinology* 130: 2617-2624.
- MITCHNER, N. A.; GARLICK, C. & BEN-JONATHAN, N., 1998. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139(9): 3976-3983.
- MOSSELMAN, S.; POLMAN, J. & DIJKEMA, R., 1996. ER β : identification and characterization of a novel human oestrogen receptor. *FEBS Letters* 392: 49-53.
- NAFTOLIN, F.; GARCIA-SEGURA, L. M.; KEEFE, D.; LERANTH, C.; MACLUSKY, N. J. & BRAWER, J. R., 1990. Estrogen effects on the synapology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biology of Reproduction* 42: 21-28.
- NASS, T. E.; MATT, D. W.; JUDD, H. L. & LU, J. K. H., 1984. Prepubertal treatment with estrogen or testosterone precipitates the loss of regular estrous ciclicity and normal gonadotropin secretion in adult female rats. *Biology of Reproduction* 31: 723-731.
- NELSON, D. L. & COX, M. M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Nova York: Worth Publishers.
- NISHIHARA, E.; NAGAYAMA, Y.; INOUE, S.; HIROI, H.; MURAMATSU, M.; YAMASHITA, S. & KOJI, T., 2000. Ontogenic changes in the expression of estrogen receptor α and β in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology* 141 (2): 2615-2620.

NODA, S.; SAWAKI, M.; SHIRAISHI, K.; YAMASAKI, K. & YAMAGUCHI, R., 2002. Age-related changes of genital systems in the female Crj:CD[®] (SD) IGS rats during sexual maturation. *Journal of Veterinary Medical Science* 64(4): 315-319.

O'BRIEN, M. L.; YONGHO IN, K. P. & PARK-SARGE, O., 1999. Characterization of estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid and protein expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* 140(10): 4530-4541.

ODUM, J.; LEFEVRE, P. A.; TITTENSOR, S.; PATON, D.; ROUTLEDGE, E. J.; BERESFORD, N. A.; SUMPTER, J. P. & ASHBY, J., 1997. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonylphenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25: 176-188.

OJEDA, S. R. & URBANSKI, H. F., 1994. Puberty in the rat. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil & J. D. Neil, eds), pp 363-409, Nova York: Raven Press.

OSAWA, Y.; HIGASHIYAMA, T.; SHIMIZU, Y. & YARBOROUGH, C., 1993. Multiple functions of aromatase and the active site structure: aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44: 469-480

PETTERSSON, K.; GRANDIEN, K.; KUIPER, G. G. & GUSTAFSSON, J. A., 1997. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology* 11: 1486-1496.

PFEFFER, U.; FECARROTA, E.; ARENA, G.; FORLANI, A. & VIDALI, G., 1996. Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 56: 99-105.

RAO, B. R., 1998. Isolation and characterisation of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65: 3-41.

REVELLI, A.; MASSOBRIO, M. & TESARIK, J., 1998. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissue. *Endocrine Reviews* 19: 3-17.

RIVEST, R. W., 1991. Sexual maturation in female rats: Hereditary, developmental and environmental aspects. *Experientia* 47: 1027-1038.

RODRIGUEZ, P.; FERNÁNDEZ-GALAZ, C. & TEJERO, A., 1993. Controlled neonatal exposure to estrogens: a suitable tool for reproductive aging studies in the female rat. *Biology of Reproduction* 49: 387-392.

SAEZ, R. A.; MCGUIRE, W. L. & CLARK G. M., 1989. Prognostic factors in breast cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 5: 102-110.

SAUNDERS, P. T. K.; MAGUIRE, S. M.; GAUGHAN, J. & MILLAR, M. R., 1997. Expression of oestrogen receptor β (ER β) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. *Journal of Endocrinology* 154: R13-R16.

SCHARDEIN, J. L., 2000. *Chemically induced birth defects*. Nova York: Marcel Dekker.

SCHLEGEL, A.; WANG, C.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; PESTELL, R. G. & LISANTI, M. P., 1999. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER α . *The Journal of Biological Chemistry* 274: 33551-33556.

SCHMIDT, J. B.; BINDER, M.; DEMSCHIK, G.; BIEGLMAYER C. & REINER, A., 1996. Treatment of skin aging with tropical estrogens. *International Journal of Dermatology* 35: 669-674.

SCHÖNFELDER, G.; FLICK, B.; MAYR, E.; TALSNESS, C.; PAUL, M. & CHAHOUD, I., 2002. *In Utero* exposure to low doses of Bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* 4(2): 98-102.

SHUGHRUE, P. J.; ASKEW, G. R.; DELLOVADE, T. L. & MERCHENTHALER, I., 2002. Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain. *Endocrinology* 143(5): 1643-1650.

SHUPNIK, M. A.; GORDON, M. S. & CHIN, W. W., 1989. Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Molecular Endocrinology* 3: 660-665.

SIEGER, L. I. & WADE, G. N., 1979. Insulin withdrawal impairs sexual receptivity and retention of brain cell nuclear estrogen receptors in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 29: 200-206.

SLADEK, R.; BADER, J. A. & GIGUERE, V., 1997. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Molecular and Cellular Biology* 17 (9): 5400-5409.

SMITH, D. F. & TOFT, D. O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology* 7: 4-11.

SMITH, J. K.; JSAGUSCH, K. T., BRUNSWICK, L. F. L. & KELLY, R. W., 1979. Coumestans in lucerne and ovulation in ewes. *New Zealand Journal Agricultural Research* 22: 411.

SMITH WHITE, S. S. & OJEDA, S. R., 1983. Essential fatty acid deficiency delays the onset of puberty by inhibition of hypothalamic and ovarian function. *Neurosciences Abstracts* p. 1095

STEINER, R. A.; CAMERON, J. L.; McNEILL, T. H.; CLIFFTON, D. K. & BREMMER, W. J., 1983. Metabolic signals for the onset of puberty. In: *Neuroendocrine Aspects of Reproduction* (R. L. Norman, ed), pp. 183-228, New York, Academic Press.

SZABO, K. & CSANYI, K., 1982. The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in the rat. *Cell and Tissue Research* 224: 563-577.

TIFFOCHE, C.; VAILLANT, C.; SCHAUSI, D. & THIEULANT, M., 2001. Novel intronic promoter in the rat ER α gene responsible for the transient transcription of a variant receptor. *Endocrinology* 142(9): 4106-4119.

VAN DIJK, M. A. J.; HART, A. A. M. & VAN'T VEER, L. J., 2000. Differences in estrogen receptor α variant messenger RNAs between normal human breast tissue and primary breast carcinomas. *Cancer Research* 60: 530-533.

WAKELING, A. E. & BOWLER, J., 1988. Novel antioestrogens without partial agonist activity. *Journal of Steroid Biochemistry* 31: 645-653.

WARREN, M. P.; VOUSSOUGHIAN, F.; GEER, E. B.; HYLE, E. P.; ADBERG, C. L. & RAMOS, R. H., 1999. Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 873-877.

WEBB, P.; LOPEZ, G. N.; UHT, R. M. & KUSHNER, P. J., 1995. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* 9: 443-456.

WHITE, R. E.; DARKOW, D. J. & LANG, J. L., 1995. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research* 77: 936-942.

WHITTEN, P. L. & NAFTOLIN, F., 1992. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. *Steroids* 57: 56-61.

WILEN, R. & NAFTOLIN, F., 1978. Pubertal food intake and body length, weight, and composition in the feed-restricted female rat: Comparison with well fed animals. *Pediatric Research* 12: 263-267.

WU, J. J.; GEIMONEN, E. & ANDERSEN, J., 2000. Increased expression of estrogen receptor β in human uterine smooth muscle at term. *European Journal of Endocrinology* 142: 92-99.

WU, T-C. J.; WANG, L. & WAN, Y-J. Y., 1992. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Molecular Reproduction and Development* 33: 407-412.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

ZHOU, Y.; CHORICH, L. P.; MAHESH, V. B. & OGLE, T. F., 1993. Regulation of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid by estradiol and progesterone in rat uterus. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 46(6): 687-698.

ZHOU, Y.; SHUGRHUE, P. J. & DORSA, D. M., 1995. Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology* 61: 276-283.

ZHU, B.T. & LIEHR J.G., 1993. Inhibition of the catechol-O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by catecholamines: Implications for the mechanism of estrogen-induced carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304:248-256.