



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM EPITESTOSTERONA SOBRE
PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E RESPOSTA NÃO-
CLÁSSICA DOS ANDRÓGENOS EM RATOS WISTAR**

FERNANDA CARVALHO CAVALARI

Porto Alegre

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITOS DOS TRATAMENTO *IN VIVO* COM EPITESTOSTERONA SOBRE
PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E RESPOSTA NÃO-
CLÁSSICA DOS ANDRÓGENOS EM RATOS WISTAR**

FERNANDA CARVALHO CAVALARI

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa da Silveira Loss

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio grande do Sul como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2015

Ao meu amado filho Arthur Appel e ao Leonardo Appel.

**This day before dawn I ascended a hill and look'd at the crowded heaven, and I said
to my spirit. When we become the enfolders of those orbs, and the pleasure and
knowledge of every thing in them, shall we be fill'd and satisfied then? And my spirit
said. No, we but level that lift to pass and continue beyond.**

Walt Whitman

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora Eloisa da Silveira Loss, a quem admiro e respeito, agradeço pela amizade e pelos momentos de crescimento pessoal e intelectual.

Ao meu coorientador Luciano Stürmer de Fraga, agradeço pelos ensinamentos e pela dedicação que me permitiram a realização deste trabalho.

Ao professor Wassermann, por fornecer um conhecimento incomparável, o qual será transmitido ao longo das novas gerações que farão parte do laboratório.

Às professoras Maria Flávia Marques e Wania Partata por terem disponibilizado não só seus laboratórios, mas também colaboraram para solidificação dos resultados.

Ao aluno de Iniciação científica Tadeu Dourado e a Luciana Abreu pela amizade e inestimável ajuda em todas as circunstâncias.

Aos amigos e colegas de laboratório, Laura Ayres, Letícia Arruda, Luciana Abreu, Gustavo Escott, Alexandre Luz de Castro, Rafael Fabres, Clara Schneider e Natalia Morelo, aprendi muito com vocês e jamais os esquecerei.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e a CAPES pela oportunidade e bolsa concedida.

Aos professores do Programa de Fisiologia pelos ensinamentos e conhecimento científico proporcionado.

Aos meus amados pais e às minhas irmãs por tudo.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	9
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	11
<u>LISTA DE TABELAS</u>	13
<u>RESUMO</u>	14
<u>ABSTRACT</u>	15
<u>1. INTRODUÇÃO GERAL</u>	15
<u>1.1. TESTÍCULOS</u>	15
<u>1.2. CÉLULAS DE SERTOLI E SEU DESENVOLVIMENTO</u>	17
1.2.1. <u>FASE DE DESENVOLVIMENTO OU DIFERENCIAÇÃO</u>	17
1.2.1. <u>FASE ADULTA OU DE MATURAÇÃO</u>	17
<u>1.3. CONTROLE HORMONAL DAS CÉLULAS DE SERTOLI</u>	18
<u>1.4. EXPRESSÃO DO IAR NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u>	20
<u>1.5. TESTOSTERONA</u>	24
<u>1.6. MECANISMO DE AÇÃO PARA TESTOSTERONA</u>	25
1.6.1. <u>AÇÃO CLÁSSICA DA TESTOSTERONA</u>	25
1.6.1. <u>AÇÃO NÃO-CLÁSSICA DA TESTOSTERONA</u>	26
<u>1.7. TESTOSTERONA E RECEPTOR DE MEMBRANA PARA ANDRÓGENOS (MAR)</u> ..	28
<u>1.8. EPITESTOSTERONA</u>	29
<u>1.9. CETRORELIX</u>	33
<u>2. OBJETIVOS</u>	35
2.1. <u>OBJETIVO GERAL</u>	35
2.2. <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	35
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	36
<u>3.1. ANIMAIS E TRATAMENTO</u>	36
<u>3.2. ASPÉCTOS ÉTICOS</u>	39
<u>3.3. SOLUÇÕES</u>	39
3.3.1. <u>SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFISIOLOGIA</u>	39
3.3.2. <u>SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNOISTOQUÍMICA</u>	40
3.3.2. <u>SOLUÇÕES UTILIZADAS NO WESTERN BLOTTING</u>	41
<u>3.4. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS</u>	41
<u>4. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA</u>	44

4.1.	<u>QUANTIFICAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE AO IAR NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u>	46
5.	<u>TÉCNICA ELETROFISIOLÓGICA DE REGISTRO INTRACELULAR</u>	47
6.	<u>TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING</u>	49
6.1.	<u>HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO</u>	49
6.2.	<u>DOSAGEM DE PROTEÍNAS</u>	49
6.3.	<u>WESTERN BLOTTING</u>	50
7.	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	51
8.	<u>RESULTADOS</u>	52
8.1	<u>PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO</u>	52
8.1.1.	<u>PESO CORPORAL</u>	52
8.1.2.	<u>PESO DOS TESTÍCULOS</u>	53
8.1.3.	<u>DISTÂNCIA ANOGENITAL E ÍNDICE ANOGENITAL</u>	54
9.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO CONTROLE (CTRL)</u>	55
9.1.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO CASTRADO COM CETRORELIX (CET)</u>	56
9.2.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO CASTRADO COM CETRORELIX E REPOSIÇÃO DE TESTOSTERONA (CET+T)</u>	58
9.3.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO CASTRADO COM CETRORELIX E REPOSIÇÃO DE EPITESTOSTERONA (CET+EPIT)</u>	59
9.4.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO TRATADO COM EPITESTOSTERONA (EPIT)</u>	60
9.5.	<u>COMPARAÇÃO DA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS AOS 180S</u>	61
10.	<u>WESTERN BLOTTING</u>	62
10.1.	<u>ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE IAR E AKT EM TESTÍCULOS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS)</u>	62
11.	<u>IMUNO-HISTOQUÍMICA</u>	64
12.	<u>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</u>	66
13.	<u>CONCLUSÃO</u>	74
14.	<u>REFERÊNCIAS</u>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17 α -HSD: Enzima 17 α -hidroxiesteroide desidrogenase

3 β -HSD: Enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

4-dione: Androstenediona

5 α -dione: Androstanediona

AMH: Hormônio Anti-Mülleriano

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

Anti-iAR: Anticorpo anti-receptor intracelular de andrógenos

ARKO: camundongo *Knockout* para iAR

ATP: Adenosina Trifosfato

BHT: barreira hemato-testicular

Ca²⁺: Íon cálcio

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS

CREB: Proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc

DAB: Cromógeno diaminobenzidina

DAG: Distância Anogenital

DHEA: desidroepiandrosterona

DHT: Di-hidrotestosterona

Dpn: Dia pós-natal

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

EGTA: Ácido bis-(aminoetil) glicoléter-N,N',N'-tetracético

EpiT: Epiestosterona

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

FSHR: receptor de FSH

LH: Hormônio luteinizante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

GPCR: Receptor acoplado à proteína G

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HBSS: Solução salina balanceada de Hank's (*Hank's Buffer Salt Solucion*)

iAR: Receptor intracelular de androgênios

IgG: Imunoglobulina G

IP₃: Inositol-3,4,5-Trifosfato

K⁺: Íon potássio

K⁺_{ATP}: Canais de Potássio Sensíveis a ATP

KCl: Cloreto de Potássio

LH: Hormônio Luteinizante

M: Molar

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

mAR: Receptor de androgênios de membrana

PAP: Complexo peroxidase antiperoxidase

PBS: tampão fosfato salino

PBS-T: tampão fosfato salino acrescido de Triton

pH: Potencial Hidrogeniônico

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA: Proteína cinase A

PLC: Fosfolipase C

PTX: Toxina pertussis

SCARKO: camundongo *Knockout* para iAR nas células de Sertoli

T: Testosterona

V = voltagem (V- volts)

VDCC-L: Canais de Ca⁺² dependentes de voltagem do tipo L

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um corte transversal de epitélio seminífero.....	15
Figura 2 - Células de Sertoli como centro organizador da diferenciação dos testículos.....	16
Figura 3 - Resumo esquemático do impacto do iAR em células de Sertoli na espermatogênese.....	21
Figura 4- Expressão de iAR durante o desenvolvimento pós-natal em testículos de ratos.....	22
Figura 5 - Vias de síntese da Epitestosterona.....	30
Figura 6 – Vias metabólicas de formação dos andrógenos	31
Figura 7 - Esquema dos grupos dos animais tratados	38
Figura 8 - Estrutura molecular da (2-Hidroxiopropil)-β-cyclodextrina	41
Figura 9 - Estrutura molecular da Testosterona	42
Figura 10 - Estrutura molecular da epitestosterona.	42
Figura 11 -Estrutura molecular do Cetorelix	42
Figura 12 - Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos	48
Figura 13 - Variação (Δ) no peso corporal (em g) dos animais que submetidos aos diferentes tratamentos experimentais.	52
Figura 14 - Peso dos testículos (mg) dos animais submetidos ao diferentes tratamentos hormonais no ultimo dia de tratamento.....	53
Figura 15 - Variação das medidas da distância anogenital DAG no primeiro e último dia de tratamento	54
Figura 16 - Variação em AGI medida no primeiro e no último dia de tratamento. ...	55

Figura 17 - Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das SCs de ratos do grupo controle (CTRL).....	56
Figura 18 - Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das SC de ratos tratados com cetorelix (antagonista de GnRH)(CET).....	57
Figura 19 - Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das SC a partir de ratos tratados com antagonista do GnRH e testosterona (CET + T)	58
Figura 20- Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das SC a partir de ratos tratados com o antagonista de GnRH (cetorelix) e epitestosterona (CET+EpiT)..	59
Figura 21 - Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das SC de ratos tratados com epitestosterona (EpiT)..	60
Figura 22- Variação (Δ) do potencial de membrana das SC aos 180 segundos após a aplicação de testosterona (1 μM)..	61
Figura 23- Expressão da proteína iAR e da proteína Akt nos túbulos seminíferos dos animais dos diferentes grupos experimentais.	63
Figura 24- Fotomicrografias mostrando a imunorreatividade ao receptor intracelular de andrógenos (iAR) nos túbulos seminíferos dos animais dos diferentes grupos experimentais..	64
Figura 25. Valores da densidade óptica da imunoreatividade ao iAR nos núcleos das células de Sertoli dos diferentes grupos experimentais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema do método para escolha dos grupos e ordem dos animais tratados	38
Tabela 2 – Composição das soluções estoque e solução final utilizados na técnica de eletrofisiologia	40

RESUMO

O mecanismo não clássico de testosterona induz resposta celular rápida ao nível de membrana, enquanto que a ação clássica se dá pela ligação da testosterona ao seu receptor androgênico intracelular (iAR) que regula a expressão gênica. A Epitestosterona, o 17 α -epímero da testosterona, tem sido descrito como um anti-andrógeno, inibindo o efeito da testosterona ou diidrotestosterona sobre o iAR. No entanto, a epitestosterona apresenta um efeito não clássico similar ao da testosterona, despolarizando o potencial de membrana das células de Sertoli e induzindo a captação rápida de Ca²⁺ nos testículos. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do tratamento com epitestosterona e testosterona em animais castrados quimicamente com a utilização de um antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o cetorelix. Ratos imaturos, a partir do 7º dia de idade receberam durante 7 dias o tratamento pela via intraperitoneal de acordo com os seguintes grupos: Controle (apenas o veículo hidroxipropil-beta-ciclodextrina, castrados (Cetorelix (500 μ g/kg/dia)), castrados com reposição de testosterona (2,5mg/kg/dia) (Cetorelix+testosterona), castrados com reposição de epitestosterona (2,5mg/kg/dia) (cetorelix+epitestosterona) e epitestosterona. Foram observados os efeitos dos tratamentos em parâmetros de desenvolvimento sexual de ratos imaturos como: peso corporal, peso testicular e medida da distância anogenital (DAG). Também foram feitos registros eletrofisiológicos da ação no potencial de membrana da testosterona nos túbulos seminíferos de testículos de ratos de todos os tratamentos. Para a avaliação a imunorreatividade ao iAR foi utilizado o anticorpo primário anti-iAR do tipo policlonal na concentração 1:250. Para o controle-negativo da técnica cortes de todas os tratamentos incubados com PBS-T. Para expressão foi utilizado o anticorpo primário anti-iAR do tipo policlonal na concentração de 1:1000 realizada pela técnica de Western Blot. A castração química com cetorelix resultou na redução no peso dos testículos e da DAG. O tratamento com epitestosterona e testosterona restaurou tanto o peso testicular como a DAG. O efeito despolarizante em resposta à aplicação tópica da testosterona foi observado no grupo controle e no grupo de cetorelix. Além disso, o grupo castrado com cetorelix com reposição de epitestosterona impediu o efeito rápido da testosterona na despolarização da membrana celular. No grupo com reposição de testosterona, a resposta eletrofisiológica da testosterona na membrana também foi alterada. O tratamento com epitestosterona nos ratos castrados com cetorelix produziu diminuição da expressão do iAR. Foi observada redução da imunorreatividade do iAR nos animais tratados com epitestosterona. Pode-se concluir que a epitestosterona participa do desenvolvimento genital em ratos imaturos, ou seja, produziu recuperação de AGD de forma semelhante à testosterona. Este resultado sugere que ambos os hormônios atuam pela mesma via de desenvolvimento deste parâmetro, provavelmente através de um mecanismo não-clássico. Além disso, o tratamento com o antagonista de GnRH e reposição de epitestosterona suprimiu a resposta não clássica da testosterona, mudando o padrão de via de sinalização da testosterona nas células de Sertoli.

ABSTRACT

The non-classical mechanism of testosterone induces a rapid cellular response at the membrane level, while the classical action is through the binding to the intracellular androgenic receptor (iAR) and the regulation of gene expression. Epitestosterone, the 17 α -epimer of testosterone, has been described as an anti-androgen, inhibiting the testosterone or dihydrotestosterone effect on the iAR. However, epitestosterone presents a non-classical effect similar to testosterone, depolarizing the membrane potential of Sertoli cells and inducing rapid Ca²⁺ uptake in testes. The aim of this study was to observe the effect of the treatment with epitestosterone and testosterone in rats chemically castrated with a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cetrorelix. From pnd 7 to pnd 14, the rats were given daily intraperitoneal injections with (i) hormones solvent, (2-hydroxypropyl β -cyclodextrin) as the control group (CTRL); (ii) 500 μ g/kg/day of the GnRH antagonist cetrorelix as the cetrorelix group (CET); (iii) 500 μ g/kg/day of cetrorelix + 2.5 mg/kg/day of testosterone as the cetrorelix plus testosterone group (CET+T); (iv) 500 μ g/kg/day of cetrorelix + 2.5 mg/kg/day of epitestosterone as the cetrorelix plus epitestosterone group (CET+EpiT); and (v) 2.5 mg/kg of epitestosterone alone as the epitestosterone group (EpiT). The effect of different treatments were verified on the body and testicular weight and the anogenital distance (AGD). The potential and the membrane resistance of Sertoli cells were recorded by electrophysiological technique intracellular record. The electrophysiological effect of testosterone on membrane of Sertoli cells were evaluated in seminiferous tubules in testes from rats of the all experimental groups. For evaluating the immunoreactivity to the iAR we used the anti-iAR primary polyclonal antibody type in concentration 1: 250. For the negative control technique cuts all treatments incubated with PBS-T. For iAR expression we used the anti-iAR type polyclonal primary antibody at a concentration of 1: 1000 performed by the Western Blot technique.

The chemical castration induced a reduction in testicular weight and AGD. The treatment with both epitestosterone and testosterone restored the AGD and the testicular weight. The depolarizing effect in response to topical testosterone application was observed in the control group and in the GnRH antagonist cetrorelix group. Moreover, in the GnRH antagonist cetrorelix replaced with the epitestosterone group, testosterone was not capable of changing the membrane potential. In the group replaced with testosterone, the membrane response to testosterone was smaller also. The treatment with epitestosterone in castrated rats also reduced the expression of the iAR in testes. The immunoreaction of iAR was reduced in the animals treated with epitestosterone. In conclusion, the effect of epitestosterone on genital development in immature rats, namely recovering of AGD, was similar to testosterone. This result suggest that both hormones act through the same pathway on this development parameter, probably by a non-classical mechanism. Additionally, the treatment with the GnRH antagonist plus epitestosterone suppressed the non-classical testosterone response, changing the pattern of testosterone signaling pathway through a membrane mechanism in Sertoli cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TESTÍCULOS

O testículo é um órgão com funções distintas. Dentre essas funções, uma das principais é a espermatogênese, que compreende a produção de espermatozoides e a esteroidogênese, que compreende a produção de hormônios esteroides. Isso acontece por que o testículo é dividido em duas partes anatômicas e funcionais, o tecido intersticial, formado por células de Leydig que são as responsáveis pela produção dos esteroides, e os túbulos seminíferos, que contêm as células que dão origem aos espermatozoides (Fawcett, 1993).

Os túbulos seminíferos são constituídos por uma túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. Na túnica própria estão localizadas as células mióides e as peritubulares. Em um testículo adulto, a população de células que constituem os túbulos seminíferos pode ser dividida em uma população proliferativa e uma população com baixa proliferação, que possuem origens embriológicas diferentes. A população proliferativa é formada por células germinativas ou espermatogênicas e a população pouco proliferante é composta pelas células de Sertoli de origem somática (Fig. 1) (França & Russel, 1998; Johnson 2008).

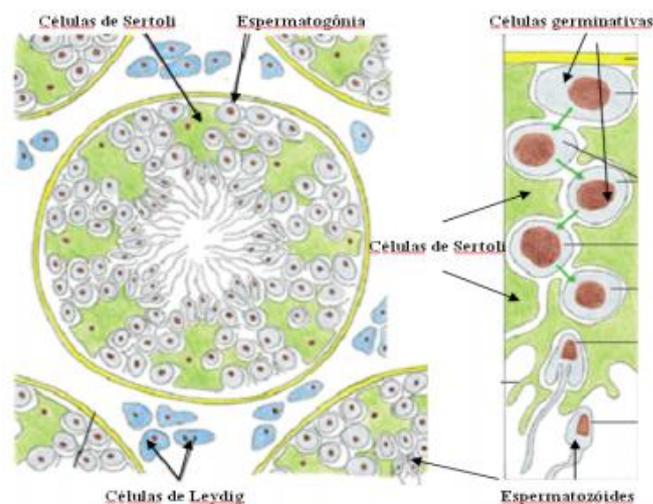


Figura 1. Representação esquemática de um corte transversal de epitélio seminífero, mostrando as células de Sertoli e as células germinativas. Adaptado de ALBERTS et. al., 1994.

1.2. CÉLULAS DE SERTOLI E SEU DESENVOLVIMENTO

As células de Sertoli expressam o fenótipo masculino (SRY), portanto desempenham um papel central na função do testículo. Estas são as primeiras células a se diferenciarem na vida fetal, onde elas atuam permitindo a formação dos cordões seminíferos e impedindo que as células germinativas entrem em meiose e se proliferem antes do tempo. Por meio da secreção de testosterona pelas células de Leydig, as células de Sertoli, que apresentam receptores para testosterona, desempenham um papel vital na masculinização do embrião e na descida dos testículos para o saco escrotal, além de assegurarem a regressão dos ductos de Müller pela secreção do hormônio anti-mülleriano (Fig. 2) (Mackay, 2000; Svingen & Koopman 2013). Depois que esses eventos ocorreram, o papel das células de Sertoli muda, e na puberdade elas ficam totalmente comprometidas em dar suporte à espermatogênese. São as células de Sertoli que dão o suporte físico e metabólico para que as células germinativas se diferenciem e se transformem em espermatozoides. Devido ao fato das células de Sertoli sustentarem as células germinativas, embora que em número fixo, podemos dizer que o número de células de Sertoli do testículo adulto determina tanto o tamanho do testículo como a produção diária de espermatozoides, influenciando, portanto, na fertilidade (Orth et al., 1988; Sharpe, 1994; Rato et al., 2012).

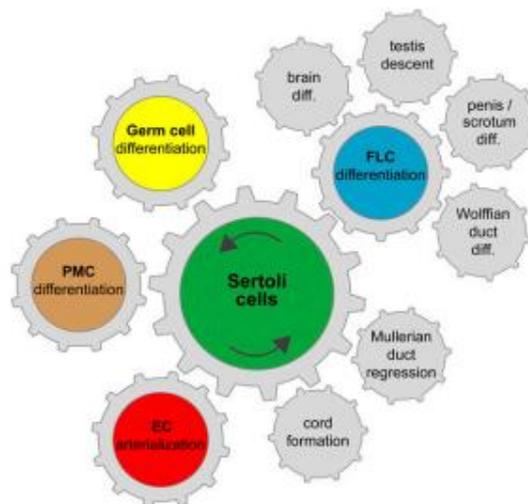


Figura 2. Células de Sertoli como centro organizador da diferenciação dos testículos. São as primeiras células a se diferenciar na gônada XY. Desempenham ação na organogênese testicular, por influenciar na formação dos cordões seminíferos, regressão dos ductos de Müller, diferenciação das células germinativas, células mióides peritubulares (PMCs) e células de Leydig fetais (FLCs) responsáveis pela masculinização do embrião. Svingen & Koopman P. 2013.

Fica claro que a função das células de Sertoli é totalmente diferente da vida fetal para a vida adulta. Podemos dizer que na vida fetal essas células estão em um processo de diferenciação para a forma adulta. Na vida adulta dizemos que estas células estão em um processo de maturação, no qual perdem a sua capacidade proliferativa (Sharpe et al., 2003).

1.2. CÉLULAS DE SERTOLI E SEU DESENVOLVIMENTO

1.2.1. FASE DE DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem no testículo por expressarem o gene SRY. Estas células também são responsáveis pela determinação do sexo masculino pela produção do homônio anti-Mülleriano que é capaz de promover a regressão dos ductos de Müller. Nesta fase, as células de Sertoli se comunicam com as células germinativas via fator neural de adesão celular (NCAM), o que culmina na formação dos cordões testiculares, evento que antecede e propicia o início da espermatogênese (Orth et. al., 1995; Pellinieme et. al., 1993).

1.2.2. FASE ADULTA OU DE MATURAÇÃO

Nesta fase, as células de Sertoli apresentam compartimentos bem definidos no epitélio seminífero, que podem ser divididos em compartimento basal e compartimento adluminal. O compartimento basal é o local onde se encontram as espermatogônias e os espermatócitos primários no início da prófase meiótica. O compartimento adluminal é o local onde os espermatócitos estão em fases mais adiantadas (primários e

secundários), além de conter as espermatídes arredondadas e alongadas (Sharpe et. Al., 1994). A formação desses compartimentos acontece porque nesta fase as células de Sertoli apresentam grandes modificações morfológicas e funcionais. A organização adjacente das células de Sertoli permite a formação das *tight junctions* nas porções basolaterais, as quais são as responsáveis pela compartimentalização do epitélio seminífero e pela formação da barreira hemato-testicular. A barreira hemato-testicular propicia um microambiente isolado e imunologicamente privilegiado, característica crucial para o desenvolvimento da espermatogênese (Russel et. al., 1990; Russel e Griswold, 1993; Cheng & Mruk, 2002).

1.3. CONTROLE HORMONAL DA CÉLULA DE SERTOLI

As células de Sertoli são controladas principalmente por dois hormônios, o hormônio folículo estimulante (FSH) e a testosterona. O FSH é uma gonadotrofina sintetizada e secretada pela hipófise anterior e a testosterona secretada das células de Leydig em resposta ao hormônio luteinizante (LH), outra gonadotrofina hipofisária. As gonadotrofinas estão envolvidas no controle hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, permitindo às gônadas a promoção de duas funções importantes, a espermatogênese e a esteroidogênese. A secreção de FSH e LH, por sua vez, dependem do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LHRH) sintetizado e secretado pelos neurônios hipotalâmicos presentes no núcleo arqueado do hipotálamo. O GnRH é um decapeptídeo que possui duas isoformas diferentes nos mamíferos, o GnRH-I e o GnRH-II. O GnRH-I tem função de controlar a secreção das gonadotrofinas enquanto o GnRH-II participa no comportamento sexual. Em humanos, o gene para o tipo II é silenciado (Counis et al, 2005, Millar, 2005).

Em condições fisiológicas o GnRH, devido a sua rápida degradação proteolítica no sangue, está presente localmente principalmente na circulação hipotálamo-hipofisário, enquanto na circulação sistêmica a presença de GnRH é baixíssima ou nula, porém foi descrita a presença de GnRH em ovário (7pg/g) (Millar 2005). No hipotálamo, a concentração de GnRH é de 1300 pg/g, enquanto na hipófise de apenas 3 pg/g. No entanto, os receptores para GnRH são expressos em testículo, fígado, coração, músculos

esqueléticos, rins, células do sistema linfático e em uma variedade de células tumorais. Acredita-se que a ação do GnRH em tecidos extra-hipofisários tenha efeito de prevenção do crescimento descontrolado das células que possuem esse receptor (Millar 2005; Kakar & Jennes 1995; Jacobson et al., 1998; Cheng et al., 2005; Ortmann & Diedrich 1999; Palyi et al, 1999).

A secreção do GnRH do hipotálamo ocorre de forma pulsátil, com a amplitude e a frequência regulando a liberação de LH e FSH. O padrão de pulsatilidade pode variar de acordo com as mudanças que ocorrem durante a vida reprodutiva, mas a pulsatilidade é importante, pois é uma forma de evitar a dessensibilização dos receptores de LH e FSH em células alvo (Thackray et al., 2010; Levine et al, 2003).

A pulsatilidade da secreção de GnRH também é regulada por meio da retroalimentação de sinais provenientes das gônadas. Os hormônios sexuais como os andrógenos, por exemplo, são importantes no mecanismo de retroalimentação (feedback), atuando principalmente no controle da liberação de GnRH do hipotálamo, pela hipófise ou diretamente nas gônadas, modulando a liberação de LH e FSH (Wolfe & Wu, 2012; Burder et al., 2004).

O conteúdo de FSH e LH aumenta com a idade, atingindo os seus níveis mais elevados aos 40 dias de idade em ratos. Os níveis de GnRH aumentam progressivamente da fase neonatal até a puberdade. Esse aumento é lento até a fase infantil e aumenta bruscamente até a puberdade, e reduz aos 35 dias de idade, quando a testosterona é bem mais elevada. Esta correlação inversa sugere que os andrógenos produzidos nesta fase estejam atuando como uma retroalimentação negativa sobre a secreção de GnRH, o que também pode explicar o pequeno declínio na expressão do receptor do GnRH que acontece após os 35 dias de idade (Chan et al., 1981; Dalkin et al., 198; Smith et al., 1971). O GnRH liberado no sistema porta-hipofisário liga-se em seus receptores nos gonadotrofos presentes na hipófise anterior. Os receptores para GnRH são receptores acoplados à proteína G que ativam a via da fosfolipase C (PLC) (Stojilkovic et al, 1994).

O FSH e o LH irão se ligar em receptores presentes nas células de Sertoli e nas células de Leydig, respectivamente, ambos possuem receptores acoplados à proteína G (Menon e Menon, 2012). O FSH quando se liga em seus receptores nas células de Sertoli pode ativar várias vias de sinalizações. Dentre as vias conhecidas está a via da adenosina monofosfatada cíclica (AMPC). O FSH também é capaz de estimular a proteína cinase

ativada por mitógeno (MAPK) e a via da PLC e também a via PI3K/Akt na fase proliferativa das células de Sertoli. (Dorrington & Armstrong, 1979; Lin et al., 2006; Khan et al., 2002). O LH quando se liga nas células de Leydig ativa as vias AMPc e PLC (Dufau, 1998).

As secreções de LH e FSH também são reguladas pela retroalimentação por andrógenos e pela inibina e ativina (peptídeos gonadais) que são secretadas pela célula de Sertoli sob ação do FSH. A inibina exerce um controle sobre a hipófise e o hipotálamo, formando uma alça de retroalimentação negativa, enquanto a ativina tem um efeito de retroalimentação positiva sobre a secreção de FSH. Desta forma, estabelece-se um complexo sistema de comunicação neuroendócrino, o qual regula, em machos, o comportamento sexual e a produção de espermatozóides (Ojeda et al, 2006).

1.4. EXPRESSÃO DO iAR NAS CÉLULAS DE SERTOLI

O iAR é um receptor membro da superfamília de receptores de transcrição regulados por ligando. O iAR é uma proteína nuclear com 110 kDa (aproximadamente 918 aminoácidos) composta por três domínios: um domínio amino-terminal, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação com o hormônio. Quando estão no estado não ligado esses receptores estão localizados geralmente no citosol num complexo de chaperonas moleculares (Hsp 40, 70 e 90) (Mangelsdorf et al., 1995). Ao se ligar no iAR o andrógeno induz alterações conformacionais da proteína de AR, e prontamente envia um sinal que permite que proteínas de importação nuclear tais como importina- α , as quais facilitam a translocação do complexo AR-hormônio para o núcleo. O dímero se liga então em regiões do DNA responsivas aos andrógenos, então, promotores e potenciadores de genes-alvo que são regulados pela atividade andrógeno / AR (Dehm, e Tindall, 2007).

Estudos de imuno-histoquímica em testículos de rato, durante a vida fetal, demonstram que a expressão do iAR é detectada em células de Leydig, células peritubulares e vasos sanguíneos. Porém não há expressão em células de Sertoli neste período (Sar et al., 1990; Takeda et al 1990; Rey et al 2009).

Modelos de ratos imaturos (10 dias de idade) *knockout* para iAR para células de Sertoli tem demonstrado mudanças conformacionais na célula, até mesmo mudança na polaridade, assim como no citoesqueleto e comprometendo também a formação normal da membrana basal. Posteriormente, a falta destes receptores nas células de Sertoli provoca perda de componentes essenciais da barreira hematotesticular comprometendo sua função (Wang et al., 2006; Willems et al., 2010).

O iAR é essencial para o sucesso da espermatogênese, pois na ausência desses receptores as células germinativas não se desenvolvem além da meiose, a barreira hematotesticular (BHT) fica prejudicada e não ocorre a liberação de espermatozoides a partir das células de Sertoli (Fig. 3) (De Gendt et al., 2004, Walker et al., 2015).

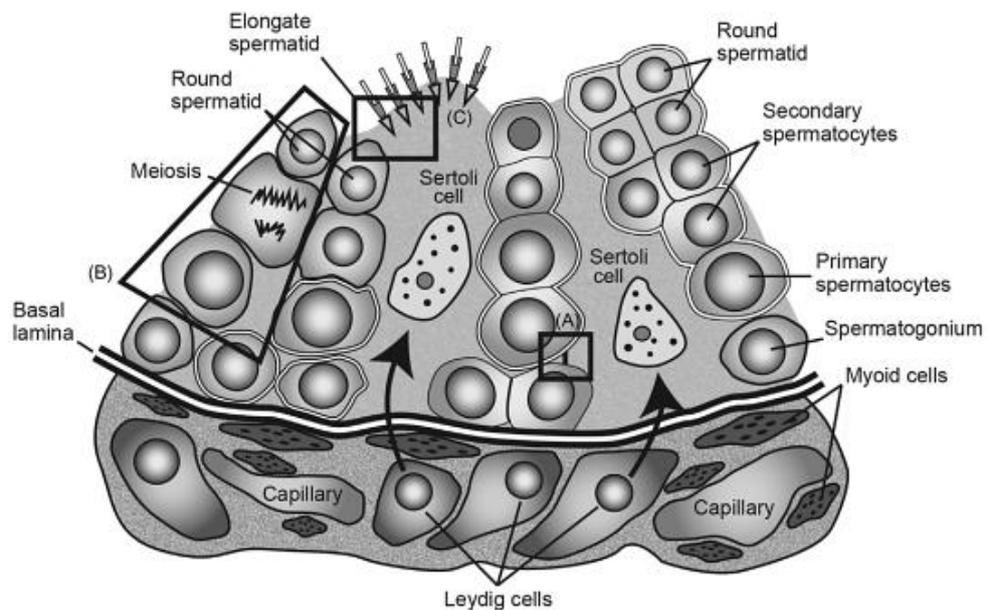


Figura 3. Resumo esquemático do impacto do iAR em células de Sertoli na espermatogênese. (A) A ação dos andrógenos no iAR é importante para o desenvolvimento e formação da barreira hematotesticular. (B) O iAR é essencial para a finalização da meiose dos espermatócitos. (C) O iAR em células de Sertoli é um dos elementos chave para espermição (Griswold, 2015).

Curiosamente as células germinativas não expressam iAR, embora alguns artigos demonstrem que estas células expressam esses receptores (Rey et al., 2009; Johnston et al., 2001). Estudos atuais realizados em ratos *knockout*, seletivos para o iAR em células de Sertoli, demonstram que as células de Sertoli são as principais mediadoras que

permitem o desenvolvimento das células germinativas (Tsai MY et al., 2006; De Gendt et al., 2004; Wang et al., 2009; Walker et al., 2015).

Em humanos, a expressão do iAR nas células de Sertoli inicia aos 5 meses de idade, é relativamente baixa até os 4 anos de idade e vai aumentando posteriormente. Em ratos, o iAR só vai ser expresso em células de Sertoli após 4-5 dias de idade, embora alguns artigos afirmem que já no 3 dia pós-natal (dpn) as células de Sertoli possam expressar iAR. Trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa também demonstraram a ausência de iAR nas células de Sertoli em ratos Wistar aos 4 dpn (Da Rosa et al., 2015). A expressão do iAR em ratos aumenta com a idade e atinge seu pico aproximadamente aos 35 dias de idade (Fig. 4). É evidente que na vida fetal em ambos, ratos e humanos, o iAR não está presente nas células de Sertoli (Buzek et. al., 1988; Bremner et al, 1994; You & Madhabananda Sar, 1998; Shapiro et. al., 2005; Da Rosa et al., 2015).

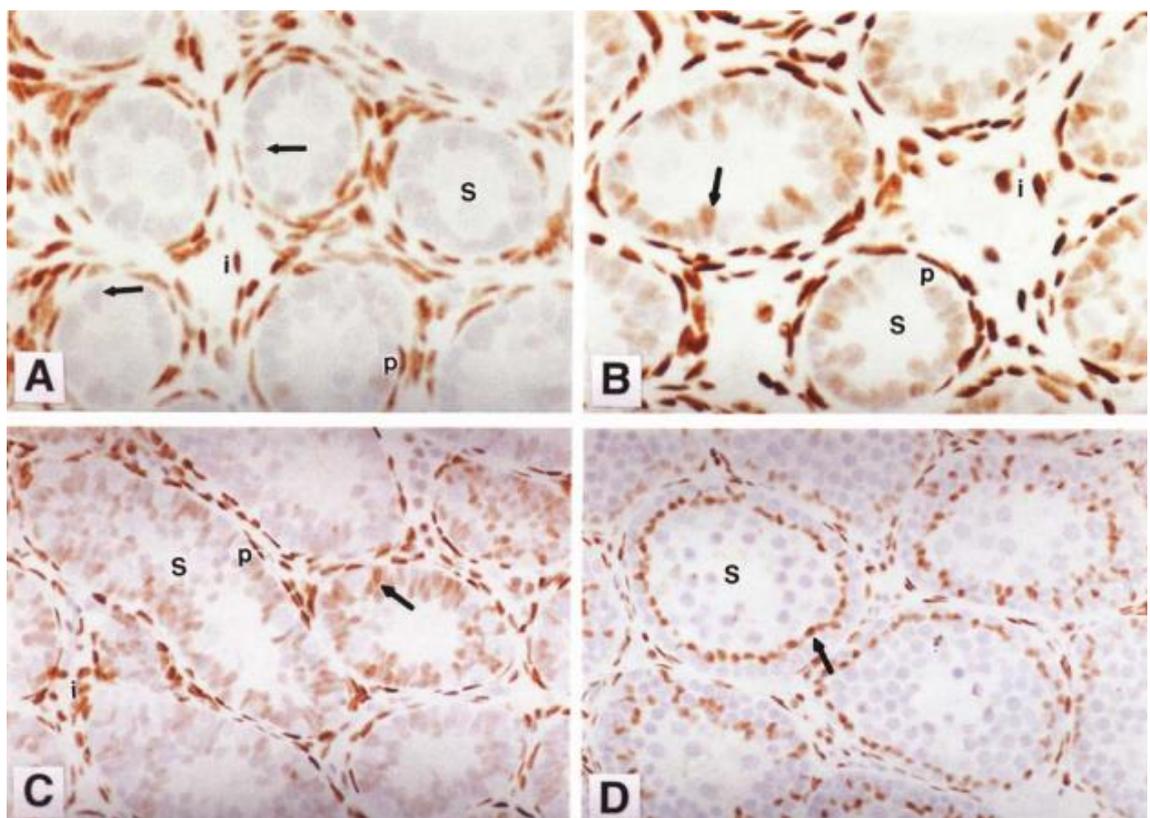


Figura 4. Expressão de iAR durante o desenvolvimento pós-natal em testículos de ratos. Expressão do iAR pode ser visualizada em células peritubulares (P) e células de Sertoli (S). (A) expressão de iAR em ratos de 2-5 dpn. (B e C) Expressão de iAR entre 5 e 10 dpn. (D) Expressão de iAR entre 10 e 20 dpn. (You & Sar, 1998)

Embora se constate que haja expressão de iAR em células de Sertoli de indivíduos pré-púberes (crianças), essa expressão é relativamente baixa em relação ao número de células de Sertoli de adultos, o que explica porque não há o desenvolvimento das células germinativas em crianças normais durante a secreção pós-natal de testosterona (Shapiro et al, 2005; Prince, 2001)

Em ratos, o aparecimento do iAR em células de Sertoli ocorre alguns dias após o nascimento, nesta fase há baixa produção de testosterona (Wang et al., 2009; Walker, 2014). A expressão do iAR no tecido testicular variam conforme a idade, tanto nas células de Leydig como nas células de Sertoli e nas peritubulares. Um estudo demonstra a presença deste receptor em ratos pré-púberes, púberes e adultos (Li-Xin Shan et al., 2008). Na fase pré-púbere, a produção de androgênios nas células de Leydig progenitoras atua sobre a sua própria diferenciação em células de Leydig imaturas (Shan & Hardy M.P., 1995). Nas células de Sertoli, a expressão deste receptor aumenta com a idade, alcançando os maiores níveis na fase adulta. Esta variação na expressão gênica do iAR, ao longo do tempo, reflete a ação clássica dos hormônios androgênicos durante o desenvolvimento sexual e a espermatogênese, pois o pico de ação androgênica nas células de Sertoli ocorre na fase adulta. Em trabalhos envolvendo células de Sertoli e células mióides peritubulares, isoladas de ratos de 15 dias de idade, a expressão testicular do iAR não se modificou após o tratamento com androgênios. No entanto, em ratos adultos, o conteúdo deste receptor no tecido testicular mostrou-se reduzido após a privação hormonal pela destruição das células de Leydig (Blok, Themmen, et al. 1992; Blok et al., 1992; Sharpe et al., 2003). Estudos *in vitro* demonstram que o FSH é capaz de induzir a expressão de iAR em células de Sertoli. De acordo com alguns autores, o FSH estaria auxiliando na expressão do receptor na fase pré-púbere, já que a testosterona está em doses baixas. Porém, em ratos adultos, a expressão deste receptor depende dos níveis circulantes de androgênios, os quais são importantes na manutenção do conteúdo de iAR nas células de Sertoli (Sharpe, 1994; Sharpe et al., 2003; McKinnell et al. et al., 2001; Wang et al., 2009; Li-Ji Zhu et al., 2000).

1.5. TESTOSTERONA

A testosterona é um hormônio esteroide androgênico produzido pelas células de Leydig sob estímulo do hormônio luteinizante (LH). A regulação da liberação da testosterona ocorre primeiramente quando há a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelos neurônios do núcleo arqueado no hipotálamo. Esse hormônio é lançado no sistema porta-hipofisário e estimula a adeno-hipófise a sintetizar o LH e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH tem como função atuar sobre as células de Leydig do testículo promovendo a síntese de andrógenos, principalmente a testosterona. As células de Leydig estão presentes no interstício entre os túbulos seminíferos do testículo e são as principais fontes de testosterona no homem. Existem três fases em que as células de Leydig produzem testosterona no homem: no período fetal, para masculinização do feto e para descida dos testículos; em um segundo período, que é descrito como pico pós-natal de testosterona, que acontece no primeiro trimestre de vida pós-natal; e o último período que coincide com o desenvolvimento da puberdade (Prince, 2001). A testosterona produzida no interstício testicular se difunde para os túbulos seminíferos onde vai agir nas células de Sertoli dando suporte à espermatogênese e influenciando diretamente na fertilidade. Na circulação sanguínea, a testosterona vai regular funções na próstata, nos músculos, ossos, coração e folículo piloso. A testosterona também pode ser obtida pela conversão, nos tecidos periféricos, da androstenediona sintetizada pelas gônadas e pela glândula adrenal. Nas mulheres, toda a testosterona circulante é derivada da conversão nos tecidos periféricos da androstenediona secretada pelo ovário e glândula adrenal. A testosterona é convertida em estradiol pela aromatase presente em tecidos como o cérebro e o tecido adiposo e pode ser convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase presente em tecidos que expressam esta enzima, como a próstata e o folículo pilo-sebáceo. A DHT é mais potente que a testosterona para a diferenciação sexual masculina, porque a DHT tem 10 vezes mais afinidade pelo α AR do que a testosterona (Kronenberg et al., 2008).

A fertilidade masculina depende de uma contínua produção de espermatozoides, processo conhecido como espermatogênese. Esse processo envolve

uma série coordenada de divisões mitóticas e meióticas, além de passos de diferenciação celular que são comandados por eventos autócrinos, parácrinos e endócrinos. A regulação endócrina da espermatogênese acontece principalmente pela ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e na testosterona sobre as células de Sertoli (Sharpe, 1994; McLachlan et. al., 2002).

Nos machos, a testosterona é essencial para a diferenciação sexual adequada e a manutenção da espermatogênese, que é a progressão e desenvolvimento de células germinativas em espermatozoides maduros. Sabe-se que não há expressão de receptores de andrógenos nas células germinativas, portanto a testosterona é essencial para o desenvolvimento destas células por agir principalmente pelo receptor de iAR nas células de Sertoli, que são as principais transdutoras de sinais da testosterona para as células germinativas. Essa sinalização é necessária para a manutenção da barreira hemato-testicular, a conclusão da meiose, a fixação das células germinativas nas células de Sertoli e a liberação dos espermatozoides maduros (Johnston et. al., 2001; Meng et. al., 2005; Willems et. al., 2010).

1.6. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA

1.6.1. AÇÃO CLÁSSICA DA TESTOSTERONA

A chamada “via clássica” é a via pela qual os andrógenos atuam nas células pela ligação em receptores de andrógenos localizados no interior da célula (iAR), ativando a expressão gênica e a síntese de proteínas. Esse mecanismo é relativamente lento, pois o tempo necessário para a via clássica produzir uma resposta funcional é de cerca de 30-45 minutos, pois é necessário que ocorra a transcrição gênica após estimulação pela testosterona, ou seja, tempo suficiente para alterar os níveis de proteína na célula.

Na via clássica, o andrógeno interage com o iAR no citoplasma e, após a ligação do andrógeno, ocorre uma alteração conformacional no iAR que permite que o receptor

seja deslocado para o núcleo, ativando genes co-ativadores ou co-repressores de proteínas para regular a expressão gênica (Shang & Myers, Brown et. al., 2002; Walker 2010).

1.6.2. AÇÃO NÃO-CLÁSSICA DA TESTOSTERONA

Uma série de resultados demonstra que a testosterona pode atuar por meio de outros mecanismos além do mecanismo clássico, primeiro porque as concentrações de testosterona nos testículos de humanos na fase pré-pubere e púbere são cerca de 25 a 125 vezes maiores do que a concentração encontrada no plasma. Devido aos elevados níveis de testosterona produzidos localmente pelas células de Leydig, este hormônio é o principal regulador das funções testiculares e do trato reprodutor masculino. Esta elevada quantidade de testosterona intratesticular é considerada mais do que o necessário para regular a função testicular pelos iAR. Provavelmente este excesso de hormônio possa estar sendo utilizado de outra maneira, produzindo uma ação não-clássica. Poucos genes nas células de Sertoli são regulados pela testosterona e uma grande porcentagem desses genes são inibidos na presença do iAR (Walker, 2009; Jarow et al., 2001).

A testosterona, quando atua por um mecanismo não-clássico, é capaz de gerar respostas celulares que ocorrem dentro de segundos a minutos, antes mesmo que aconteça a síntese proteica. Portanto, essas são ações que não podem ser explicadas pelo mecanismo clássico (Rahman & Christian, 2007; Fardori et al, 2008). Essas respostas rápidas podem ser explicadas pela ativação de cascatas de sinalização envolvendo mecanismos de membrana, como por exemplo, alterações resultantes da fosforilação gerada pelas cascatas de sinalização que podem provocar alterações fisiológicas imediatas na célula, além de gerar efeitos indiretos ou mesmo alterar a transcrição gênica já vista em vários tipos celulares em resposta à testosterona (Rahman & Christian, 2007; Fardori et al., 2008, Walker, 2009). Foi demonstrado que a testosterona (em concentrações de 0,025 a 10 μM) induz a despolarização da membrana em células de Sertoli e provoca o influxo de Ca^{2+} nestas células em poucos minutos. Estas ações não são inibidas na presença de flutamida (bloqueador do iAR). Além disso, esta resposta é

específica para esteroides androgênicos, uma vez que a progesterona e o estradiol não produziram qualquer resposta nas células de Sertoli (Loss et al, 2004; Cavalari et al., 2012). Os esteroides sintéticos como a nandrolona, e também flavonoides como a catequina, produziram efeito similares, induzindo a despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli, e de forma independente do iAR, pois o uso de flutamida não bloqueia a ação despolarizante (Cavalari et al, 2012).

São descritas para as células de Sertoli duas vias de sinalização em resposta à testosterona: uma delas é a ativação de MAP-cinase que promove a fosforilação do fator de transcrição CREB (Walker, 2003; Rahman & Christian, 2007). A via da PLC também participa desta resposta, pois a utilização de U73122 (bloqueador da PLC) e toxina pertussis (inibidor de proteína G) são capazes de inibir a despolarização provocada pela testosterona em células de Sertoli, indicando que as células de Sertoli ativam esta via através de um receptor acoplado à proteína G. Sabe-se hoje que os receptores de outros esteroides (que já têm seus receptores isolados), como os receptores para estrógenos, são receptores acoplados à proteína G. O estradiol, por exemplo, também ativa a via da PLC (Loss et al, 2004; Kelly & Ronnekleiv, 2008).

Os hormônios esteróides são capazes de ativar a transcrição gênica mesmo na ausência da ligação do hormônio ao iAR por meio de um cross-talk com os hormônios que ocupam receptores presentes na membrana celular. O modelo não-clássico é capaz de modular a sobrevivência e proliferação celular (Ueki et al, 2002). Numerosos estudos demonstram diversos hormônios esteroides são capazes de ativar e a via da PI3K/AKT, esta via medeia diversos fatores de crescimento celular, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular (Cantley et al, 2002).

A AKT (proteína serina-treonina cinases), também chamado PKB, é uma proteína cinase da subfamília de serina / treonina, dos quais três isoformas, denominados AKT1, AKT2, e AKT3, foram identificados. Apesar de serem produtos de diferentes genes, isoformas de Akt estão altamente relacionados, e exibem mais de 90% de homologia em suas sequências. Alguns substratos de AKT já foram mencionados como CREB um fator de transcrição (Vanhaesebroeck, 2000).

A PI3K / Akt medeia crescimento celular induzida por andrógeno através de um mecanismo não-clássico que leva à sobrevivência celular e crescimento em osteoblastos e células epiteliais (Kousteni et al., 2001; Migliaccio et al., 2000).

A via Akt/mTORC1 é um regulador essencial para o músculo em resposta ao IGF-1 (Frost & Lang, 2007). Nos seres vivos a deficiência de testosterona está associada a uma redução no IGF-1 circulante e a administração de testosterona provoca aumento de IGF-1, aumentando a expressão de Akt (Yin, Chai, Yu et al., 2009). A castração de ratos reduz a fosforilação de Akt, acredita-se que por diminuir IGF-1, mas ainda não está claro como acontece (Ibebunjo et al, 2011, Haren et al, 2011).

Nos testículos a manutenção da função reprodutora masculina depende de geração de esperma normal durante a qual as células de Sertoli desempenham um papel vital nesse processo e a expressão de Akt e Akt fosforilada serve como um biomarcador testicular e está relacionada à fertilidade (Cao XN et al, 2015). Em nosso trabalho, avaliamos a fertilidade verificando se os tratamentos modificam a expressão de Akt.

1.7. TESTOSTERONA E RECEPTOR DE MEMBRANA PARA ANDRÓGENOS (mAR)

A existência de um AR ligado à membrana tem sido postulada por vários autores com base nas respostas rápidas e na detecção da ligação da testosterona à membrana plasmática em diferentes tipos celulares. Essas ligações são vistas pela técnica de citometria de fluxo e fluorescência com testosterona conjugada à albumina sérica (BSA) e a um marcador fluorescente (T-BSA-MARCADOR). A T-BSA não atravessa a membrana celular, portanto não pode se ligar aos iARs. Um dos primeiros trabalhos a identificar a ligação da T-BSA em sítios não específicos foi realizado por citometria de fluxo em células T do sistema imune. Foi usado o conjugado T-BSA-FITC para avaliar a intensidade da fluorescência. Enquanto o FITC e a BSA-FITC sozinhos não se ligaram na membrana, o marcador conjugado com a testosterona (T-BSA-FITC) marcou as células (Benten et al., 1999).

Essa ligação da testosterona na membrana foi verificada também em neurônios, macrófagos, células de tumor de próstata (CaP) e miócitos cardíacos (Richardson et al, 1995; Benten et al. 1999; Stathopoulos et. al., 2003; Vicencio et al, 2006, Guo et al., 2002). Um estudo realizado em células de músculo liso vascular mostrou a especificidade de receptores na membrana para testosterona, pois a adição

concomitante de outros hormônios como Estradiol (E_2), E_2 -BSA e DHT não deslocou a ligação da T-BSA-Európio (testosterona + marcador fluorescente) na membrana. Porém, ao ser aplicado T-BSA mais de 50% na ligação da T-BSA-Európio foi deslocada, mostrando uma ligação específica para o hormônio (Somjen D et al., 2004). Em células CaP, a técnica de citometria de fluxo associada a imagens de fluorescência têm sido bastante descrita para identificar ligações da T-BSA-FITC na membrana, inclusive em linhagens de células DU145, que não expressam o iAR. Portanto, a existência de um receptor de membrana para andrógenos pode ser plausível, uma vez que outros receptores de membrana para outros esteroides já foram descritos, como para progesterona (mPR) e para estrógeno (mER-, ER-alpha36, GPR30) (Dambaki et al.2005; Hatzoglou et al., 2005; Smith et al., 2008; Kang et al., 2010).

1.8. EPITESTOSTERONA

A epitestosterona (17-hidroxi-4-androsten-3-ona) é um hormônio endógeno natural. É considerado um epímero da testosterona, pois os dois hormônios diferem em apenas um carbono quiral (Arimasa & Kochakian, 1973; Lapcik et.al., 1995). Estudos em humanos em idade pré-púbere demonstram que a concentração plasmática de epitestosterona é ligeiramente maior do que a de testosterona nessa fase da vida, em ambos os sexos. Na puberdade, em indivíduos do sexo masculino, a relação testosterona/epitestosterona aumenta devido ao aumento na síntese de testosterona ser maior em relação ao da epitestosterona. Na vida adulta, a relação entre testosterona e epitestosterona é de 6:1 e se mantém constante até os 50 anos, quando começa a declinar (Lapcik et al., 1995).

A síntese endógena de epitestosterona ocorre pela ação de duas vias diferentes a partir da desidroepiandrosterona (DHEA) (Bellemare et al., 2005). Um estudo realizado em tecido testicular de ratos demonstra que a produção da epitestosterona ocorre a partir da pregnenolona pela síntese de 5-androstene-3 β , 17 α -diol (epi5-diol) e que este é convertido para epitestosterona por ação da enzima 3 β -hidroxiesteróide

desidrogenase (3β -HSD) (Bellemare et al., 2005). Mais recentemente, foi demonstrado uma possível nova rota para a síntese desse esteroide, que é produzido via transformação de 4-diona em epitestosterona por ação da enzima 17α -hidroxiesteroide desidrogenase (17α -HSD). Isso explica o porquê de a administração de 4-diona em homens saudáveis aumentar a taxa de excreção urinária de epitestosterona (Fig. 5) (Bellemare et al., 2005).

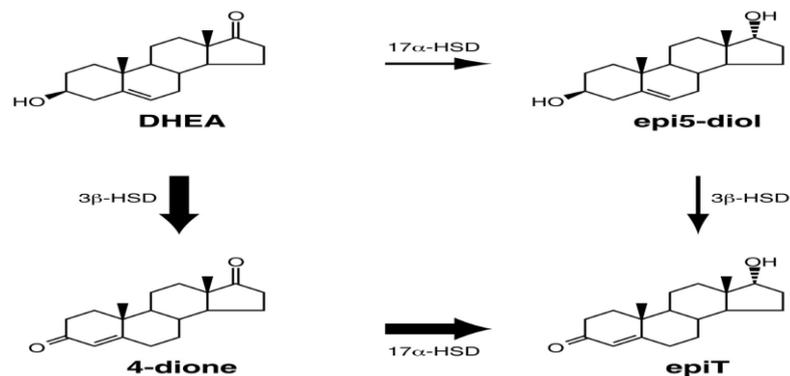


Figura 5: Vias de síntese da Epitestosterona. (A) Conversão de DHEA a epi5 α -diol e a EpitT. (B) Conversão de DHEA a 4-dione e EpitT. Fonte: Adaptado de (Bellemare *et al.*, 2005) (Bellemare et al., 2005.)

Embora não existam resultados claros que mostrem um potencial precursor da epitestosterona *in vivo*, a 5-androstene- 3β - 17α -diol (Ae- 17α -diol) tem sido considerada como sendo o principal precursor da epitestosterona (Weusten et al., 1989; Bellemare 2005).

Sabe-se que a Ae- 17α -diol pode ser sintetizada diretamente a partir da pregnenolona, em uma única etapa por ação direta de CYP17, enzima que desempenha um papel central no metabolismo dos esteroides. A CYP17 cataliza a hidroxilação de 17α -pregnenolona em progesterona. Portanto a ação direta da CYP17 para formar o precursor Ae- 17α -diol vem sendo considerada uma possível via para produção de epitestosterona, como mostrado na Fig. 6 (Dehennin, 1993; Picado-Leonard, 1987; Schulze et al., 2008).

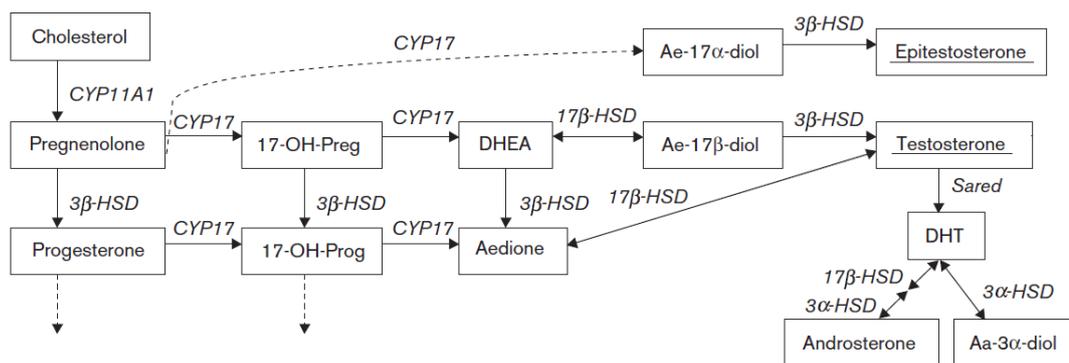


Figura 6. Vias metabólicas de formação dos andrógenos. A linha tracejada se refere à via sugerida para epitestosterona. Conversão de Ae-17 α -diol em epitestosterona por ação de CYP17. Adaptada de

Como a testosterona não pode ser convertida em epitestosterona, tanto em ratos como em humanos, a razão testosterona/epitestosterona é muito utilizada nos testes anti-doping em humanos, pois qualquer uso de testosterona aumenta esta relação. Os primeiros testes usavam a relação de 6:1 como um limite para um teste positivo. Porém hoje, a Organização Mundial Anti-doping (WADA) reduziu o limite para 4:1 (T:E) (Bellemare 2005; WADA 2011). A administração de epitestosterona juntamente com a testosterona é capaz de mascarar o teste anti-doping. Por esse motivo a epitestosterona foi incluída na lista de substâncias proibidas pela WADA (WADA, 2006).

A excreção urinária da epitestosterona varia conforme a idade e o sexo. Em meninos, a excreção é baixa na infância, mas aumenta após a puberdade e se mantém constante até aproximadamente 60 anos de idade, momento em que a excreção desse hormônio decresce levemente (De Nicola et al., 1966 Lapcik et.al., 1995). A excreção urinária da epitestosterona se mantém constante em relação à testosterona durante a vida adulta e o *clearance* renal é semelhante (Heck H, Hollmann W & Liesen H. Kohl 1983; Dehennin & Peres, 1996).

Pouco se sabe sobre a ação da epitestosterona e até pouco tempo acreditava-se que fosse um hormônio inativo (Sanders 2007). Uma ação para a epitestosterona foi postulada em um estudo realizado por Nuck e colaboradores (1987), no qual a implantação subcutânea de epitestosterona diminuiu a estimulação androgênica em hamsters, com redução da pigmentação, do crescimento de glândulas sebáceas e do diâmetro do folículo piloso. A partir deste trabalho foi sugerida uma ação anti-androgênica da epitestosterona. Este esteróide inibe a ação da testosterona por

promover o bloqueio da enzima 5 α -redutase, responsável por converter testosterona em diidrotestosterona (DHT), a qual exerce efeitos androgênicos em órgãos-alvo. Outro mecanismo responsável por este efeito anti-androgênico é a inibição competitiva do receptor de androgênios intracelular, visto que uma ação direta da DHT é também inibida pela epitestosterona (Nuck et al., 1987, Starka et al., 1989). A ligação da epitestosterona ao receptor de androgênios ocorre com um décimo da afinidade da testosterona por este receptor. Outro relato que comprova a sua ação anti-androgênica é a redução do tamanho de órgãos dependentes de androgênios em ratos e camundongos, tais como as vesículas seminais e rins, e a diminuição da densidade óssea e do conteúdo de fosfato e de cálcio no osso femoral em ratos tratados com este esteroide. Em comparação ao grupo de ratos castrados e com reposição de testosterona, a diminuição do peso de órgãos foi muito superior no grupo que recebeu epitestosterona, sendo seu efeito anti-androgênico maior em relação ao apresentado pelo grupo tratado com acetato de ciproterona (inibidor do iAR) (Starka et al., 2001; Starka et al., 2003; Broulik, 1997). Alguns estudos também demonstraram a presença de baixos níveis de epitestosterona em amostras de cabelo de homens com calvície. Este esteroide é capaz de bloquear a enzima 5 α -redutase e, portanto, reduzir os níveis de DHT, um dos principais andrógenos envolvidos no desenvolvimento do padrão masculino de calvície (Choi et al., 2001; Ellis et al., 1998). Além de uma ação anti-androgênica, ações não clássicas têm sido demonstradas para o hormônio (Hammond et al., 2001; De Castro A. et al., 2012; Da Rosa et al., 2014). Um estudo realizado por Hammond e colaboradores (Hammond et al., 2001) demonstrou uma leve ação neuroprotetora da epitestosterona em cultura de neurônios humanos submetidos à privação de soro, levando à diminuição da apoptose nessas células. Após o bloqueio do receptor intracelular de androgênios, com o antagonista flutamida, este efeito protetor se manteve, demonstrando ocorrer por uma via independente deste receptor. Estudos demonstraram a presença de epitestosterona no cérebro de ratos machos e fêmeas imaturos sexualmente, provavelmente devido à presença da enzima 17 α -hidroxiesteroide redutase no tecido cerebral (Gustafsson et al., 1976). Em células de Sertoli de ratos, a epitestosterona promove uma despolarização do potencial de membrana e aumento no influxo de Ca²⁺ intracelular: essas são ações rápidas que não são bloqueadas pela flutamida (De Castro et al., 2012). Essa despolarização foi vista em

células de Sertoli de ratos neonatos (4 dias de idade) que não possuem expressão do iAR, provavelmente por estar agindo em um receptor diferente do intracelular (Da Rosa et al., 2015).

1.9. CETRORELIX

O cetorelix é um potente antagonista do GnRH ou LHRH, que promove a supressão das funções dos testículos por inibir competitivamente o receptor de GnRH presente na hipófise (Bajusz et al., 1988). Logo após a administração subcutânea, o cetorelix é absorvido rapidamente em aproximadamente 2 horas e a eliminação dos tecidos também é rápida e dentro de 48 h após a administração pela via intraperitoneal. Concentrações muito baixas foram encontradas no sistema nervoso central, indicando que esse tecido possui uma baixa permeabilidade ao cetorelix devido à existência da barreira hematoencefálica (Chu et al., 1985; Fekete et al., 1989; Schwahn, et al., 1997). Em ratos machos, a liberação de GnRH ocorre logo após o nascimento, aproximadamente no 5º dia de idade até a maturidade sexual. Esse aumento é lento em um primeiro momento e começa a acelerar da fase infantil até a puberdade promovendo o desenvolvimento sexual. Após o amadurecimento sexual, onde os níveis de testosterona aumentam drasticamente, ocorre uma diminuição dos níveis de GnRH principalmente devido ao *feedback* negativo da testosterona (Dalkin et al., 1989, Halmos et al., 1996). A administração de cetorelix na idade infantil e juvenil reduz os aumentos de GnRH nestas idades, reduzindo também o desenvolvimento sexual (Halmos et al., 1996).

O cetorelix, quando administrado em ratos Wistar machos imaturos, promove uma diminuição na secreção de FSH e LH, resultando em concentrações de testosterona comparáveis às da castração, diminuindo o peso dos testículos sem alterar o peso corporal dos ratos (Atanassova et al., 2005, WalczakJedrzejowska et al., 2011). A

utilização de cetorelix combinado com a reposição hormonal de testosterona faz com que o peso dos testículos retorne ao normal, restaurando também o desenvolvimento testicular. Dessa forma o cetorelix utilizado concomitantemente com outro hormônio é capaz de mostrar o efeito isolado do hormônio repostado (WalczakJedrzejowska et al., 2011). Ao utilizar cetorelix em nosso trabalho, podemos não só ver o efeito da castração, mas o efeito da reposição hormonal com a eptitesterona ou testosterona, podendo assim verificar a ação isolada de cada hormônio na função testicular.

Avaliar o efeito isolado da eptitesterona é uma forma de obtermos uma compreensão da importância fisiológica deste hormônio ao longo do desenvolvimento sexual. Ao contrário da testosterona, os seus níveis plasmáticos estão elevados em indivíduos na idade pré-púbere, porém há poucos estudos sobre o seu papel e a importância desses hormônios na manutenção do período de imaturidade sexual.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do tratamento em ratos imaturos castrados com epitestosterona e testosterona em parâmetros do desenvolvimento e na resposta não clássica da testosterona.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito dos tratamentos com epitestosterona e testosterona em ratos castrados com cetorelix (antagonista do GnRH), nos seguintes parâmetros: Peso corporal, peso testicular e distância anogenital
- b) Analisar, através da técnica eletrofisiológica a resposta não-clássica da testosterona na membrana das células de Sertoli nos ratos dos diferentes tratamentos
- c) Avaliar, mediante técnica de imuno-histoquímica e *Western Blotting*, o padrão de imnoreatividade ao iAR nas células de Sertoli e a expressão do receptor intracelular de andrógenos (iAR) em testículos de ratos submetidos aos tratamentos
- d) Verificar a expressão de AKT em testículos de ratos submetidos aos tratamentos, através do *Western Blotting* nos animais com diferentes tratamentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados testículos de ratos de 15 dias de idade da espécie *Rattus norvegicus* - linhagem Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do ICBS/UFRGS. Os ratos machos provenientes do CREAL chegavam ao ICBS acompanhados das mães com 3 dpn para aclimatação de 3 dias. No 7º dpn, os animais foram pesados, a DAG foi medida (explicado abaixo). Após a pesagem e a média da DAG os animais foram submetidos aos tratamentos com os hormônios. O tratamento de todos os grupos teve início do 7º dpn ao 14º dpn. Os ratos ficaram com as mães até o momento dos experimentos. As mães foram mantidas com no máximo dez filhotes em gaiolas individuais onde receberam ração (Nuvilab, Nuvital CR1, Colombo, PR, Brasil) e água “ad libitum”. A sala onde os animais permaneceram possuía um controle de ciclo claro/escuro com 12 horas cada (as luzes permaneceram acesas das 7hs às 19hs) e temperatura em torno dos 22º C.

Os animais receberam um tratamento com 500µg/kg de cetorelix (castração química) sozinho ou juntamente com reposição hormonal de epitestosterona ou testosterona, ambos hormônios administrados na dose de 2,5mg/kg/dia. Além disso, um grupo de ratos não castrados foi tratado exclusivamente com epitestosterona na mesma dose. Os hormônios foram diluídos em 50 µL de ciclodextrina (22% em água) e aplicados (com ou sem a administração simultânea de cetorelix) pela via intraperitoneal com agulha hipodérmica curta de até 25x5 mm. O grupo controle recebeu somente 50 µL do veículo (ciclodextrina 22%) pela via intraperitoneal (Fig. 7). O tratamento dos animais foi dividido de forma que animais de todos os grupos estivessem presentes em todas as caixas, para que todos os grupos tivessem passado pela mesma mãe (ver tabela 1). Os animais foram tratados diariamente por um período de 7 dias. No 14º dia de idade

os animais foram pesados, a DAG foi medida, os animais foram eutanasiados e os testículos foram removidos, pesados e submetidos às técnicas de eletrofisiologia, imuno-histoquímica e Western blot.

Os animais foram submetidos a uma medida da distância anogenital (DAG) em milímetros, que foi mensurada com paquímetro digital. A DAG é a medida entre o ânus e os órgãos genitais, usada como parâmetro de desenvolvimento sexual para verificar o efeito da castração e exposição aos andrógenos (medida no início e no término do tratamento). Os animais foram pesados, eutanasiados e logo após os testículos foram retirados e limpos para posteriormente serem pesados com a finalidade de analisar o efeito dos tratamentos nos parâmetros de desenvolvimento corporal e testicular. Todos os ratos foram eutanasiados sem anestesia pela técnica de deslocamento cervical, pois qualquer outro fármaco utilizado poderia alterar o resultado dos experimentos. A técnica de deslocamento cervical consiste no rompimento da medula espinhal, tratando-se de uma manobra rápida, que em frações de segundos leva o animal à perda total da sensibilidade e morte imediata, sendo feita por pessoas treinadas. Este método é utilizado, pois outros métodos podem invalidar o resultado final do experimento. Cada animal foi eutanasiado em uma sala separada da gaiola. Os testículos utilizados para eletrofisiologia foram retirados, limpos, decapsulados e colocados em salina de Hank's. Os testículos utilizados para a técnica de *Western blot* foram retirados e colocados imediatamente no nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80°C até a utilização.

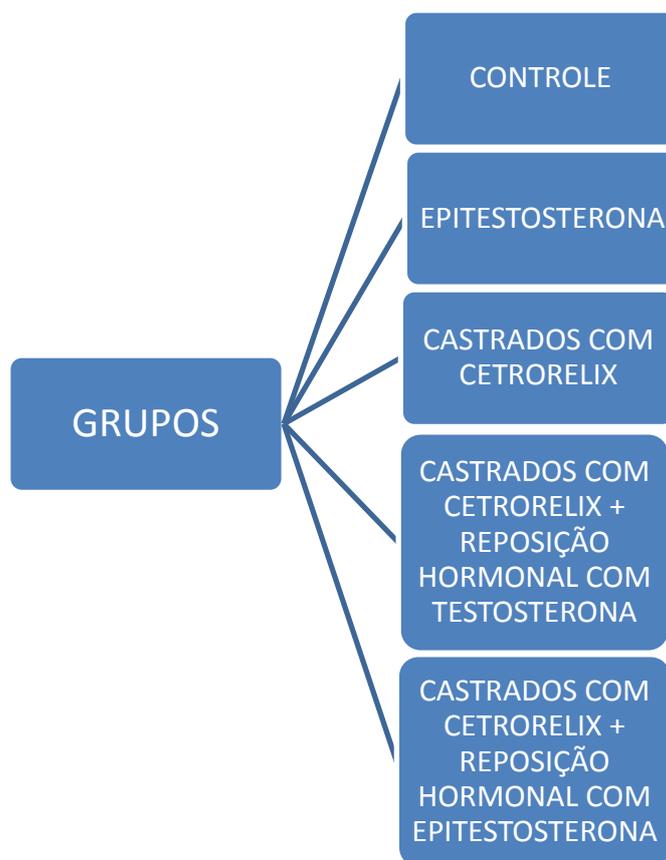


Figura 7. Esquema dos grupos dos animais tratados.

1º ninhada	2º ninhada	3º ninhada	4º ninhada
2 controles	2 controles	2 controles	2 controles
2 cetorelix	2 cetorelix	2 cetorelix	2cetorelix
2 testosterona+cetorelix	2 testosterona+cetorelix	2 testosterona+cetorelix	2 testosterona+cetorelix
2 epitestosterona+cetorelix	2 epitestosterona+cetorelix	2 epitestosterona+cetorelix	2 epitestosterona+cetorelix
2 epitestosterona	2 epitestosterona	2 epitestosterona	2 epitestosterona

Tabela 1. Esquema do método de escolha para escolha dos grupos e ordem dos animais tratados.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número 21276.

3.3. SOLUÇÕES

3.3.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFISIOLOGIA:

Foi utilizada a solução HBSS (*Hank's Buffer Salt Solucion*), a solução foi preparada imediatamente antes da realização dos experimentos a partir de soluções-mãe (tabela 1), e HEPES, que era pesado e diluído em água destilada no momento do experimento. Todos os reagentes eram de pureza "pró-análise" (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), exceto o HEPES proveniente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Para o preparo do tampão foram misturados volumes iguais de cada solução mãe, o HEPES e água destilada (até completar o volume desejado). O pH da solução foi verificado utilizando o pHmetro ajustado em 7,4 acrescentando-se NaOH (0,1 N). A solução foi filtrada em papel filtro e mantida em gelo durante a preparação do experimento.

	Concentração	
	Solução Estoque	Solução Final
NaCl	2,9 M	145 mM
KCl	34,3 mM	4,6 mM
CaCl ₂	32 mM	1,6 mM
Glicose	110 mM	5,5 mM
MgCl ₂	32 mM	1,6 mM
NaHCO ₃	100 mM	5 mM
HEPES	****	10 M

Tabela 2. Composição das soluções estoque e solução final utilizados na técnica de eletrofisiologia.

3.3.2. SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNO-HISTOQUÍMICA:

Foi utilizado PBS (tampão fosfato salino) que contém tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, acrescido de NaCl (100 mM) e KCl (2 mM). O tampão fosfato 0,2 M foi preparado a partir de uma solução de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 0,2 M e uma solução de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) 0,2 M. As duas soluções foram tituladas uma na outra de forma a atingir o pH 7,4. Os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da Synth (Diadema, SP, Brasil). Em algumas etapas do experimento de imuno-histoquímica o PBS era acrescido de Triton X-100 0,2% (PBS-T). O Triton é um detergente que melhora permeabilidade dos anticorpos no tecido. Foi utilizado também o tampão citrato para o procedimento de reativação, esse tampão foi preparado a partir de soluções 0,1 M de citrato de Na⁺ e ácido cítrico. As duas soluções foram tituladas uma na outra de forma a atingir pH 5,5. Essa solução era diluída 10x em água destilada, obtendo-se então tampão citrato, 0,01 M, pH 5,5.

3.3.4. SOLUÇÕES UTILIZADAS NO WESTERN BLOTTING:

Foi utilizado um tampão de carga (Tris 65mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,03% e β -mercaptoetanol 1:20, pH 6,8), um tampão de corrida (Glicina 192mM, Tris 25mM e SDS 0,1%, pH8,3), um tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3, um tampão para lavagem com detergente (TTBS: Tris 25mM, NaCl 140mM e Tween 20 a 0,05%) ou sem detergente (TBS: Tris 20mM e NaCl 140mM) e um tampão para diluir os anticorpos (TTBS com albumina bovina 2,5%).

3.4. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina: Fluka (St. Louis, MO, USA). Veículo para os hormônios testosterona, epitestosterona e para o cetorelix. Dissolvido em água deionizada a 22%. A solubilidade de fármacos lipofílicos aumenta linearmente com a concentração de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HBC) devido a uma porção não-polar no HBC que resulta na solubilidade aumentada (Fig.8).

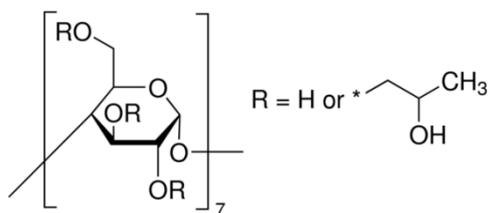


Figura 8. Estrutura molecular da (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina.

Testosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). PM: 288, 429 Concentração: 2,5 μ M diluído em 50 μ L de ciclodextrina (22% de água) para os tratamentos (Fig.9). Para os experimentos de eletrofisiologia a testosterona era diluída em etanol, sendo que a

concentração final de etanol é menos de 0,1% na solução final. A dose da testosterona na solução que foi aplicada ao banho era de 1 μM .

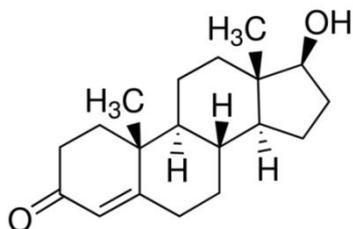


Figura 9. Estrutura molecular da Testosterona

Epitestosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). PM 288,42. Epímero da testosterona de ocorrência natural (Fig. 10). Concentração: 2,5 μM , diluído em 50 μL de ciclodextrina (22%).

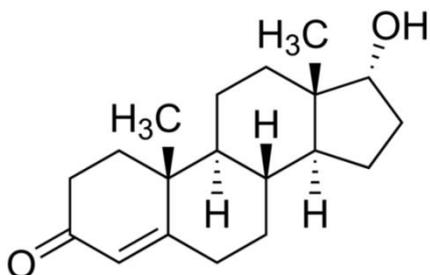


Figura 10. Estrutura molecular da epitestosterona.

Cetrorelix (Cetrotide): (0,25mg-Serono) Concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O acetato de cetrorelix (Fig. 11) antagonista do GnRH.

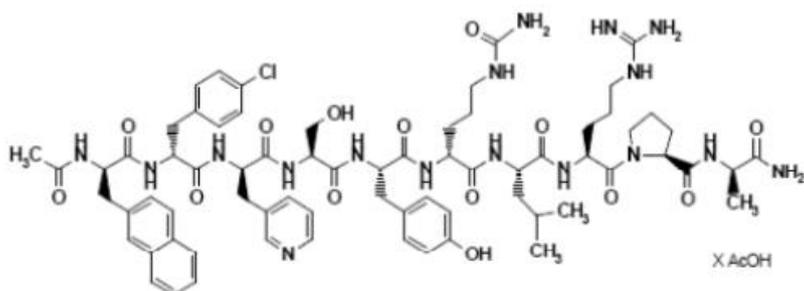


Figura 11. Estrutura molecular do cetrorelix.

Anti-AR: Anticorpo anti-AR: Santa Cruz Biotechnology, Inc. AR (Dallas, TX, USA), código sc-816. Anticorpo policlonal, desenvolvido em coelho, diluído em PBS na proporção 1:250 para a imuno-histoquímica e diluído em TTBS e albumina 2,5% na proporção de 1:1000 para a técnica de Western blot (PM:110 kDa: proteína de interesse).

Complexo peroxidase antiperoxidase (PAP): Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Diluído em PBS-T na concentração de 1:500.

Cromógeno diaminobenzidina (DAB): Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), código D5637. Diluído em PBS-T na concentração de 0,06%.

IgG: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), código R2004. Anticorpo secundário anti-coelho desenvolvido em cabra. Diluído em PBS-T na concentração de 1:100.

Fixador de Bouin: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) - ácido pícrico 0,9%, ácido acético 5% e formol 9%.

Soro normal de cabra: Milipore, Merck KGaA® (Darmstadt, Alemanha). Diluído em PBS-T na concentração de 3%.

Anticorpo anti-Akt: Santa Cruz Biotechnology, Inc. AR (Dallas, TX, USA) foi diluído em TTBS e albumina 2,5% na proporção de 1:1000 (PM:60 kDa da AKT).

Anticorpo anti-GAPDH: Millipore, diluído em TTBS e albumina 2,5% na proporção de 1:1000 (PM: 36kDa GAPDH).

4. TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para determinar a imunorreatividade ao iAR nas células testiculares, após os tratamentos em ratos Wistar no 15º dpn, os testículos foram retirados dos animais e fixados em líquido de Bouin por quatro horas. As amostras foram lavadas em álcool 70% até que o fixador fosse retirado por completo. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em série alcoólica crescente (etanol, 70, 80 e 96% e álcool isopropílico 100%), durante 1 h-1 h30min cada, diafanizados em xilol (2 banhos de 1h30min cada), impregnados e incluídos em parafina para posterior secção em micrótomo (Micron®) com cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram distendidos paralelamente sobre lâminas histológicas, de forma que cada lâmina continha dois cortes de cada um dos grupos experimentais. Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (etanol 100, 96 e 90%) durante 1:30 minuto, seguido de enxágue em água destilada e finalizando em PBS, pH 7,4. Em seguida, os cortes foram submetidos ao procedimento de imuno-histoquímica para a detecção do iAR. Para o procedimento de imuno-histoquímica as lâminas contendo os cortes foram incubadas por 30 minutos em uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% à temperatura ambiente para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram lavados (2 x 15 min) com PBS acrescido de Triton X-100, 0,2% (PBS-T), transferidos para cubas contendo tampão citrato (0,01M, pH 5,5) e aquecidos em um forno de microondas (5 vezes de 2 min) para a reativação do antígeno.

Os cortes foram mantidos à temperatura ambiente até resfriar e, após duas lavagens com PBS-T, foram pré-incubados por 30 minutos com soro normal de cabra 3%, para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo. Após o bloqueio, foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-iAR na concentração de 1:250, durante 24h a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos. Após as lavagens, os cortes foram incubados por 1h30min a temperatura ambiente com um anticorpo secundário IgG anti-coelho desenvolvido em cabra na concentração de 1:100. Os cortes foram lavados por mais duas vezes em PBS-T e então incubados com o complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 1:500 por 1h30min. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, que

por sua vez, reconhece o anticorpo primário. A peroxidase de rabanete (HRP) acoplada ao PAP combina-se com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), resultando em um complexo HRP·H₂O₂, que pode oxidar diferentes cromógenos. A oxidação desses cromógenos resulta em um precipitado corado. Os cortes foram novamente lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a revelação da reação imuno-histoquímica, incubando-se os cortes em uma solução contendo o cromógeno diaminobenzidina (DAB) 0,06% por 10 minutos, sob agitação constante. Em seguida, uma solução de H₂O₂ 10% diluída em água destilada, foi aplicada à solução de DAB na proporção de 1µL H₂O₂ 10% para cada 1000 µL da solução de DAB.

Os cortes foram incubados por mais 10 minutos até o aparecimento de um precipitado de cor parda. Após a revelação, os cortes foram lavados diversas vezes em PBS. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina por 20 segundos e lavados em água corrente por 20 minutos para que os núcleos adquiriram coloração levemente roxa. Na sequência, os cortes foram lavados em água corrente por 20 minutos. Para finalizar o processo as lâminas foram desidratadas em série alcoólica crescente (90, 95 e 100%) duas vezes de 1 min e diafanizadas em xilol por 2 vezes de 2 min. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas.

A fim de determinar a especificidade da reação imuno-histoquímica observada, um grupo controle negativo foi utilizado para verificar a especificidade do anticorpo utilizado para reconhecer o antígeno em estudo. No grupo controle negativo o anticorpo primário foi omitido e nenhuma reação imuno-histoquímica foi observada.

A observação da reação imuno-histoquímica foi realizada em microscópio óptico (NIKON® modelo Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital acoplada ao microscópio, pelo sistema de captura de imagens Motic Images Plus® 2.0, utilizando a objetiva de 40x. A análise das imagens capturadas foi realizada com a utilização *software* ImageJ®.

4.1. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE AO IAR EM CÉLULAS SERTOLI

A intensidade da imunorreatividade ao iAR foi verificada por densitometria óptica utilizando as imagens previamente capturadas e o software ImageJ®. As imagens foram convertidas para imagens digitais dentro de uma escala de 256 tons de cinza onde o nível de cinza para cada pixel variava de 0 (preto) - 255 (branco).

Foram processadas 5 lâminas por animal (n=4 animais/grupo experimental), conforme figura x. Foram capturadas 5 imagens de cada grupo experimental por lâmina, totalizando 25 imagens por animal e 100 imagens por grupo experimental. De cada imagem capturada foram selecionados dois núcleos de células de Sertoli para análise, totalizando 50 núcleos de células de Sertoli por animal e 200 por grupo experimental.

Os núcleos analisados tinham as bordas bem definidas e foram circundados manualmente por experimentadores que não conheciam os tratamentos experimentais. Após a seleção da região, o programa forneceu a média da intensidade de cinza de todos os pixels da área selecionada e esse número foi utilizado para o cálculo da densidade óptica. A coloração de fundo (“background”) de uma área não imunorreativa foi determinada e utilizada para a correção das leituras de densidade óptica. Todas as condições de luminosidade foram mantidas constantes durante a captura das imagens. O número amostral que aparece nos gráficos relativos à densitometria óptica representa o número de núcleos analisadas somando-se todos os animais de um mesmo grupo experimental. A densidade óptica foi calculada através da seguinte fórmula:

$$OD = -\log\left\{\frac{(I-B) - [(BG-B) - (IT-B)]}{(I-B)}\right\}$$

OD: Densidade óptica;

I (“incident”): intensidade máxima de luz incidental, neste trabalho 255;

B (“Black”): Intensidade gerada quando nenhuma luz passa através do material, neste trabalho 2;

BG (x,y): (“background”): intensidade de fundo em um determinado pixel.

IT (x,y): (“intensity”): é a intensidade de um determinado pixel da área analisada.

Os valores da densidade óptica obtidos para cada grupo de animais foram analisados estatisticamente.

5. TÉCNICA ELETROFISIOLÓGICA DE REGISTRO INTRACELULAR

Na técnica de eletrofisiologia foram utilizados os ratos de todos os grupos tratados com 14 dias de idade. Os animais foram eutanasiados pela técnica de deslocamento cervical e os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e colocados em solução HBSS mantida no gelo. Em seguida, os testículos foram limpos, descapsulados e cuidadosamente estirados com uso de duas pinças de ponta fina, para expor 5 a 10 túbulos seminíferos que foram fixados no fundo de uma câmara de perfusão com um fio ortodôntico.

A preparação era então levada ao microscópio invertido (*Inverted Microscope Diaphot* – TMD, Nikon Instruments Inc. Melville, NY, USA) e conectada ao sistema de perfusão com HBSS. O HBSS mantido em banho a 36°C perfundia os túbulos com fluxo de 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1). A preparação ficava 30 minutos se estabilizando antes do início dos registros.

Após esse período, uma célula de Sertoli era empalada com um microeletrodo de vidro, sob controle visual. A movimentação mecânica do eletrodo para aproximação das células e empalamento era realizado por um micromanipulador mecânico (Narishige-Japão), capaz de executar movimentos macros e micros nos três eixos.

O potencial de membrana da célula de Sertoli empalada foi registrado utilizando um microeletrodo preenchido com KCl (3 mol/L), com resistência de 15 a 25 MΩ. Esse microeletrodo estava conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK), que permite o monitoramento do potencial de membrana da célula por meio de um osciloscópio (TDS 200 Tectronix, Inc). Os dados foram armazenados em um computador por uma placa de aquisição de dados (TDS 210 Tectronix) e do programa Wave Star (Lite versão 1.0.10, 1996 Tectronix, Inc.). Pulsos de corrente quadrados (0,5 nA, 0,5 Hz e 200

ms) foram aplicados através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass instruments) (Figura 12).

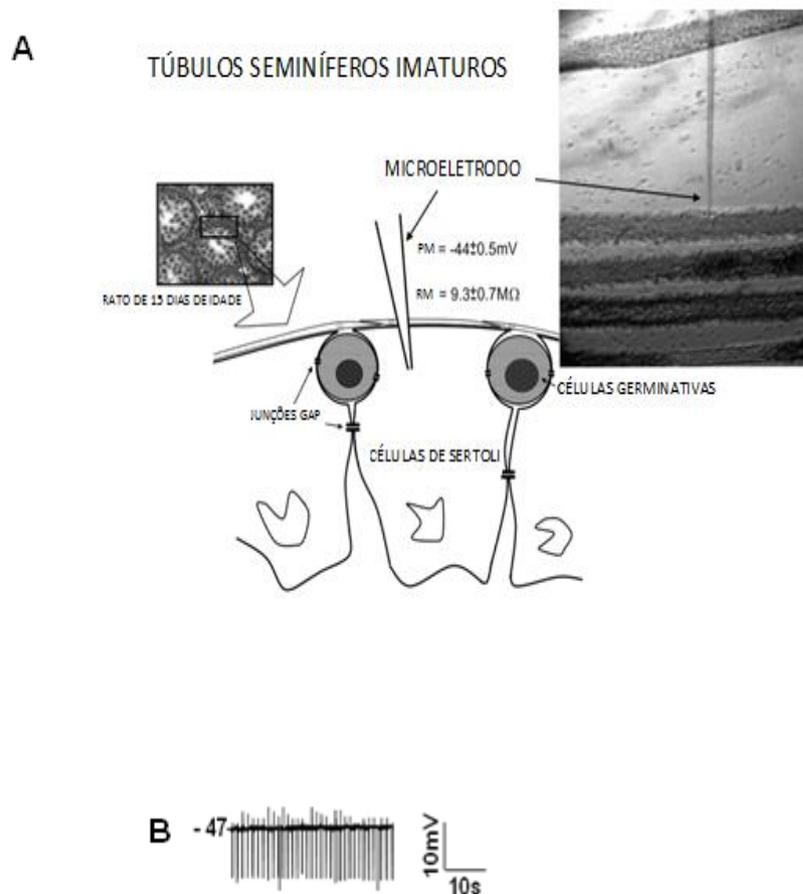


Figura 12:A. Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana e resistência da membrana. **B.** Representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47mV. Os traços verticais correspondem a resistência da membrana

Foram utilizadas apenas células que apresentassem potenciais de membrana mais negativos que -25 mV, uma vez que, de acordo com trabalhos anteriores do laboratório, esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli (Loss, 2004, Cavalari et al., 2012; De Castro et al., 2012; Da Rosa et al, 2015). Após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos, o hormônio testosterona, foi aplicado topicamente à câmara de perfusão para células de todos os grupos, sendo registrado o potencial após a aplicação por pelo menos 5 minutos. Foram registradas e comparadas as variações do potencial e da resistência da membrana de células de Sertoli após a aplicação tópica dos hormônios.

6. TÉCNICA DE *WESTERN BLOTING*

6.1. HOMOGEINEIZAÇÃO DO TECIDO

As amostras de testículos foram descongeladas e homogeneizadas com um tampão de lise (NaCl 150mM, tris 20mM, EDTA 5mM, glicerol, NP 40 10% e PMSF 1mM, pH 7,4), mantido em gelo. Os testículos homogeneizados foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos em centrífuga (Sorvall Rc 5B-rotor SM 24) refrigerada a 4°C. Logo após foi feita a quantificação das proteínas.

6.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas contidas na amostra de um testículo foram quantificadas utilizando a comparação de uma curva padrão com diferentes concentrações proteicas conhecidas e cujas amostras foram lidas em espectrofotômetro em leitora de cubetas (Benchmark Biorad). O método utilizado foi o de Bradford (Bradford, M. 1976) no qual as proteínas das amostras se ligam ao Azul Comassie Brilhante-G-250. Este complexo formado apresenta absorção máxima em um comprimento de onda de 595nm.

6.3. WESTERN BLOTTING

Para quantificar a expressão da proteína do iAR, as proteínas das amostras foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) utilizando um sistema mini-protean da Bio-Rad. Para isso, 45µg de proteínas do homogeneizado foram pipetadas em cada poço de um gel 8%, com tampão de carga (Tris 65mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,03% e β-mercaptoetanol 1:20, pH 6,8) e o padrão de peso molecular correu no mesmo gel. O peso molecular das proteínas estudadas foi verificado pela utilização do marcador padrão de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Helathcare). As amostras foram aquecidas a 90°C por um período de 2 minutos antes de serem aplicadas ao gel. Após a corrida (2h; 100V), as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham) com voltagem de 100 V por 60 minutos na presença de um tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3). Após a transferência, membranas foram bloqueadas com leite em pó (Molico, Nestle) 10% em TTBS (Tris 25mM, NaCl 140mM e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos e posteriormente incubadas overnight a 4°C com os seguintes anticorpos primários: Anti-AR (1:1000 - Santa Cruz), antifosfo-Akt (1:1000 - Santa Cruz) e anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:1000 - Millipore). Todos os anticorpos primários foram diluídos em tampão (TTBS com albumina bovina 2,5%). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS por três períodos de 10 minutos e incubadas com o respectivo anticorpo secundário (Millipore 1:10000 em TTBS) durante duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente. Antes de proceder à revelação por quimioluminescência, as membranas foram novamente lavadas por três períodos de 10 minutos com TBS e submetidas à revelação, com o uso de um sistema de detecção de substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), pois havia H₂O₂ no meio e o anticorpo secundário era acoplado à enzima peroxidase. As membranas foram expostas ao filme autorradiográfico Hyperfilm (Amersham) por um minuto. Os resultados obtidos nas membranas foram relativizados aos valores com o anticorpo primário GAPDH na concentração de 1:1000. Os filmes foram digitalizados e as intensidades das bandas obtidas nas imagens foram analisadas densitometricamente pelo programa ImageJ®.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados o, ANOVA para medidas repetidas de uma via ou ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni e análise de inclinação de curva. As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad InStat versão 3.01, 32 bits para Windows 95/NT (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com), GraphPad Prism® versão 5.0 e software SPSS® versão 17.0. Os testes específicos utilizados em cada experimento foram citados nos resultados. Os gráficos foram construídos com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0. O nível de significância admitido foi de 5% ($p < 0,05$).

8. RESULTADOS

8.1. PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO

8.1.1. PESO CORPORAL

Os animais foram pesados no primeiro dia de tratamento (7^o pdn) e no último dia do tratamento (14^o pdn). Foi utilizada a diferença do peso entre o primeiro e o último dia de tratamento. Observou-se que os grupos não apresentaram mudança significativa no ganho de peso quando comparado ao grupo controle (Fig. 13), embora o grupo cetorelix parece induzir uma leve redução no crescimento corporal.

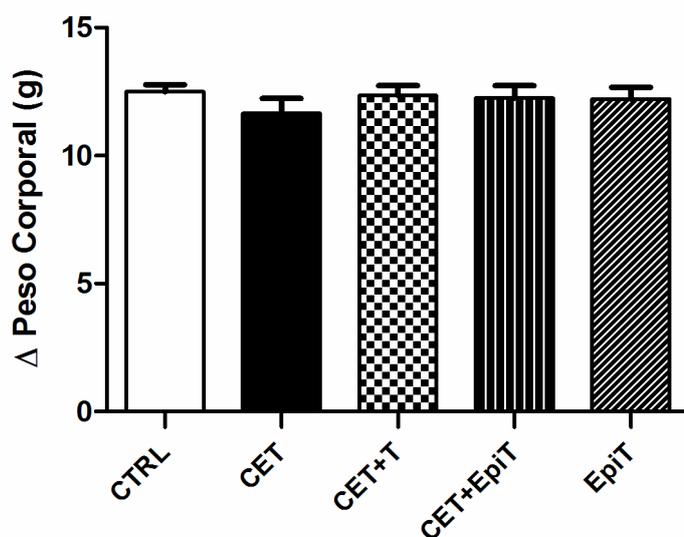


Figura 13. Variação (Δ) no peso corporal (em g) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais. ANOVA de uma via demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos. Controle (CTRL, n = 22), grupo Cetorelix (CET, n = 21), grupo Cetorelix + testosterona (CET + T, n = 22), Grupo Cetorelix + epitestosterona (CET + EpiT, n = 22) e grupo epitestosterona (EpiT, n = 23).

8.1.2. PESO DOS TESTÍCULOS

Após os sete dias de tratamento, os testículos foram removidos, no 14º dia de idade, e observou-se que o peso úmido dos testículos foi reduzido nos animais castrados com cetorelix em comparação com o grupo controle. A epitestosterona tem efeito de recuperar o peso testicular. O grupo castrado e com reposição de testosterona (CET+T) em apresentou uma menor redução no peso testicular em relação ao grupo controle. A epitestosterona em animais não castrados não apresenta nenhum efeito em relação ao grupo controle (Fig. 14).

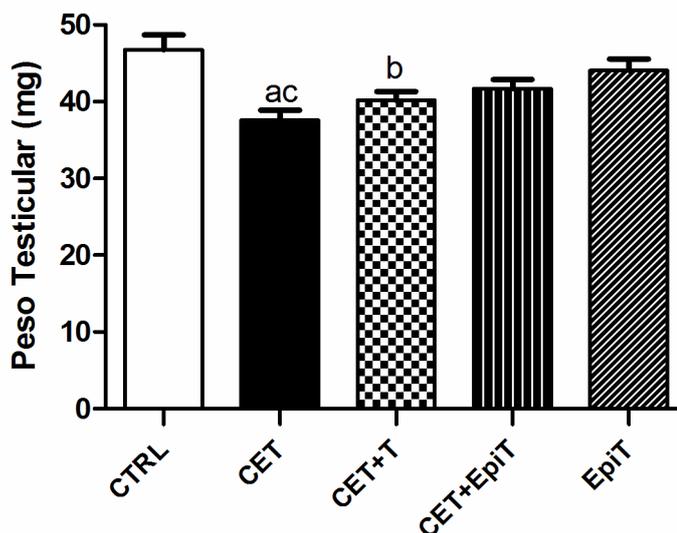


Figura 14. Peso dos testículos (mg) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos hormonais no último dia de tratamento. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,001$ em comparação ao controle, (b) $p < 0,05$ comparado com o controle (c) $p < 0,05$ comparado com EpiT. Controle (CTRL, $n = 22$), grupo Cetorelix (CET, $n = 21$), grupo Cetorelix + testosterona (CET + T, $n = 22$), Grupo Cetorelix + epitestosterona (CET + EpiT, $n = 22$) e grupo epitestosterona (EpiT, $n = 23$).

8.1.3. DISTÂNCIA ANOGENITAL e ÍNDICE ANOGENITAL

Os animais castrados com cetorelix mostraram uma redução significativa na DAG em comparação com o controle e aos demais grupos. A reposição com epitestosterona e com testosterona produziu uma recuperação da DAG, enquanto que o tratamento com epitestosterona em animais não castrados não apresentaram alteração quanto à DAG (Fig. 15) O cálculo do índice anogenital (IAG) (DAG dividida pelo peso corporal) reforça estes resultados mostrando que a inclinação das curvas nos animais castrados é semelhante à do controle se comparado com o grupo castrado (Fig. 16).

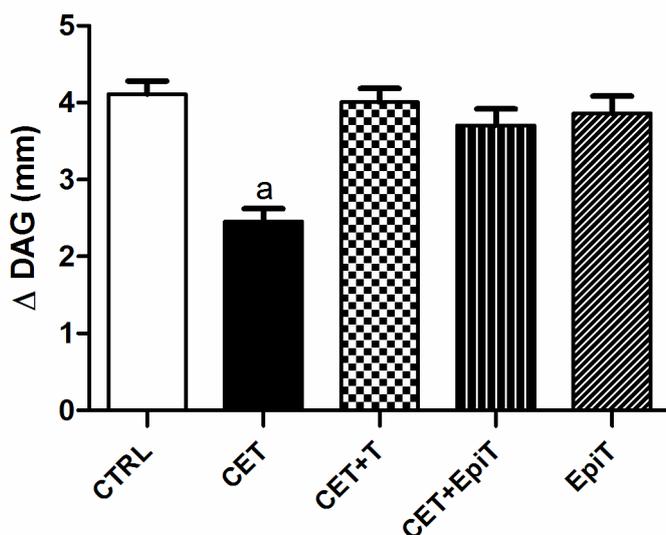


Figura 15 Variação das medidas da distância anogenital (DAG) entre o primeiro e o último dia de tratamento com cetorelix (antagonista GnRH), e de reposição com testosterona ou epitestosterona e do tratamento com epitestosterona. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,001$ em comparação com os demais grupos. Control (CTRL, $n = 22$), Grupo Cetorelix (CET, $n = 21$), grupo Cetorelix + testosterona (CET + T, $n = 22$), grupo Cetorelix + epitestosterona (CET + EpiT, $n = 22$) e grupo epitestosterona (EpiT, $n = 22$).

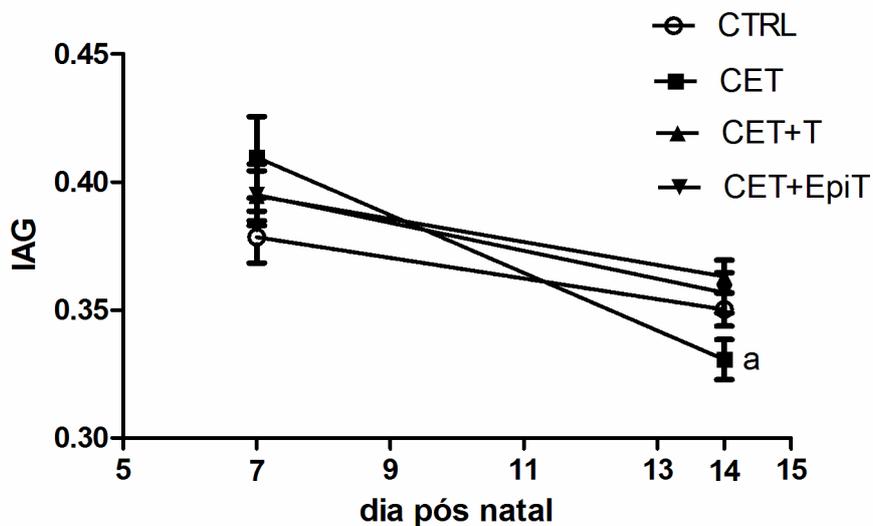


Figura 16. Regressão linear da variação do índice anogenital (IAG) medida no primeiro e no último dia de tratamento. (a) $p > 0,0001$, curva de desvio é muito diferente do CTRL. CTRL ($F = 5,540$; $p = 0,0233$; $n = 21$), CET ($F = 20$; $p < 0,0001$; $n = 21$), CET + T ($F = 7,318$; $p = 0,0098$; $n = 22$) e CET + EpiT ($F = 7,111$; $p = 0,0108$; $n = 22$).

9. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DO GRUPO CONTROLE (CTRL)

A aplicação tópica de testosterona (1 μ M) induziu uma despolarização rápida no potencial de membrana das células de Sertoli, mostrando que a β -ciclodextrina, veículo utilizado para diluição dos hormônios nos tratamentos, não afetou a despolarização da membrana induzida por testosterona, se comparada com resultados de trabalhos anteriores. A resposta despolarizante foi significativa aos 180 segundos após a aplicação de testosterona (Fig.17).

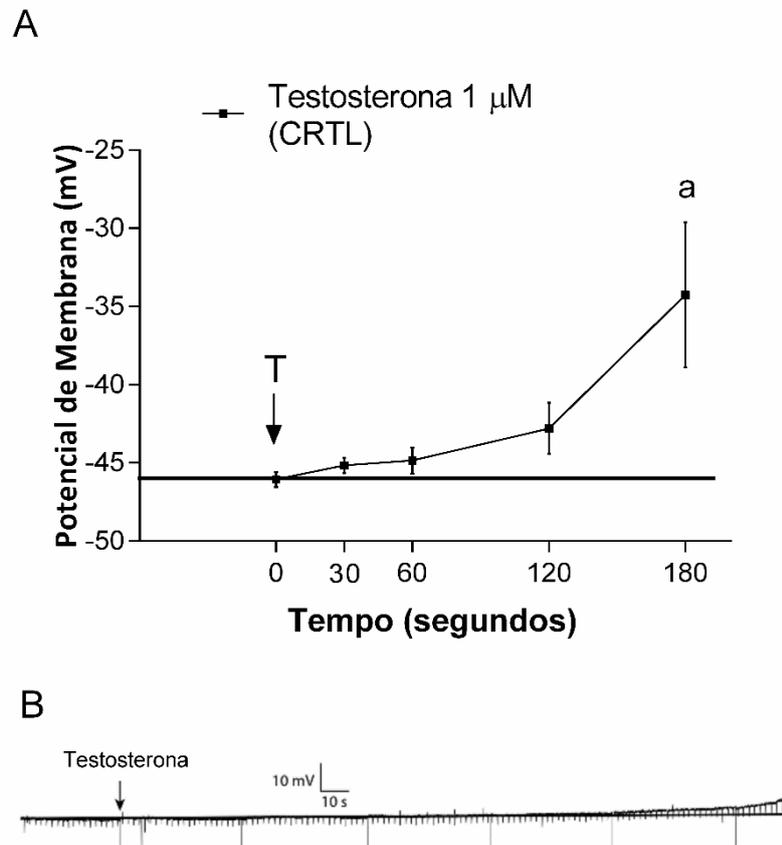


Figura 17. Efeito da aplicação tópica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados de ratos do grupo controle (CTRL). (A) Efeito da administração tópica de testosterona (1 μ M) no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos do grupo CTRL em dpn 14. ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,05$ comparado com o potencial de repouso ($n = 5$) (B) Célula típica do grupo CTRL após a administração tópica de testosterona (1 μ M). Traços verticais correspondem à resistência da membrana.

9.1. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS CASTRADOS COM CETRORELIX (CET)

Foi observada que a aplicação tópica de testosterona (1 μ M) nas células de Sertoli de túbulos seminíferos isolados dos animais tratados com cetorelix (500 μ g/kg de peso

corporal) resulta em uma rápida despolarização do potencial de membrana da célula de Sertoli, que é significativa aos 180 segundos após a aplicação de testosterona ($p < 0,05$; $n = 7$). A castração química não interferiu na resposta despolarizante da testosterona sobre o potencial de membrana das SC (Fig. 19). Este efeito foi semelhante ao observada no grupo controle (CTRL) (Fig. 18).

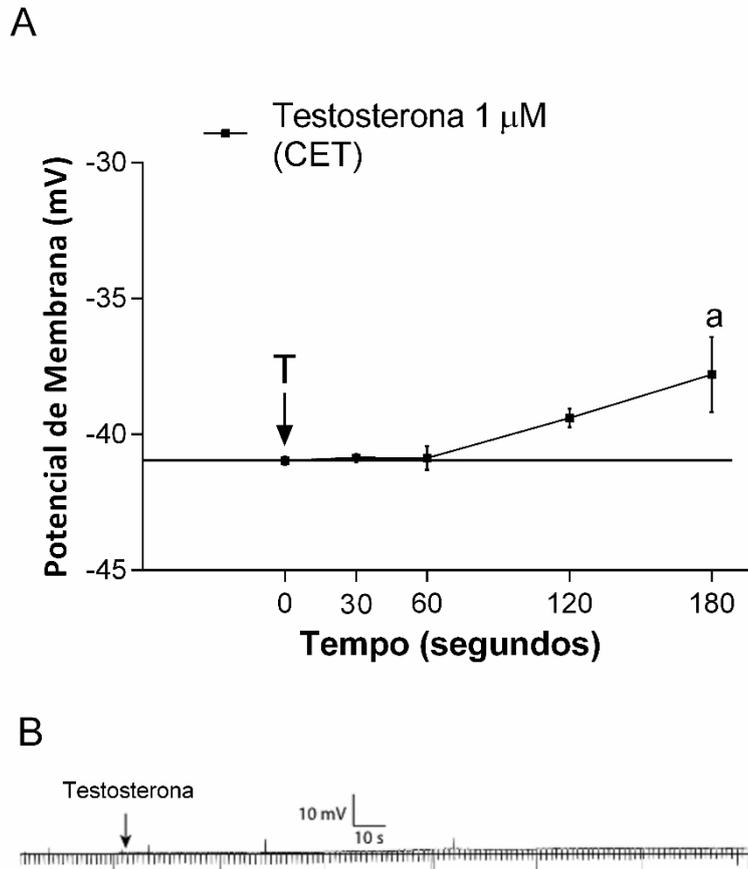


Figura 18. Efeito da aplicação tópica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados de ratos tratados com cetorelix (CET). (A) Efeito da administração tópica de testosterona (1μ M) no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos do grupo CET sobre dpn 14. ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,05$ em comparação com o potencial de repouso ($n = 7$). (B) célula típica de grupo CET depois administração tópica de testosterona. Traços verticais correspondem à resistência da membrana.

9.2. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS TRATADOS COM O CETRORELIX E REPOSIÇÃO DE TESTOSTERONA (CET + T).

A aplicação tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) produziu uma despolarização rápida sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de túbulos seminíferos dos animais do grupo castrado com cetorelix ($500\mu\text{g}/\text{kg}$) e que receberam reposição de testosterona ($2,5\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$). Esta resposta foi significativa aos 180 segundos após a aplicação de testosterona ($p < 0,001$; $n = 5$) e foi semelhante à observada nos animais do grupo controle (Fig. 19).

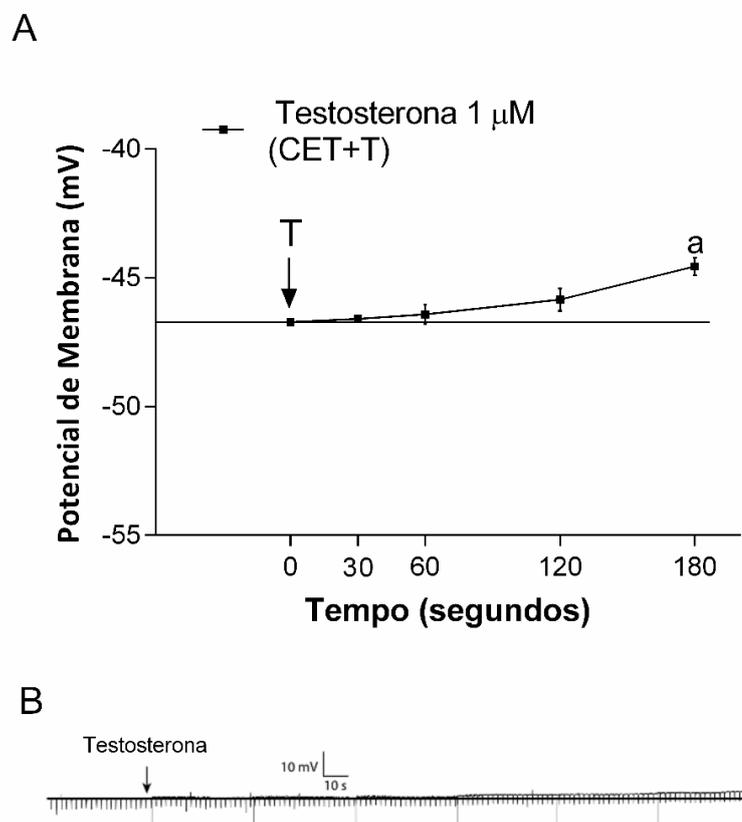


Figura 19. Efeito da aplicação tópica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados de ratos tratados com cetorelix ($500\mu\text{g}/\text{kg}$) e testosterona ($2,5\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$) (CET + T). (A) Efeito da administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos do grupo CET + T em pnd 14. ANOVA de medidas repetidas seguida por Pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,001$ em comparação com o potencial de repouso ($n = 5$) (B) Célula típica após a administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) CET + T. Traços verticais correspondem à resistência da membrana.

9.3. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DO GRUPO CASTRADOS COM CETRORELIX E EPITESTOSTERONA (CET+EpiT)

A aplicação tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) não teve efeito no potencial de membrana das células de Sertoli de túbulos seminíferos dos animais que foram tratados com cetorelix ($500\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) e tiveram a reposição com epitestosterona ($2,5\text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal). O tratamento anulou a despolarização induzida por testosterona sobre o potencial de membrana de SC como observada nos demais grupos ($n = 12$) (Fig. 20).

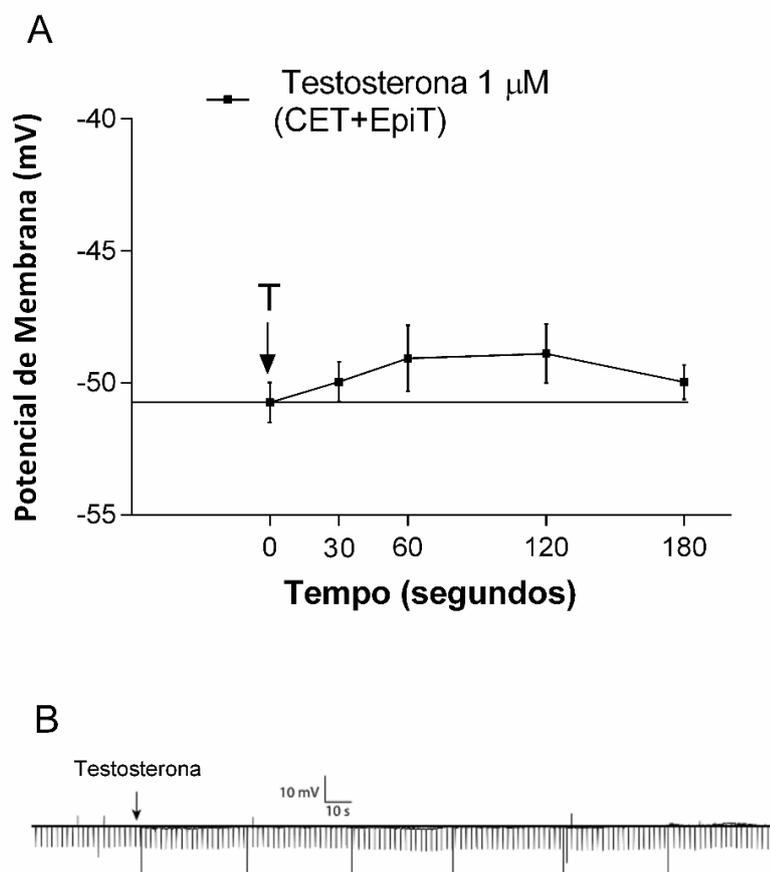


Figura 20. Efeito da aplicação tópica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados de ratos tratados com o antagonista de GnRH (cetorelix) e epitestosterona (CET+EpiT). (A) Efeito da administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) sobre o potencial de membrana das SC de ratos do grupo CET + EpiT em pnd 14. ANOVA de medidas repetidas ($n = 11$). (B) Célula típica de grupo CET + EpiT após a administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$). Os traços verticais correspondem à resistência da membrana.

9.4. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS TRATADOS COM EPITESTOSTERONA (EpiT)

A aplicação tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) induziu uma despolarização rápida sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de túbulos seminíferos de ratos do grupo tratado somente com epitestosterona ($2,5\text{ mg / kg}$ de peso corporal), sendo significativo a 120 e 180 segundos. O tratamento com epitestosterona não alterou a resposta não-clássica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli (Fig 21).

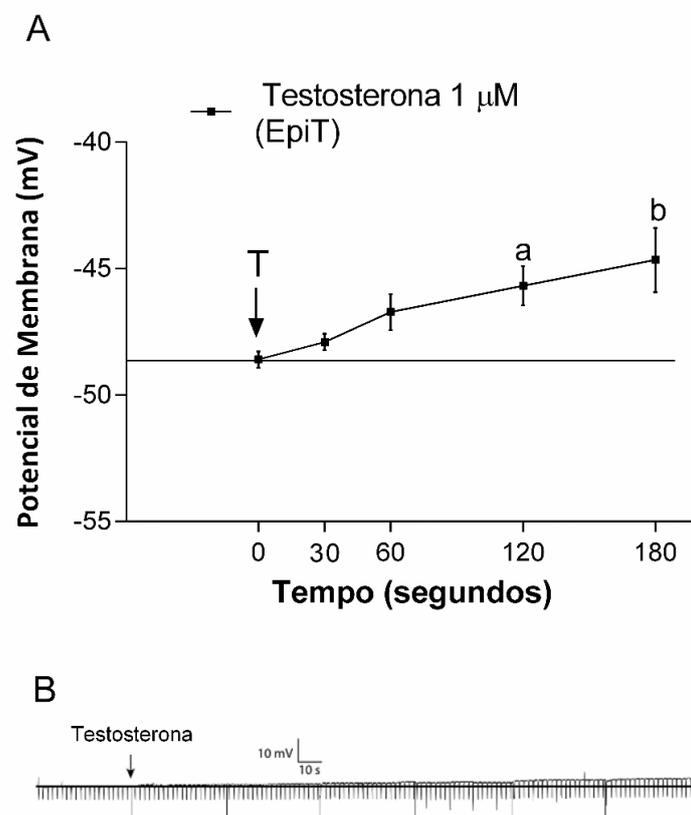


Figura 21. Efeito da aplicação tópica da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos isolados de ratos tratados com epitestosterona (EpiT). (A) Efeito da administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$) no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos do grupo EpiT no dpn 14. ANOVA de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,05$ em 120 segundos e (b) $p < 0,001$ a 180 seg em comparação com o potencial de repouso ($n = 5$). (B) Célula típica de grupo EpiT após a administração tópica de testosterona ($1\mu\text{M}$). Os traços verticais correspondem à resistência da membrana.

9.5. COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS DA TESTOSTERONA NAS CÉLULAS DE SERTOLI DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS AOS 180 SEGUNDOS

Para podermos comparar estatisticamente o efeito eletrofisiológico da testosterona entre os diferentes grupos experimentais, foi selecionado o tempo de 180 segundos após a aplicação tópica da testosterona (1 μ m). Observamos que aos 180 segundos a resposta eletrofisiológica dos animais castrados e submetidos à reposição com epitestosterona (cetorelix+EpiT) apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo castrado com reposição de testosterona (cetorelix+T) ($p < 0,01$). Entretanto, não há diferença significativa em relação ao grupo castrado (cetorelix) e ao grupo de ratos tratados unicamente com epitestosterona (EpiT) (Fig. 22).

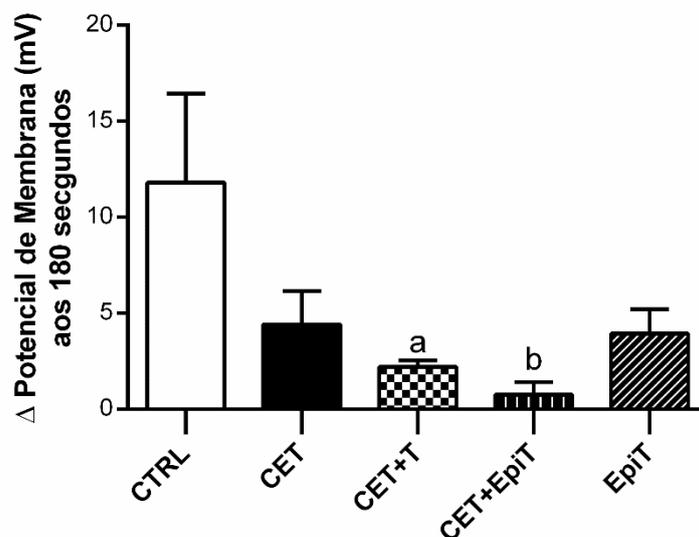


Figura 22. Variação (Δ) do potencial de membrana das células de Sertoli aos 180 segundos após a aplicação de testosterona (1 μ M). O grupo controle (CTRL, n = 5), grupo Cetorelix (CET, n = 7), grupo Cetorelix + testosterona (CET + T, n = 5), grupo Cetorelix + Epitestosterona (CET EpiT +, n = 11) e grupo Epitestosterona (EpiT, n = 5). ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,05$ e (b) $p < 0,01$ em comparação com CTRL.

10. WESTERN BLOTTING

10.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE iAR e AKT EM TESTÍCULOS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foi feita a análise da expressão do iAR após os tratamentos e se observou que nos animais castrados quimicamente e tratados com epitestosterona houve uma redução significativa ($p < 0,05$) da expressão do iAR em comparação ao grupo controle (Fig 23A). Quanto à análise da expressão da AKT, não houve diferença significativa entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Fig. 23B).

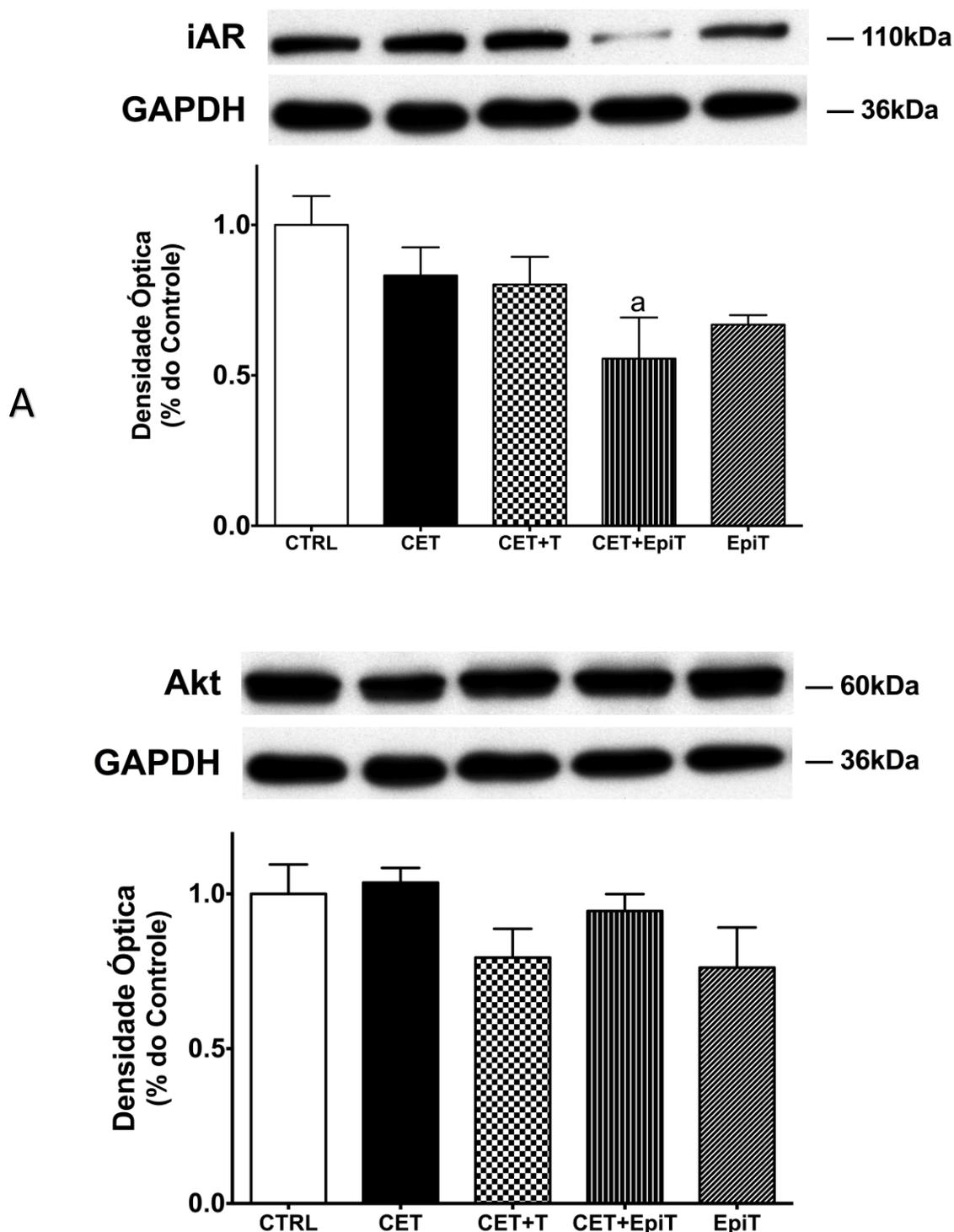


Figura 23. Expressão da proteína iAR (A) e da proteína Akt (B) nos túbulos seminíferos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na expressão do receptor iAR (A) nos túbulos seminíferos dos animais castrados com cetorelix e que receberam epitestosterona (CET+EpiT). Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na expressão da Akt (B) entre os grupos experimentais. Os resultados foram normalizados em relação à expressão da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e expressos em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

11. IMUNO-HISTOQUÍMICA

O presente estudo também avaliou a imunorreatividade ao iAR em testículos de ratos Wistar após os tratamentos. A reação imuno-histoquímica foi detectada pela visualização de um precipitado de coloração parda, que não foi observado quando o anticorpo primário foi omitido. Como os cortes foram contracolorados com hematoxilina, os núcleos das células germinativas apresentam coloração azulada (Fig. 24).

A imunorreatividade ao iAR foi observada nos núcleos das células de Sertoli, das células de Leydig e das células peritubulares. A análise densitométrica da intensidade da imunorreatividade mostrou diferença significativa entre os grupos tratados com epitestosterona reduzindo significativamente a densidade em relação aos grupos controle e cetorelix (Fig. 25).

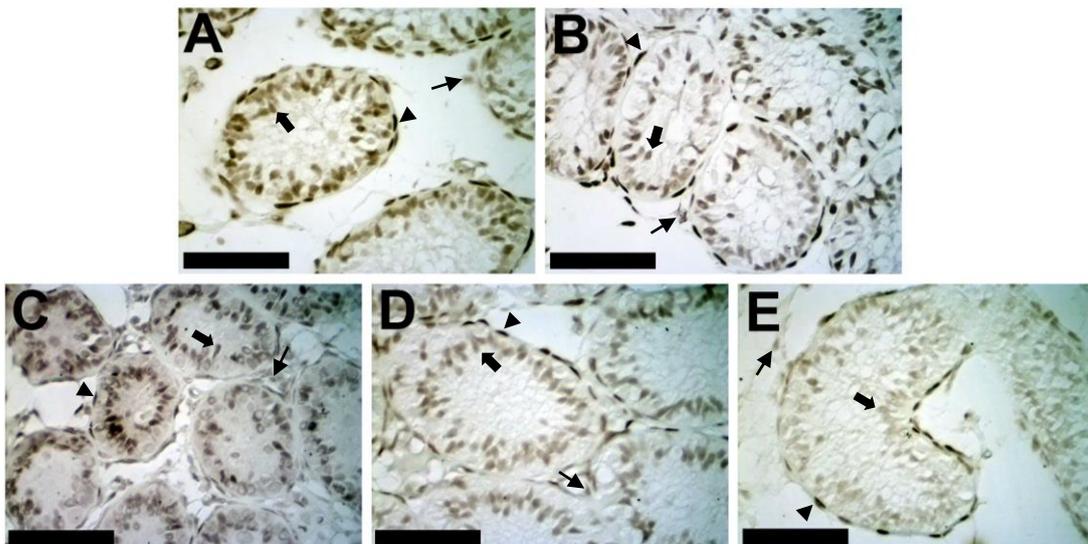


Figura 24. Fotomicrografias mostrando a imunorreatividade ao receptor intracelular de andrógenos (iAR) nos túbulos seminíferos dos animais dos diferentes grupos experimentais. A imunorreatividade foi observada nos núcleos das células de Sertoli (setas largas), das células de Leydig (setas finas) e das células peritubulares (cabeças de seta). Grupo controle (A), Grupo Cetorelix (B), Grupo cetorelix +Testosterona (C), Grupo Cetorelix + Epitestosterona (D) e Grupo Epitestosterona (E). Barra de calibração: 50 µm.

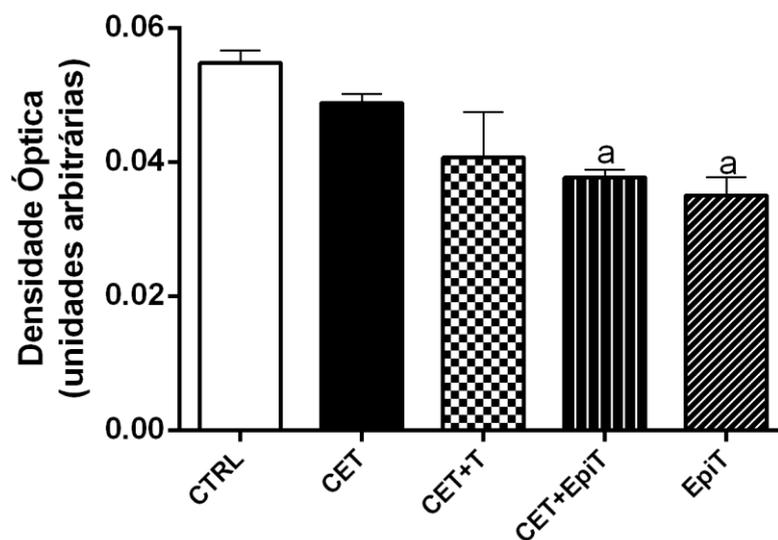


Figura 25. Valores da densidade óptica da imunoreatividade ao iAR nos núcleos das células de Sertoli dos diferentes grupos experimentais. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. (a) $p < 0,05$ em comparação ao controle e ao grupo cetorelix. Controle (CTRL, $n = 20^*$), grupo Cetorelix (CET, $n = 20^*$), grupo Cetorelix + testosterona (CET + T, $n = 10$), Grupo Cetorelix + epitestosterona (CET + EpiT, $n = 20^*$) e grupo epitestosterona (EpiT, $n = 20^*$). * n = conjunto de células de 20 túbulos seminíferos de 2 animais.

12. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram os efeitos do tratamento com epitestosterona e com testosterona em ratos Wistar imaturos normais e castrados quimicamente com um antagonista do GnRH sobre parâmetros do desenvolvimento e na resposta eletrofisiológica da testosterona na membrana das células de Sertoli. Os ratos foram submetidos à castração com cetorelix e à reposição hormonal com testosterona ou epitestosterona por um período de 7 dias (7-14pnd) de forma que conseguimos verificar o efeito isolado de cada hormônio. Os poucos estudos publicados que utilizaram o tratamento com epitestosterona foram realizados em ratos não castrados. Dessa forma, para permitir uma comparação com os dados da literatura, utilizamos um grupo de ratos (não castrados) que foram tratados exclusivamente com epitestosterona (Starka 2001; Starka 2003). O cetorelix é um antagonista do GnRH que produz castração química por supressão da liberação de FSH e LH (Atanassova et al., 2005). Em nosso trabalho utilizamos uma dose de 500 µg/kg de cetorelix para tratar os animais e a opção desta dose foi baseada em estudos anteriores, nos quais foi observado que a administração de cetorelix em ratos Wistar por um período de 10 dias (5pnd-15pnd) suprime a síntese de FSH e LH (52% a 86%), reduzindo a concentração desses hormônios no plasma sanguíneo aos níveis de castração de andrógenos (WalczakJedrzejowska et al., 2011). A dose de testosterona e epitestosterona utilizada nos tratamentos que realizamos neste trabalho foi de 2,5mg/kg. Segundo alguns autores, a dose de testosterona de 2,5mg/kg, quando utilizada em ratos imaturos hipogonadais (castrados), produz um aumento na concentração de testosterona intratesticular e sérica. Este aumento é considerado suprafisiológico para ratos imaturos com a mesma idade utilizada nos nossos experimentos (D'Souza et al., 2005; WalczakJedrzejowska et al., 2011). A dose de 2,5mg/kg de testosterona não influencia na secreção de FSH (WalczakJedrzejowska et al., 2009). Em ratos normais tratados por três semanas com doses crescentes de epitestosterona, houve redução significativa nos níveis de testosterona e, embora não tenha ocorrido alteração nos níveis de LH, houve uma diminuição na expressão do RNAm para o LH, demonstrando um efeito deste hormônio ao nível das células hipofisárias (Lapcik et al., 1994).

Os níveis normais de testosterona em ratos imaturos são baixos, mas são essenciais para o desenvolvimento das células de Sertoli que dão suporte as células germinativas, esse desenvolvimento se reflete diretamente no crescimento testicular e no sucesso da espermatogênese (Johnston D.S. et. al., 2001; Scott H.M. et al., 2008).

Em nosso trabalho verificamos que os tratamentos hormonais não alteraram o ganho de peso corporal dos animais (Fig. 13). Outro estudo, entretanto, encontrou respostas diferentes no qual o cetorelix sozinho reduziu o ganho de peso corporal quando aplicado na mesma dose que utilizamos por um período de 10 dias, assim como os castrados com cetorelix e submetidos à reposição com testosterona (2,5mg/kg/dia) (Walczak-Jedrzejowska, 2011). Em nosso trabalho não obtivemos esse resultado, talvez por termos tratado os animais por um período menor de tempo. Por outro lado, a eficácia do nosso tratamento com cetorelix foi confirmada pela redução da distância anogenital e do peso testicular. Os animais tratados com epitestosterona (castrados e normais) também não apresentaram alteração significativa no peso corporal. Em outro estudo, a redução no ganho do peso corporal, porém não de forma significativa, foi verificada em ratos normais tratados com epitestosterona (2mg/kg/dia) por um período de 21 dias e não houve alteração no peso em ratos tratados com Casodex, um antiandrogênico (antagonista de iAR). Broulik P. D. & Starka L., 1997). Em termos de significância, nosso trabalho encontrou o mesmo resultado obtido por Broulik, porém o fator determinante para uma tendência na redução do ganho do peso corporal pode ter sido o tempo de tratamento que foi três vezes mais longo que o que realizamos (Broulik & Starka, 1997).

A dose administrada de cetorelix (500µg/kg) reduz também o nível de FSH no plasma sanguíneo aproximadamente em 52%. Provavelmente este seja um fator importante na redução do peso testicular, assim como foi observado que reduz o número de células de Sertoli e também no número de células germinativas (Walczak-Jedrzejowska, 2011).

O resultado que encontramos relacionado à redução do peso testicular quando aplicado o cetorelix está de acordo com outro estudo no qual, utilizando a mesma dose do antagonista de GnRH, o peso testicular reduziu pela metade em relação ao controle. No entanto, outros antiandrogênicos como a flutamida (bloqueador do receptor intracelular de andrógenos) não interferem no peso testicular de ratos, mas um

antagonista de GnRH (detirelix), semelhante ao cetorelix, é capaz de reduzir o peso testicular em ratos adultos (Chandolia R.K. et al., 2001). O tratamento com cetorelix e com reposição de testosterona restaura levemente o peso testicular, apesar do resultado neste grupo ainda ser diferente do controle. Surpreendentemente, o tratamento de reposição com epitestosterona não difere do grupo controle, assim como, o tratamento somente com epitestosterona não afetou o peso testicular. Os poucos trabalhos com epitestosterona em ratos normais não demonstraram redução do peso testicular. Foi demonstrada em 1979 por Larminat M.A. & Blaquier, que o tratamento com a epitestosterona reduz significativamente peso de vesículas seminais, próstata, porém não reduz peso testicular.

A medida da DAG é um fator morfológico andrógeno-dependente e é um biomarcador da ação androgênica principalmente na vida fetal. A DAG, ao nascimento, reflete o dimorfismo sexual, e nos machos é cerca de 3 a 5 vezes maior que na fêmea. Há algum tempo vem se estabelecendo que a distância anogenital reflete na ação androgênica durante a vida fetal dentro de um discreto período denominado de “janela de programação da masculinização”, o que se reflete no tamanho adulto dos testículos, próstata, vesículas seminais e pênis (Drake A.J. et al., 2009; Welsh M. et al., 2008).

Hoje está bem estabelecido que a distância anogenital não é só um simples determinante da ação androgênica, mas está significativamente relacionada com o número de células de Sertoli e o peso do testículo. Esses resultados foram confirmados em ratos no final da vida fetal, no início da puberdade e na vida adulta. Está estabelecido que o número de células de Sertoli é uma medida indireta determinante do tamanho testicular (Scott HM 2008; Sharpe R.M. et al., 2003).

A medida da DAG tem propriedades atraentes em termos de potencial clínico, pois é uma técnica bastante acessível e não invasiva. Em função dos bons resultados obtidos em roedores, essa técnica motivou diversos estudos clínicos em homens e meninos nos quais a DAG foi associada como um biomarcador confiável da ação dos androgênios durante a vida fetal (Welsh M. et al., 2008; Macleod D.J. et al., 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o cetorelix foi capaz de reduzir a DAG e o peso testicular, mostrando a eficácia do cetorelix na castração. Nossos resultados corroboram com um estudo anterior no qual o cetorelix utilizado na mesma dose (por um período de 10 dias), e em ratos da mesma idade promoveu um

decréscimo no peso testicular e no número de células de Sertoli em cerca de 60% em relação ao controle. O mesmo foi visto para células germinativas que foram reduzidas em função do decréscimo das células de Sertoli (Walczak-Jedrzejowska, 2011). A diminuição da DAG observada neste trabalho após a ação do cetorelix sozinho pode estar relacionada a uma diminuição das secreções de FSH e testosterona, pois são dois hormônios importantes na regulação da produção de células de Sertoli e desenvolvimento testicular, o que reflete diretamente no parâmetro do peso testicular (Atanassova et al., 2005; Walczak-Jedrzejowska, 2011).

Inicialmente a DAG foi utilizada para certificar o efeito de castração com cetorelix, mas para nossa surpresa tanto a testosterona quanto a epitestosterona tiveram efeito de recuperar a DAG de forma similar. O efeito da testosterona era esperado, uma vez que a DAG parece ser diretamente dependente do nível dos andrógenos. Em um estudo recente, utilizando ratos adultos, Mitchell et al (2015) verificaram que a castração em ratos adultos reduz significativamente a DAG, indicando a existência de uma plasticidade deste parâmetro nos animais maduros. Além disso, a aplicação de flutamida, um potente antagonista do iAR, aumenta significativamente o nível de testosterona e tem efeito de reduzir o peso dos tecidos, como a vesícula seminal, alvo específico da ação de andrógenos. No entanto, a flutamida não afetou a DAG durante o período do tratamento destes animais, indicando que o desenvolvimento dessa distância nos animais adultos não estaria relacionado com a ação androgênica no receptor intracelular, pois a presença da testosterona manteve um valor normalizado da DAG (Mitchell R.D. et al, 2015).

Por outro lado, a administração de flutamida no período perinatal interfere na DAG dos filhotes machos que apresentam uma redução significativa da DAG em relação aos grupos controles. Além disso, a alteração desse parâmetro, induzida na vida fetal, se mantém até mesmo na vida adulta, mostrando a importância da ação androgênica durante a vida fetal (Leonelli C, et al., 2011, van den Driesche et al., 2011). Alguns autores acreditam que a exposição aos andrógenos durante a vida pós-natal não tem tanta influência na DAG, isso devido ao fato de que ratos tratados com flutamida logo após o nascimento (1 dpn a 15 dpn) não apresentaram mudanças significativas na DAG tanto em idade pré-púbere quanto na vida adulta, porém provamos que a castração, e

a reposição com testosterona em animais castrados são capazes de alterar a medida da DAG (van den Driesche S. et al 2011).

Esses relatos, somados aos resultados encontrados neste trabalho, induzem a hipótese de que a testosterona esteja agindo de modo independente do iAR, provavelmente mantendo a distância anogenital por estar atuando nos testículos via um receptor de membrana para andrógenos. Em nosso trabalho, os animais castrados e submetidos à reposição com testosterona reverteram o efeito na castração em relação à medida da DAG e ao índice anogenital e produziu uma leve restauração do peso testicular (Fig. 14 e 15). Em outro estudo, a reposição hormonal com testosterona em ratos castrados com cetorelix também foi capaz de restaurar o peso do testículo, o número das células de Sertoli, os espermatócitos conseguiram entrar em meiose e a sobrevivência destas células foi restaurada, mesmo com as concentrações de FSH reduzidas (Walczak-Jedrzejowska, 2011). A restauração do número das células de Sertoli e a recuperação do peso testicular observados no estudo anterior podem explicar o aumento da DAG que obtivemos no nosso trabalho (Fig15). A reposição com testosterona também reduz o aumento da apoptose de células germinativas causada pela administração de cetorelix (Walczak-Jedrzejowska, 2011; De Gendt et al., 2004).

O grupo dos animais castrados e tratados com epitestosterona surpreendentemente também restaurou o efeito da castração sobre a medida da DAG, assim como o grupo EpiT (ratos não-castrados tratados com epitestosterona) não afetou o parâmetro de medida da DAG. Os resultados de outros trabalhos com epitestosterona mostram que esse hormônio teria efeito antiandrogênico para vários tecidos dependentes de andrógenos e os níveis de testosterona circulantes em ratos tratados por um período de três semanas com o hormônio (Lapick et al., 1994; de Larminat & Blaquier 1979). Apesar da epitestosterona apresentar efeito antiandrogênico em diversos estudos, em nossos resultados, em relação à medida da distância anogenital isso não acontece, pois, os animais tratados apenas com epitestosterona não apresentaram redução na medida da DAG. Pelo contrário, o efeito de redução da DAG resultante de uma semana de tratamento com cetorelix foi revertido com a reposição hormonal de epitestosterona (Fig. 15). Podemos relacionar nossos resultados ao encontrado por Walczak-Jedrzejowska (2011), que também, ao repor testosterona em animais castrados com cetorelix, reverteu o efeito antiandrogênico da castração no

desenvolvimento e no tamanho dos testículos de ratos imaturos. Essa ação semelhante da epitestosterona e testosterona ao recuperar a DAG, confirmam que o mecanismo não clássico é o mesmo para os dois hormônios

Estudos anteriores em nosso laboratório descrevem que a testosterona e a epitestosterona apresentam efeitos semelhantes sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos Wistar imaturos e também promovem um aumento da captação de cálcio em testículos inteiros. Estas respostas são rápidas e foram identificadas como efeitos não-clássicos, pois a flutamida (antagonista do iAR) não inibe os efeitos, tanto na captação do cálcio como na despolarização das células de Sertoli (De Castro et al, 2013; Von Ledebur et al., 2002; Leite et al., 1999). Este efeito não clássico também está presente em células de Sertoli de ratos Wistar neonatos, que ainda não possuem o iAR (da Rosa L.A. et al, 2015). Nesta idade, a testosterona e a epitestosterona aumentam a captação de cálcio em 5 minutos como produzem uma rápida despolarização no potencial de membrana das células de Sertoli dos ratos neonatos (da Rosa L.A. et al, 2015). Em nosso estudo, a testosterona produziu uma despolarização do potencial de membrana como foi observado nos estudos anteriores do laboratório para ratos de 12-14 dias de idade (Fig. 17) (De Castro A. et al., 2013, E.S. Loss et al., 2004, Cavalari F.C. et al., 2012). Esse efeito envolve um mecanismo de membrana através de um receptor ainda não identificado que ativa a via da fosfolipase C que promove a hidrólise do fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) (Loss et al., 2004). A falta de PIP₂ reduz as cargas negativas próximas à membrana provocando o fechamento de canais de K⁺ sensíveis ao ATP, que conseqüentemente ativam canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem, resultando no influxo de cálcio (Loss et al., 2004, Loss et al., 2011).

Em nosso trabalho, o tratamento de uma semana com cetorelix não altera o padrão clássico da resposta da testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos (Fig. 18), porém os ratos castrados e submetidos à reposição hormonal de testosterona (CET+T) tiveram o padrão de despolarização diminuído (Fig.19). Já a resposta da testosterona em células de Sertoli dos ratos castrados e submetidos à reposição hormonal com epitestosterona (CET+ EpiT) se mostrou modificada, não houve despolarização (Fig. 20). A redução do efeito eletrofisiológico da testosterona nos animais no grupo CET+T e a anulação do efeito da testosterona que observamos no grupo CET+EpiT podem estar revelando uma alteração que os animais tratados com

etrorelix (baixo FSH e LH) estão sofrendo. Esta alteração pode causar uma "downregulation" no receptor de membrana quando os animais foram expostos à testosterona e à epitestosterona, pois esse efeito não foi observado nos animais não castrados tratados apenas com epitestosterona (grupo EpiT, Fig. 21).

O efeito antiandrogênico da epitestosterona vem sendo alvo de alguns poucos estudos (revisado em Starka, 2005). Alguns autores indicam que esse hormônio causa uma inibição da enzima 5 α -redutase, inibindo assim, a conversão da testosterona em di-hidrotestosterona (Starka et al 1997; Starka 20015). Em resultados preliminares do nosso laboratório foi observado que um tratamento com doses elevadas de epitestosterona produz uma redução do RNA mensageiro do iAR em testículos, além de reduzir o peso de certos órgãos dependentes de andrógenos (dados ainda não publicados de Castro, Trabalho de Conclusão, 2010). Neste trabalho, utilizando a técnica de Western blot, foi observada uma redução significativa da expressão proteica do iAR em testículos de animais castrados e com reposição de epitestosterona, mostrando uma clara ação antiandrogênica da epitestosterona (via um efeito genômico clássico) e corroborando com os dados de De Castro A.L. (2010). Na tentativa de identificar se a redução da expressão do iAR observada em homogenatos de túbulos seminíferos era específica para as células de Sertoli (o tipo celular avaliado eletrofisiologicamente no presente trabalho), fizemos uma análise da imunorreatividade dos túbulos ao iAR. Os resultados da densitometria mostraram uma redução na imunorreatividade ao iAR nas células de Sertoli dos grupos tratados com epitestosterona. Este efeito foi observado tanto nos animais castrados e com reposição como os tratados somente com epitestosterona. Além das células de Sertoli, também foi observado imunorreatividade ao iAR em outros tipos celulares, como as células de Leydig ou as células peritubulares, por exemplo. No momento, cabe salientar que as células peritubulares apresentaram uma intensa imunorreatividade ao iAR. A imunorreatividade encontrada nos diferentes tipos celulares neste trabalho está de acordo com o que está descrito para testículos desta idade (Griswold, 2015). Ainda falta uma análise da variação da densidade óptica para imunorreatividade ao iAR nos outros tipos celulares em função dos diferentes tipos de tratamento.

Além da expressão do iAR, também foi avaliada, neste trabalho, a expressão da proteína Akt. A análise por Western blot não mostrou diferenças significativas na

expressão da Akt entre os grupos experimentais. Entretanto, cabe salientar que o presente trabalho avaliou apenas a Akt total, sem fazer a análise comparativa entre a quantidade total da enzima (Akt total) e a porcentagem de enzima presente na forma ativa (fosforilada). Assim, não é possível afirmar que os efeitos significativos da epitestosterona na resposta eletrofisiológica das células de Sertoli à testosterona (efeitos não-clássicos), não sejam dependentes da via da PI3K/Akt. Mesmo que a epitestosterona não modifique a expressão da Akt, esse hormônio pode estar inibindo as ações não-clássicas da testosterona por controlar mecanismos regulatórios rápidos, como processos de fosforilação/defosforilação (Walker, 2012). Experimentos adicionais, avaliando a relação Akt total/Akt fosforilada são necessários para confirmar essa hipótese.

Todos esses resultados mostram que a epitestosterona pode estar exercendo um papel de importante no período da imaturidade em relação aos efeitos antiandrogênicos demonstrados pela redução do iAR. Além disso, esse hormônio apresenta similaridade nos efeitos não clássicos com a testosterona, indicando que esses efeitos não clássicos são preservados durante o período de imaturidade, uma vez que foi observado que a concentração de epitestosterona pode estar mais elevada que a da testosterona durante esse período (Lapsig, 1995).

A importância relativa da epitestosterona na fase proliferativa do rato imaturo ainda deve ser mais compreendida, porém devemos enfatizar que a epitestosterona parece ser importante para o desenvolvimento testicular, principalmente por sua ação nas células de Sertoli. Ainda é necessário obter uma melhor compreensão de todos os fatores que mantêm a função na proliferação e na maturação das células de Sertoli, processos fundamentais para uma fertilidade normal e bem-sucedida na vida adulta.

13. CONCLUSÃO

- A epitestosterona apresentou um efeito semelhante ao da testosterona no desenvolvimento genital, verificado pela medida da DAG em ratos imaturos castrados quimicamente com cetorelix (antagonista de GnRH).
- O tratamento com epitestosterona nos ratos castrados com cetorelix reduziu a expressão testicular do receptor intracelular de andrógenos.
- O tratamento com epitestosterona nos ratos castrados com cetorelix e nos ratos intactos reduziu a imunorreatividade ao iAR em células de Sertoli.
- O tratamento com epitestosterona nos ratos castrados com cetorelix alterou a resposta do efeito não clássico da testosterona no potencial de membrana das células de Sertoli.
- Epitestosterona e Testosterona são importantes para o desenvolvimento genital do animal.

14. REFERÊNCIAS

- Antlsperger, G., Schmid, G. Toxicological comparison of cyclodextrins. In: Szejtli, J., Szente, L. (Eds.), Proc. of the 8th Int. Symp. on Cyclodextrins. pp. 149–155, 1996.
- Arimasa N., Kochakian C.D. Epitestosterone and 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol: the characteristic metabolites of androst-4-ene-3,17-dione produced by mouse kidney in vitro. *Endocrinology*, v.92, p.72-82, 1973.
- Bajusz S, Kovacs M, Gazdag M, Bokser L, Karashima T, Csernus VJ, Janaky T, Guoth J and Schally AV 1988 Highly potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1637–1641, 1988
- Bellemare, V. et al., Characterization of 17alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity (17alpha-HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone. *BMC biochemistry*, 6, p.1, 2005.
- Bellringer, M.E., Smith, T.G., Read, R., Gopinath, C., Olivier, P. b-Cyclodextrin: 52 week toxicity studies in the rat and dog. *Food Chem. Toxicol.*33, 367–376, 1995.
- Benten WPM, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* 13: 123-33. 9, 1999.
- Benten WPM, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Cell Biol.* 10: 3113-23, 1999.
- Blok L.J., Bartlett J.M., Bolt-De Vries J., Themmen A.P., Brinkmann A.O., Weinbauer G.F., Nieschlag E., Grootegood J.A. Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. *International Journal of Andrology*, v.15, p.182–198, 1992.
- Blok L.J., Themmen A.P., Peters A.H., Trapman J., Baarends W.M., Hoogerbrugge J.A. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression is Sertoli cells and other cell types. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.88, p.153–164, 1992.

Bremner, W. J., Millar, M. R., Sharpe, R. M., and Saunders, P. T. K. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135, 1227–1234, 1994.

Bradford, M. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254, 1976.

Broulik P.D., Starka L. Effect of Antiandrogens Casodex and Epitestosterone on Bone Composition in Mice. *Bone*.v.20, n.5, p.473-475, 1997.

Bruder, J.M., Spaulding, A.J., Wierman, M.E. Phorbol ester inhibition of rat gonadotropin-releasing hormone promoter activity: role of Fos and Jun in the repression of transcription. *Mol. Endocrinol.* 10, 35–44, 1996.

Buzek SW, SanbornBM. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod*-39:39–49, 1988.

Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657, 2002.

Cao XN, Yan C, Liu DY, Peng JP, Chen JJ, Zhou Y, Long CL, He DW, Lin T, Shen LJ, Wei GH³. Toxicol Lett.. Fine particulate matter leads to reproductive impairment in male rats by overexpressing phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway.;237(3):181-90. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.06.015. Epub 2015 Jun 23, 2015.

Carson MA, Schrader WT, O'Malley BW: Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11:201, 1990.

Cavalari, F.C. et al.,. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: effects of nandrolone decanoate and catechin. *Steroids*, 77(1-2), pp.118–25, 2012

Chan V, Clayton RN, Knox G, Catt KJ. Ontogeny of pituitary GnRH receptors in the rat. *Endocrinology* 1981; 108:2086–2092.

Chandolia RK, Weinbauer GF, Fingscheidt U, Bartlett JM & Nieschlag E. Effects of flutamide on testicular involution induced by an antagonist of gonadotrophin-releasing hormone and on stimulation of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone in rats. *J ReprodFertil* 93, 313–323, 1991.

Chandolia, R.K., Weinbauer, G.F., Behre, H.M. & Nieschlag, E. Evaluation of a peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *J. steroid Biochem. moi Biol.* 36, 367-375, 1991.

Cheng C, Leong P: Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. *Endocr Rev*, 26: 283–306, 2005.

Cheng Y. & Mruk D. D. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development *Physiol Rev.* 82;825- 874, 2002.

Choi M.H., Yoo Y.S., ChunG B.C. Biochemical roles of testosterone and epitestosterone to 5alpha-reductase as indicators of male-pattern baldness. *Journal of Investigative Dermatology*, v.116, p.57–61, 2001.

Chu NI, Chan RL, Hama KM and Chaplin MD. Disposition of narfarelin acetate, a potent luteinising hormone-releasing hormone agonist, in rats and rhesus monkeys. *Drug Metab Dispos* 13:560–565, 1985.

Clark L.C., Kochakian C.D. The in vitro metabolism of testosterone to 4-androstenedione-3,17 cis-testosterone and other steroids by rabbit liver slices. *Journal of biological chemistry*, v.170, p.22-23, 1947.

Counis R, Laverrière Jn, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler MI, Magre S. Gonadotropin-Releasing Hormone And The control of gonadotrope function *Reprod. Nutr. Dev.*45; 243-254, 2005.

Da Rosa L., Escott GM, Cavalari FC, Schneider CM, de Fraga LS, Loss E da S. Non-classical effects of androgens on testes from neonatal. *Steroids.* Jan;93:32-8, 2015.

Dalkin AC, Bourne GA, Pieper DR, Regiani S, Marshall JC. Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 1981; 108:1658–1664.

Dalkin AC, Haiselender DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*; 125:917–924, 1989

De Castro, A.L. et al.,. Epitestosterone and Testosterone have Similar Nonclassical Actions on Membrane of Sertoli Cells in Whole Seminiferous Tubules. *Hormone and metabolic research*, 2012.

De Gendt K, Swinning J. V. Saunders P. T., Schoonjans L, Dewerchin M, et al., A Sertoli cell-selective Knockout of androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc. Natl Acad Sci. USA*. 101:1327-32, 2004.

de Larminat MA, Blaquier JA. Effect of in vivo administration of 5 alpha reductase inhibitors on epididymal function. *Acta Physiol Lat Am.* ;29(1):1-6, 1979.

De Nicola AF, Dorfman RI, Forchielli E: Urinary excretion of epitestosterone and testosterone in normal individuals and hirsute and virilized females. *Steroids*, 7:351-366, 1966.

Dehennin L, Peres G. Plasma and urinary markers of oral testosterone misuse by healthy men in presence of masking epitestosterone administration. *International Journal of Sports Medicine*, v.17, p.315-319, 1996

Dehennin L. Secretion by the human testis of epitestosterone, with its sulfoconjugate and precursor androgen 5-androstene-3 beta,17 alpha-diol. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 44:171–177, 1993

Dehm SM, Regan KM, Schmidt LJ, Tindall DJ. Selective role of an NH₂-terminal WxxLF motif for aberrant androgen receptor activation in androgen depletion independent prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2007

Dorrington, J.H., Armstrong, D.T.,. Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog.Horm. Res.* 35, 301–342, 1979.

Drake AJ, van den Driesche S, Scott HM, Hutchison GR, Seckl JR, Sharpe RM. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology*. 150:5055–5064, 2009.

Duchêne, D., Ponchel, G., Wouessidjewe, D. Cyclodextrins in targeting Application to nanoparticles. *Adv. Drug Del. Rev.*, Amsterdam, v. 36, p. 29-40, 1999.

Dufau, M.L., The luteinizing hormone receptor. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 461–496, 1998.

Ellis J.A., Stebbing M., Harrap S.B. Genetic analysis of male-pattern baldness and the 5 α -reductase genes. *Journal of Investigative Dermatology*, v.110, p.849-853, 1998.

Fawcett, D.W. *Sistema Reprodutor Masculino*. Em: *Tratado de Histologia*. 11 ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, cap. 31, p. 802-857, 1993.

Fekete M, Bajusz S, Groot K, Csernus VJ and Schally AV. Comparison of different agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for receptor binding ability to rat pituitary and human breast cancer membranes. *Endocrinology* 124:946–955, 1989.

França, L.R.; Russell, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. España: Churchill Communications Europe España, p.197- 219, 1998.

Fromming, K.H., Szejtli, J. Pharmacokinetics and toxicology of cyclodextrins. In: Szejtli, J., Szenté, L. (Eds.), *Proc. of the 8th Int. Symposium on Cyclodextrins*. pp. 33–45 (Chapter 3), 1996.

Frost RA, Lang CH. Protein Kinase B/ Akt: A Nexus of Growth Factor and Cytokine Signaling in Determining Muscle Mass. *J Appl Physiol*. 2007.

Gould S. & Scott R C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food Chem. Toxicol* 43:1451–1459, 2005.

Griswold M D. *The Sertoli Cell Biology*. Sec. Edition Copyright ©.2015

Gustafsson J.A., Pousette A., Svensson E. Sex-specific Occurrence of Androgen Receptors in Rat Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.51, n.13, p.4047-4054. 1976.

Halmos G, Schally AV, Pinski J, Vadillo-Buenfil M, Groot K. Downregulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist cetrorelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2398–2402, 1996.

Hammond J., Le Q., Goodyer C., Gelfand M., Trifiro M., Leblanc A. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *Journal of Neurochemistry*, v.77 p.1319–1326, 2001.

Haren MT, Siddiqui AM, Armbrecht HJ, Kevorkian RT, Kim MJ, Haas MJ, Mazza A, Kumar VB, Green M, Banks WA, Morley JE. Testosterone modulates gene expression pathways regulating nutrient accumulation, glucose metabolism and protein turnover in mouse skeletal muscle. *Int J Androl.*; 34:55–68. 2011.

Havlíková H., Hill M., Hampl R., Starka L. Sex- and Age-Related Changes in Epitestosterone in Relation to Pregnenolone Sulfate and Testosterone in Normal Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.5, p.2225–2231, 1987.

Heck H, Hollmann W And Liesen H. Kohl .Nachweis von exogenem testosteron in sport. *Leistung und Gesundheit*, Deutscher Azte-Verlag, p.293-298, 1983.

Ibebunjo C, Eash JK, Li C, Ma Q, Glass DJ. Voluntary running, skeletal muscle gene expression, and signaling inversely regulated by orchidectomy and testosterone replacement. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 300:E327–E340, 2011.

Yin HN, Chai JK, Yu YM, Shen CA, Wu YQ, Yao YM, Liu H, Liang LM, Tompkins RG, Sheng ZY. Regulation of signaling pathways downstream of IGF-I/insulin by androgen in skeletal muscle of glucocorticoid-treated rats. *J Trauma.*; 66:1083–1090, 2009

Jacobson JD, Crofford LJ, Sun I, Wilder RL: Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs. *Neuroendocrinology*; 67: 117–25, 1998.

Johnston, D. S., Russell, L. D., Friel, P. J., and Griswold, M. D. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* 142, 2405–2408, 2001.

Johson L, Thompson DL, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, v. 105, p. 23-51, 2008.

Kakar S, Jennes L: Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett*; 98: 57–62 1995.

Kang L, Zhang X, Xie Y, Tu Y, Wang D, Liu Z, Wang ZY. Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol*. 24:709–721, 2010.

Khan S.A, Ndjountche L., Pratchard L., Spicer L. J., Davis J.S. Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B, signaling in immature Sertoli cells. *Endocrinology* Jun. 143(6):2259-67, 2002.

Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., and Manolagas, S. C. *Cell* 104, 719–730, 2001

Krsmanovic LZ, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK et al: Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*; 141: 1187–95, 2000.

Rato L., Alves M. G., Socorro S., Duarte A. I., Cavaco J. E., and Oliveira P. F., "Metabolic regulation is important for spermatogenesis," *Nature Reviews Urology*, vol. 9, no. 6, pp. 330–338, 2012.

Larminat M.A, Blaquier J.A. *Acta Physiol. Lat. Am.* p.29(1):1-6, 1979.

Lapcik O, Perheentupa A, Bicikova M, Huhtaniemi I, Hampl R, Starka L The effect of epitestosterone on gonadotrophin synthesis and secretion. *The Journal of Endocrinology.*, 143(2):353-358, 1994.

Lapcik O., Hampl R., Hill M., Starka L. Plasma levels of epitestosterone from prepuberty to adult life. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.55, p.405-408, 1995.

Leonelli C, Garcia PC, Pereira OC. Copulatory efficiency and fertility in male rats exposed perinatally to flutamide. *Reprod Toxicol.* Jan;31(1):10-6. doi: 10.1016/j.reprotox..08.003. Epub 2010 Oct 16,2011.

Leite L., Luchi R., Von Ledebur E.I.C.F., Loss E.S., Wassermann G.F., Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages, *Med. Sci. Res.* 27. 25–28, 1999.

Levine JE. Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) In: *Encyclopedia Of Hormones*. Elsevier Science Usa 909-914, 2003.

Lieberherr M, Grosse B. Androgen increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem.* 269: 7217-23, 1994.

Li-Ji Zhu, Matthew P. Hardy, Ivan V. Inigo, Ilpo Huhtaniemi, C. Wayne Bardin, And Alfred J. Moo-Young. Effects of Androgen on Androgen Receptor Expression in Rat Testicular and Epididymal Cells: A Quantitative Immunohistochemical Study. *Biology of Reproduction*, v.63, p.368–376, 2000.

Lin, Y.F., Tseng, M.J., Hsu, H.L., Wu, Y.W., Lee, Y.H., Tsai, Y.H.,. A novel folliclestimulating hormone-induced G alpha h/phospholipase C-delta1 signaling pathway mediating rat sertoli cell Ca²⁺ -influx. *Mol. Endocrinol.* 20, 2514–2527, 2006.

Li-Xin Shan, C. Wayne Bardin, And Matthew P. Hardy. Immunohistochemical Analysis of Androgen Effects on Androgen Receptor Expression in Developing Leydig and Sertoli Cells. *Endocrinology*, v.138, p.1259-1266, 2008.

Loss, E. S., Jacobsen, M., Costa, Z. S., Jacobus, A. P., Borelli, F. & Wassermann, G. F. Testosterone modulates K(+)ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. *Horm Metab Res*, 36, 519-25. 2004.

Loss E.S., A.P. Jacobus, G.F. Wassermann, Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes., *Life Sci.* 89, 577–83. 2011.

Mackay S. "Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels," *International Review of Cytology*, vol. 200, pp. 47–99, 2000.

Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, et al. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl.* 33:279–287, 2010.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995.

McKinnell, C. et al. Comparison of androgen receptor and oestrogen receptor beta immunoreactivity in the testes of the common marmoset

(*Callithrix jacchus*) from birth to adulthood: Low androgen receptor immunoexpression in Sertoli cells during the neonatal increase in testosterone concentrations. *Reproduction* 122, 419–429, 2001.

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res.* 57:149–79. 2002.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(46):16696–700, 2005.

Menon, K.M., Menon, B. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors — a perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356, 88–97, 2012.

Michels, G. et al. Long term and immediate effect of testosterone on single Ttype calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology.*147, 5160–5169, 2006.

Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C., and Auricchio, F. *EMBO J.* 19, 5406–5417, 2000

Millar R. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci,* 88: 5–28, 2005.

Mitchell R.t. Mungall W, Mcknnell C. Sharpe R.M. et al., *Endocrinology* Anogenital distance plasticity in adulthood: implications for its use as biomarker of fetal androgen action. *Endocrinology;* 156(1):24-31, 2015.

Nuck B.A., Lucky A.W. Epi-testosterone. A potential new antiandrogen. *Journal of Investigative Dermatology,* v.89, p.209–211, 1987.

Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? *Endocrinology* 147(3):1166-1174, 2006.

Orth J. M., G. L. Gunsalus, and A. A. Lamperti, "Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development," *Endocrinology,* vol. 122, no. 3, pp. 787–794, 1988.

Orth, J.M.; Jester, W.F., JR. Ncam mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats. *Journal of Andrology*, v.16, n.5, p.389-399, 1995.

Ortmann O, Diedrich K: Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues. *Hum Reprod*, 14: 194–206, 1999.

Palyi I, Vincze B, Lovas S et al: Gonadotropin-releasing hormone analogue conjugates with strong selective antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 2361–66, 1999.

Pelliniemi, L.J.; Frojzman, K.; Paranko, J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, p.87-113, 1993.

Picado-Leonard J, Miller WL. Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21. *DNA*; 6:439–448, 1987.

Prince F. P. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol* 168:213–216. 2001

Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 18: 371-378, 2007.

Richardson L.L., Kleinman H.K., M. Dym. Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod*. 52, 320–330, 1995.

Ronnekleiv, O & Kelly, M. J. Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol*, 290, 14-23, 2008.

Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha Hikim, A.P. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 286p, 1990.

Russell, L.D.; Griswold, M.D. *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, p 801, 1993.

Sanders, B.K. Sex, drugs and sports: prostaglandins, epitestosterone and sexual development. *Medical hypotheses*, 69(4), pp.829–35, 2007.

Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127:3180-3186, 1990.

Schulze J. J., Lorentzon M., Ohlsson C., Lundmark J., Hyung-Keun Roh, Rane A. And Ekström L. Genetic aspects of epitestosterone formation and androgen disposition: influence of polymorphisms in CYP17 and UGT2B enzymes. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18:477–485, 2008.

Schwahn M, Romeis P, Peter G, Derendorf H and Herbst M Absolute bioavailability and dose proportionality of CET, a novel LH-RH antagonist, in male and female rats. *ArchPharmacol* 355:R8, 1997.

Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ & Sharpe RM. Relationship between androgen action in the 'Male programming window', fetal Sertoli cell number and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 149, 5280–5287, 2008.

Shan L.X., Hardy D.O., Catterall J.F., Hardy M.P. Effects of luteinizing hormone and androgen on steady state levels of mRNA for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo. *Endocrinology*, v.136, p.1686–1693, 1995.

Shang Y., Myers M., M. Brown Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*, 9, 601–610, 2002.

Shapiro E, Huang H, Masch RJ, McFadden DE, Wu XR, Ostrer H. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. *J Urol*. 174:1695–8, 2005.

Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J, (eds). 2nded. New York: Raven Press,; 1363-1434, 1994.

Sharpe RM. Regulation of Spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction* Raven Press. pp 1363–1434, 1994.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p. 1363–434, 1994.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769–784, 2003.

Smith ER, Damassa DA, Davidson JM. Feedback regulation and male puberty: testosterone-luteinizing hormone relationships in the developing rat. *Endocrinology* 1977; 101:173–180.

Smith J. L. Kupchak B., Garitaonandia J, Hoang K, Maina A. S, Regalla L, and Lyons T. Heterologous expression of human mPR α , mPR β and mPR γ in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids*. 73(11): 1160–1173, 2008.

Smith, L.B. & Walker, W.H., *The Regulation of Spermatogenesis by Androgens*. Seminars in cell & developmental biology, 2014.

Starka L. Broulik P. D. Antiandrogenic activity of epitestosterone in male mice in vivo. *Sb Lek*; 102(1):7-11., 2001.

Starka L., Bičičková M., Hampl R. Epitestosterone—an endogenous antiandrogen? *Journal of Steroid Biochemistry*, v.33, p.1019–1021, 1989.

Stárka L., Hampl R., Bičičková M., Jelínek R., Doskočil M. Observations on the biological activity of epitestosterone, *Physiological Reviews*, v.40, p.317–326, 1991.

Stathopoulos EN, Dambaki C, Kampa M, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Delakas D, Delides GS, Castanas E. Membrane androgen binding sites are preferentially expressed in human prostate carcinoma cells. *BMC Clin Pathol*. 30; 3:1, 2003.

Steinberger E., Steinberger A. Testis: basic and clinical aspects. In: Balin H, Glasser S (eds) *Reproductive Biology*. Excerpta Medica, Amsterdam, p.144–267, 1972.

Stojilkovic S, Reinhardt J, Catt KJ. (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev*. 15; 462-499.

Svingen T. & Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations *Genes Dev*. 15; 27(22): 2409–2426, 2013.

Szetjli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev*. 98, 1743–1753, 1998.

Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 126:17-25 Kerr JB, D, 1990.

Thackray, V.G., Mellon, P.L., Coss D. Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 192–203, 2010.

Tsai MY, Yeh SD, Wang RS, Yeh S, Zhang C, Lin HY, et al. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103 (50):18975–80, 2006.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., Cyclodextrin drug carrier system. *Chem. Rev.* 98, 2045–2076, 1998.

Ueki, K., Fruman, D. A., Brachmann, S. M., Tseng, Y. H., Cantley, L. C., and Kahn, C. R. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell. Biol.* 22, 965–977, 2002.

Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346, Pt. 3, 561–576, 2000.

Van den Drieche s, Scott H.M. MacLeod D.J., Fiskén M, Walker M, Sharpe R.M. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before and during and after puberty. *Int J Androl.* 34(6 Pt 2):e578-86, 2011.

Verhoeven G., Heyns W., DE Moor P. Testosterone receptors in the prostate and other tissues. *Vitamins and Hormones*, v.33, p.265–242, 1975.

Vicencio, J.M. et al. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a non-genomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology*;147:1386–1395, 2006.

WADA. Adverse analytical findings reported by accredited laboratories. 2006. http://www.wadaama.org/rtecontent/document/LABSTATS_2006.pdf.

WADA. The 2011 prohibited list. The World Anti-Doping Code International Standard. 2011.

Walczak-Jedrzejowska R., Kula, E. Oszukowska, K. Marchlewska, W. Kula and J. Slowikowska-Hilczer. Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist. *Int J Androl.*; 34-5 Pt-2:e378-85, 2011.

Walker W., Easton E., Moreci R., Toocheck C., Anamthathmakula P., Jeyasuria P. Restoration of Spermatogenesis and Male Fertility Using an Androgen Receptor Transgene. *PLoS One*. 24; 10(3), 2015.

Wang R.S., Yeh S, Chen L.M., Lin H.Y., Zhang C, et al., Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nurse cell junctional formation in mouse testes. *Endocrinology*. 147:5624-33, 2006.

Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*; 30:119–32, 2009.

Welsh M, Saunders PT, Fisker M, et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest.*; 118:1479–1490, 2008.

Weusten J., Legemaat G, van der Wouw MP, Smals AG, Kloppenborg PW, Benraad T. The mechanism of the synthesis of 16-androstenes in human testicular homogenates. *J Steroid Biochem*; 32:689–694, 1989.

Willems A, Batlouni S.R., Esnal A, Swinnen J.V. Saunders P. T, et al., Selective ablation of the androgen receptor in mouse Sertoli cells affects Sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One*; 5: e14168, 2010.

Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PT, Sharpe RM, et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse Sertoli cells affects Sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One*.5-11, 2010.

Wolfe, A., Wu, S. Estrogen receptor-beta in the gonadotropin-releasing hormone neuron. *Semin. Reprod. Med.* 30, 23–31, 2012.