

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia**

AÇÕES DA EPITESTOSTERONA ATRAVÉS DE UM MECANISMO  
DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI: IMPLICAÇÕES NO  
DESENVOLVIMENTO SEXUAL

**Alexandre Luz de Castro**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Eloísa da Silveira Loss**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação como  
requisito parcial à obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências Biológicas:  
Fisiologia.

Porto Alegre, 28 de fevereiro de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, minha mãe Maria da Graça, meu pai Ivo, minha irmã Fernanda, minha avó Ida, meu avô Milton e a Judith que sempre me deram o apoio e o carinho necessário nas horas difíceis e sempre estiveram do meu lado.

Agradeço à minha namorada Larissa, companheira de todas as horas, que me apoiou sempre, me estimulou e acreditou sempre em mim, assim como à sua família querida.

Agradeço à professora Eloísa da Silveira Loss pela orientação, por todo o apoio, todo o incentivo, pela compreensão e a amizade irrestrita que dedicou a mim ao longo desse trabalho.

Agradeço à professora Ana Paula Jacobus por me apresentar ao laboratório, pela amizade e pelas aulas de fisiologia.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Endocrinologia Experimental: Gustavo Escott, Fernanda Carvalho Cavalari, Bianca de Moraes Fracasso, Marceli Vilaverde Diello, Luciana Abreu, Laura Ayres, Lauren de Souza Oliveira, Elsa Pires, Inês e dona Ritinha por compartilharem comigo os momentos de trabalho e de amizade.

Agradeço ao professor Guillermo Wassermann pelo apoio ao longo desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos Rodrigo e Tanise pela amizade e apoio.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela oportunidade e confiança.

Agradeço muito a todos e agradeço primeiramente a Deus que esteve sempre do meu lado na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Gônada Masculina.....	12
1.2. Célula de Sertoli.....	13
1.3. Mecanismo de Ação dos Hormônios Androgênicos.....	14
1.4. Epitestosterona.....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. Gerais.....	30
2.2. Específicos.....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Materiais.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. Animais.....	32
3.1.2. Soluções.....	32
3.1.3. Substâncias utilizadas.....	34
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular.....	37
3.2.2. Cálculo da Resistência da Membrana.....	38
3.2.3. Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos inteiros.....	39
<b>3.3. Análise Estatística.....</b>	<b>41</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Valores do potencial e da resistência de membrana basais das células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Efeito da epitestosterona em diferentes doses sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6. Comparação do efeito da epitestosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade.....</b>	<b>47</b>
<b>4.7. Comparação do efeito da testosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade.....</b>	<b>48</b>
<b>4.8. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....</b>	<b>49</b>
<b>4.9. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade.....</b>	<b>50</b>

4.10. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade.....	51
4.11. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a resposta despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....	52
4.12. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a ação da epitestosterona na resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....	53
4.13. Efeito do bloqueador dos canais de cálcio tipo L, verapamil, sobre a ação despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....	54
4.14. Efeito do inibidor da enzima fosfolipase C, U73122, sobre a ação despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....	55
4.15. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade.....	56
4.16. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a ação da epitestosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade.....	57
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. ANEXO (artigo submetido).....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ : Alfa  
 $\beta$ : Beta  
 $\Omega$ : Ohm  
 $\mu\text{L}$ : Microlitro  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar  
 $3\beta\text{-HSD}$ : Enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase  
 $17\alpha\text{-HSD}$ : Enzima  $17\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase  
 $17\beta\text{-HSD}$ : Enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase  
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ : Íon cálcio marcado radiotivamente  
ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico  
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica  
ATP: Adenosina Trifosfato  
 $\text{Ca}^{2+}$ : Íon cálcio  
Cpm: Contagens por minuto  
CREB: Proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc  
L-VDCC: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem do tipo L  
DAG: Diacilglicerol  
DHEA: Diidroepiandrosterona  
DHT: Diidrotestosterona  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal  
EGTA: Ácido bis-(aminoetil)glicoléter-N,N,N',N'-tetracético  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
GPCR: Receptor acoplado à proteína G  
Hz: Hertz  
I: Corrente  
iAR: Receptor de androgênios intracelular  
 $\text{IP}_3$ : Inositol-3,4,5-Trifosfato  
 $\text{K}^+$ : Íon potássio  
 $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ : Canais de Potássio Sensíveis a ATP  
KCl: Cloreto de Potássio  
KRb: Solução de Krebs  
LH: Hormônio Luteinizante  
LNCaP: Linhagem celular de câncer de próstata  
 $\text{M}\Omega$ : Megaohms  
M: Molar  
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno  
mAR: Receptor de androgênios de membrana  
mg: Miligrama  
min: Minuto  
mL: Mililitros  
mM: Milimolar  
mmol: Milimol  
ms: Milissegundos  
mV: Milivolts  
nA: Nanoampére

nM: Nanomolar  
pH: Potencial Hidrogeniônico  
PI: Fosfatidil Inositol  
PIP2: Fosfatidil Inositol-4,5-Bisfosfato  
PLC: Fosfolipase C  
PKC: Proteína quinase C  
R= resistência  
SRC: Quinase de SRC  
SRE: Elementos de resposta aos esteroides  
mV: MiliVolts  
V: Voltagem

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** BIOLOGIA CELULAR DO TESTÍCULO.

**FIGURA 2:** MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA NA CÉLULA DE SERTOLI.

**FIGURA 3:** VIAS DE SÍNTESE DA EPITESTOSTERONA.

**FIGURA 4:** RAZÃO EPITESTOSTERONA/TESTOSTERONA EM HOMENS E EM MULHERES EM DIFERENTES IDADES (A). NÍVEIS PLASMÁTICOS DE EPITESTOSTERONA EM HOMENS E EM MULHERES EM DIFERENTES IDADES (B).

**FIGURA 5:** ESTRUTURA MOLECULAR DA TESTOSTERONA.

**FIGURA 6:** ESTRUTURA MOLECULAR DA EPITESTOSTERONA.

**FIGURA 7:** ESTRUTURA MOLECULAR DA FLUTAMIDA.

**FIGURA 8:** ESTRUTURA MOLECULAR DO U73122.

**FIGURA 9:** ESTRUTURA MOLECULAR DO VERAPAMIL.

**FIGURA 10:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA ELETROFISIOLÓGICA EM TÚBULOS SEMINÍFEROS COM A MÉDIA DOS VALORES BASAIS DE POTENCIAL DE MEMBRANA (PM) E RESISTÊNCIA DA MEMBRANA (RM).

**FIGURA 11:** REPRESENTAÇÃO DE UM REGISTRO DE CONTROLE DE UMA CÉLULA DE SERTOLI.

**FIGURA 12:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA NAS DOSES DE 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M E 2 $\mu$ M SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 13:** REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA DE UMA CÉLULA DE SERTOLI TÍPICA APÓS A APLICAÇÃO TÓPICA DA EPITESTOSTERONA.

**FIGURA 14:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) E DA TESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 15:** REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA DE UMA CÉLULA DE SERTOLI TÍPICA APÓS A APLICAÇÃO TÓPICA DA TESTOSTERONA.

**FIGURA 16:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) E DA TESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 17:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) E DA TESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 35 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 18:** COMPARAÇÃO DO EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15, 21 E 35 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 19:** COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15, 21 E 35 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 20:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A RESISTÊNCIA DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 21:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A RESISTÊNCIA DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 22:** EFEITO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A RESISTÊNCIA DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 35 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 23:** EFEITO DA FLUTAMIDA (1 $\mu$ M) SOBRE A RESPOSTA DESPOLARIZANTE DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 24:** REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA DE UMA CÉLULA DE SERTOLI TÍPICA PERFUNDIDA COM FLUTAMIDA, APÓS A APLICAÇÃO TÓPICA DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M).

**FIGURA 25:** EFEITO DA FLUTAMIDA (1 $\mu$ M) SOBRE A AÇÃO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE A RESISTÊNCIA DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 26:** EFEITO DO VERAPAMIL (100 $\mu$ M) SOBRE A AÇÃO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.

**FIGURA 27:** REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA DE UMA CÉLULA DE SERTOLI TÍPICA PERFUNDIDA COM VERAPAMIL, APÓS A APLICAÇÃO TÓPICA DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M).

**FIGURA 28:** EFEITO DO U73122 (2 $\mu$ M) SOBRE A AÇÃO DA EPITESTOSTERONA (1 $\mu$ M) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.



**FIGURA 29:** COMPARAÇÃO DO EFEITO DA EPITESTOSTERONA E DA TESTOSTERONA SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  NO TECIDO TESTICULAR.

**FIGURA 30:** EFEITO DA FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A AÇÃO DA EPITESTOSTERONA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  NO TECIDO TESTICULAR.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** COMPOSIÇÃO SALINA E CONCENTRAÇÕES PRESENTES NAS SOLUÇÕES DE ESTOQUE DE KREBS E NA SOLUÇÃO FINAL.

## RESUMO

**Introdução:** A epitestosterona é um epímero  $\alpha$  da testosterona. Esse esteroide possui uma atividade antiandrogênica, assim como um efeito neuroprotetor. No entanto, o mecanismo de ação da epitestosterona ainda não foi elucidado.

**Objetivos:** O objetivo desse trabalho é investigar o efeito não clássico da epitestosterona sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de testículos de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade e sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos de 12 dias de idade.

**Materiais e métodos:** O potencial e a resistência de membrana das células de Sertoli foram registrados através da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. Foi realizada a aplicação de epitestosterona (0,5, 1 e  $2\mu\text{M}$ ) ou de testosterona ( $1\mu\text{M}$ ), com ou sem a perfusão com flutamida ( $1\mu\text{M}$ ), verapamil ( $100\mu\text{M}$ ) ou U73122 ( $2\mu\text{M}$ ). Os testículos de ratos de 12 dias de idade foram pré-incubados com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , com ou sem flutamida ( $1\mu\text{M}$ ), e incubados com epitestosterona ( $1\mu\text{M}$ ) ou testosterona ( $1\mu\text{M}$ ). Análise estatística: Teste t de Student ou ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni.

**Resultados:** A epitestosterona produziu uma resposta de despolarização do potencial de membrana, assim como um aumento na resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade. Esse esteroide apresentou uma resposta semelhante à apresentada pela testosterona. Os efeitos da epitestosterona não foram modificados após a perfusão com flutamida, um inibidor do receptor androgênico intracelular. A epitestosterona promoveu um aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  após 5 minutos de incubação, e esse efeito não foi bloqueado pela flutamida. O efeito despolarizante desse esteroide foi parcialmente inibido pelo fármaco verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio tipo L, e pelo U73122, um inibidor da enzima fosfolipase C.

**Conclusão:** Esses resultados indicam uma atuação da epitestosterona em células de Sertoli através de uma ação não clássica; esses efeitos são semelhantes aos encontrados para a testosterona em células de Sertoli de testículos de ratos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Epitestosterone is the 17 $\alpha$ -epimer of testosterone. It seems to possess an antiandrogenic activity, as well as a neuroprotective effect. The mechanism of action of epitestosterone has not been elucidated.

**Objective:** The aim of this work is to investigate the non-classical effect of epitestosterone on the membrane of Sertoli cells from testis of 12-, 15-, 21- and 35-day-old rats.

**Materials and Methods:** The membrane potential and the membrane input resistance of Sertoli cells was recorded using a standard single microelectrode technique. Application of epitestosterone (0.5, 1 and 2 $\mu$ M) or testosterone (1 $\mu$ M) alone and after infusion with flutamide (1 $\mu$ M), verapamil (100 $\mu$ M) or U73122 (2 $\mu$ M) was made. The testes from 12-day-old rats were pre-incubated with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  with or without flutamide (1 $\mu$ M) and incubated with epitestosterone (1 $\mu$ M) or testosterone (1 $\mu$ M). Student's t-test or ANOVA for repeated measures with Bonferroni post-test was used.

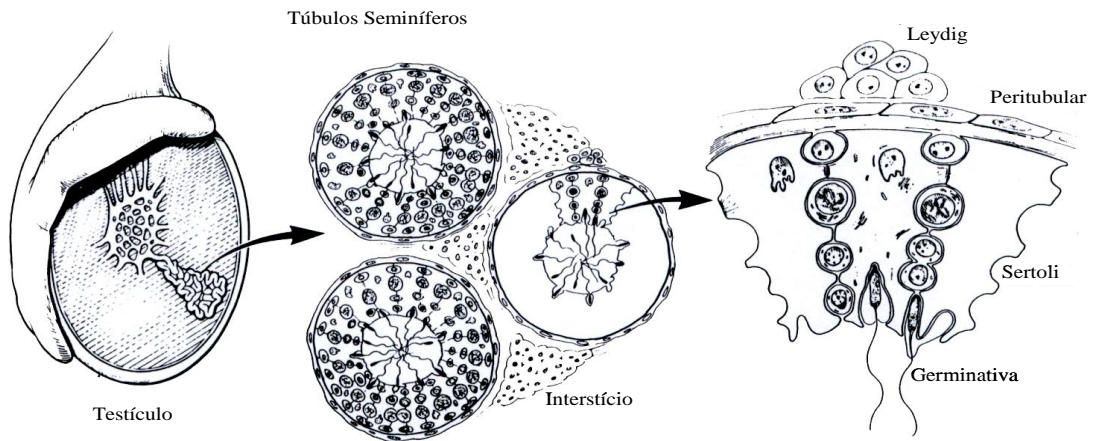
**Results:** Epitestosterone produced a depolarization in the membrane potential and increased the input membrane resistance on Sertoli cells from 15-, 21- and 35-day-old rats. This steroid showed a similar response to testosterone. The effect of epitestosterone was not changed after perfusion with flutamide, an intracellular androgen receptor inhibitor. Epitestosterone increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake within 5 minutes and this effect was also not inhibited by flutamide. The depolarizing effect was slightly inhibited by verapamil, a voltage-dependent calcium channel blocker, and by U73122, a PLC inhibitor.

**Conclusion:** These results indicate that epitestosterone acts on the Sertoli cells via a non-classical signaling pathway; the effects are similar to that of testosterone in Sertoli cells in whole seminiferous tubules from rat testes.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. GÔNADA MASCULINA

Os testículos são órgãos pareados, ovóides e encapsulados (SANTEN 1995). Estes órgãos têm a função básica de promover a produção de espermatozoides, além da secreção de diversos hormônios esteroides e proteicos, os quais são essenciais na função da reprodução masculina (COUROT *et al.* 1984). Os testículos são constituídos de duas unidades funcionais: uma rede de túbulos seminíferos para a produção e transporte de espermatozoides e um sistema de células intersticiais ou células de Leydig, que contém a maquinaria enzimática para a produção de hormônios androgênicos (FAWCETT 1993). Os túbulos seminíferos estão fortemente enrolados e empacotados, apresentando uma grande extensão dentro dos testículos (FAWCETT 1993; SKINNER 1991). Estes são revestidos por células germinativas primitivas (linhagem espermatogênica) e células de Sertoli, grandes células complexas contendo glicogênio, que se estendem desde a lâmina basal do túbulo até o seu lúmen (figura 1). As junções apertadas entre as células de Sertoli adjacentes, perto da lâmina basal, formam a barreira hematotesticular, que impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial (GANONG 2000).



**Figura 1:** Biologia Celular do Testículo (SKINNER 1991).

## 1.2. CÉLULA DE SERTOLI

As células de Sertoli são células somáticas presentes no testículo e estruturam os túbulos seminíferos, além de participarem de forma essencial da maturação da linhagem espermática (SILVA *et al.* 2002; GRISWOLD 1998). Em ratos a sua proliferação ocorre durante o período fetal e pré-puberal e essa dura até aproximadamente os 16 dias de vida do animal (STEINBERGER *et al.* 1971).

Essas células possuem uma importante função na promoção de suporte físico e nutricional para o desenvolvimento das células germinativas e estão sob o controle hormonal hipofisário. A hipófise anterior produz, por estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido no hipotálamo, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Ambos atuam sobre a gônada masculina, participando de forma ativa no processo de espermatogênese e na produção de hormônios esteroides. Por estímulo do LH, a célula de Leydig produz a testosterona, um hormônio androgênico com

diversas ações nas células de Sertoli (GRISWOLD 1998). As células de Sertoli têm resistência à radiação ionizante e a diferentes agentes tóxicos que destroem as células espermatogênicas (FAWCETT 1993). À medida que o espermatócito progride em sua maturação, novas junções entre as células de Sertoli se desenvolvem, enquanto as antigas se desfazem, mecanismo esse determinado pela ação hormonal do FSH e da testosterona (MRUK *et al.* 2004).

### **1.3. MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS ANDROGÊNICOS**

Muitos dos efeitos exercidos pela testosterona ocorrem de maneira direta através da ligação desse hormônio a um receptor de androgênios intracelular (iAR), ou de maneira indireta pela conversão em diidrotestosterona (DHT), a qual se liga com mais afinidade a esse receptor. A testosterona pode, da mesma forma, ser convertida em estradiol, através da enzima aromatase, promovendo sua ação através do receptor de estrogênios. O iAR é um membro da superfamília de receptores nucleares (receptores de hormônios esteroides e receptores de hormônios da tireóide), os quais são compostos por três domínios: um domínio amino-terminal, um domínio de ligação no material genético e um domínio de ligação com o hormônio. A ligação da testosterona nesse receptor promove a sua dimerização, o que possibilita ao complexo hormônio-receptor se translocar ao núcleo e unir-se aos elementos de resposta aos esteroides (SRE), os quais estão presentes em genes cuja transcrição está vinculada a sua ação hormonal. Esse complexo atua como um fator de transcrição e estimula a expressão desses genes (GANONG 2000; BRINKMAN *et al.* 2000). Baseando-se nesse mecanismo, foram desenvolvidos fármacos,

como a flutamida, a bicalutamida e a nilutamida, capazes de bloquear a ligação da testosterona ao iAR. Esses antiandrogênicos são utilizados nas condições em que a resposta androgênica está associada a patologias como o câncer de próstata metastático (SCHELLHAMMER *et al.* 1995) e o hirsutismo (VENTUROLI *et al.* 1999).

A ação dos androgênios sobre o iAR, considerada como a resposta clássica dos esteroides, não permite a compreensão de efeitos rápidos que os mesmos exercem a nível celular e que são incompatíveis com o tempo necessário para a síntese protéica. Esses efeitos ocorrem em cerca de segundos a minutos; portanto, não poderiam ser resultado de um processo de transcrição gênica que pode levar minutos, horas e até dias (LOSEL *et al.* 2003). As hipóteses para explicar essa resposta não clássica da testosterona referem-se a uma ação hormonal via um receptor de androgênios localizados na membrana celular. Através de muitos estudos, foi possível constatar a ligação desse hormônio a sítios na membrana plasmática, conquanto a localização e a estrutura do seu receptor ainda não tenham sido bem caracterizadas. Acredita-se que seja um receptor acoplado a uma proteína G (GPCR) (BENTEN *et al.* 2004).

Os efeitos não clássicos dos andrógenos foram demonstrados em muitos tipos celulares, inclusive em células de Sertoli. Nessas células, a testosterona é capaz de rapidamente aumentar os níveis de cálcio intracelular (GORCZYNSKA e HANDELSMAN 1995). Esse esteroide também é capaz de estimular a captação de cálcio marcado ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) em células de Sertoli isoladas de testículos de ratos imaturos (LEITE *et al.* 1999). O aumento dos níveis de cálcio intracelular pode ser abolido pelo uso de ácido bis-(aminoetil)glicoléter-



N,N,N',N'-tetracético (EGTA) e de inibidores dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC), indicando a participação desses canais na resposta rápida da testosterona (LOSS *et al.* 2004). Em uma linhagem de células de câncer de próstata (LNCaP), foi possível constatar o aumento do cálcio intracelular através da ligação de hormônios androgênicos a um GPCR (SUN *et al.* 2006). Nessas células, foi demonstrada a existência de receptores de membrana para a testosterona não internalizáveis, os quais não foram reconhecidos por anticorpos contra o receptor intracelular (KAMPA *et al.* 2002). Já em osteoblastos, a testosterona é capaz de promover um aumento nos níveis de cálcio intracelular após cinco segundos, através de canais do tipo L-VDCC e também através de mobilização dos estoques presentes no retículo endoplasmático. O uso de acetato de ciproterona, um antagonista do iAR, não foi capaz de bloquear o aumento nos níveis de cálcio intracelular induzido pela testosterona (LIEBERHERR *et al.* 1994).

Estudando o efeito de androgênicos sobre o potencial de membrana, observou-se que a aplicação de testosterona em doses variáveis de 100 a 500nM ocasionou uma rápida despolarização em células de Sertoli de ratos imaturos. Após a lavagem do meio com o tampão de Krebs Ringer bicarbonato, o potencial de membrana retorna a valores próximos do repouso. Por outro lado, a aplicação de estradiol e de progesterona não produziu nenhum efeito sobre o potencial de membrana dessas células (LOSS *et al.* 2004; VON LEDEBUR *et al.* 2002). O perfil de despolarização do potencial de membrana é semelhante para várias concentrações de testosterona. Além desse efeito eletrofisiológico, a testosterona também é capaz de promover um aumento na

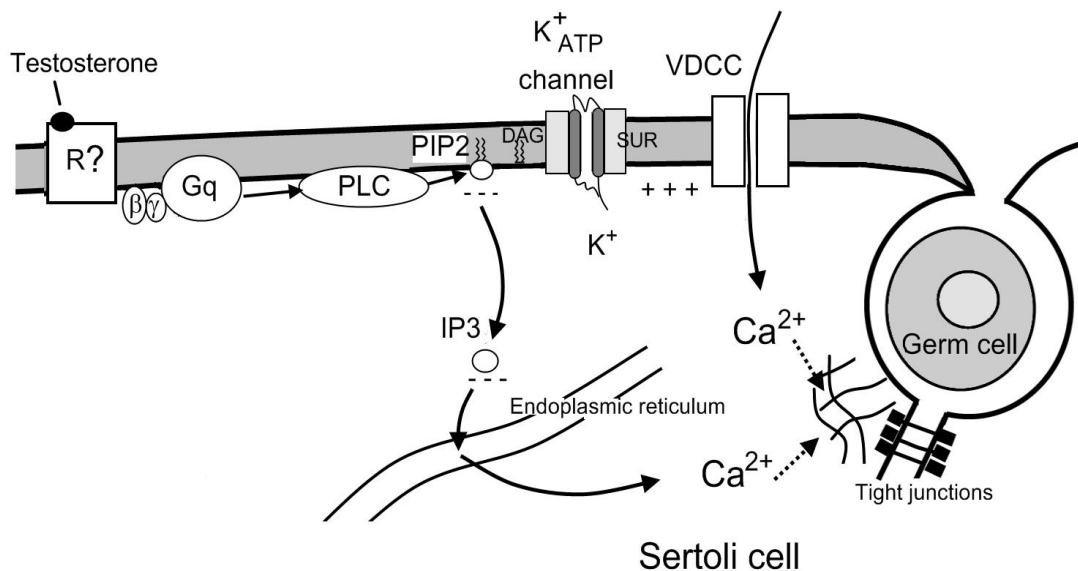
resistência de membrana em células de Sertoli de ratos imaturos (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2011).

Estudando o efeito dos fármacos glibenclamida e tolbutamina, bloqueadores dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), sobre o potencial e a resistência de membrana, foi possível verificar que ambos apresentam uma resposta eletrofisiológica semelhante à testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos. A perfusão dos túbulos seminíferos de ratos imaturos com diazoxida, um estimulador dos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, é capaz de anular o efeito da testosterona, levando a uma hiperpolarização do potencial de membrana. Na presença de diazoxida, a ação estimulatória da testosterona e da glibenclamida sobre a captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> é igualmente anulada. Esses achados demonstram o envolvimento desses canais na ação rápida da testosterona. A testosterona atua inicialmente sobre os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), inibindo os mesmos e levando ao acúmulo de íons K<sup>+</sup> no meio intracelular, o que provoca uma resposta de despolarização na célula de Sertoli. Essa despolarização induz a abertura de canais do tipo L-VDCC, levando ao aumento dos níveis de cálcio intracelular (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2004; LOSS *et al.* 2011). De forma semelhante à testosterona, o esteroide sintético nandrolona e o flavonóide catequina também apresentam uma resposta rápida em células de Sertoli de ratos imaturos (CAVALARI *et al.* 2012).

A resposta eletrofisiológica da testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos pode ser inteiramente bloqueada com a utilização de U73122, um bloqueador da enzima fosfolipase C (PLC). Além disso, o aumento da captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> no tecido testicular de ratos imaturos promovido por esse hormônio pode igualmente ser inteiramente anulado na presença desse

bloqueador. Esses resultados evidenciam uma conexão entre as ações de membrana da testosterona e a estimulação da enzima PLC. A ligação desse hormônio a um receptor localizado na membrana, portanto, é capaz de promover a estimulação da enzima PLC, a qual é responsável por clivar o fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4-5, bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2004; LOSS *et al.* 2011). A redução da quantidade de PIP<sub>2</sub> na membrana tem como consequência a redução da condutância produzida pelos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, devido ao desequilíbrio de cargas iônicas da superfície da membrana, levando ao acúmulo de íons K<sup>+</sup> e a despolarização do potencial de membrana (WASSERMANN *et al.* 2004; BAUKROWITZ *et al.* 2000). Ao mesmo tempo em que a PLC atua estimulando o metabolismo do PIP<sub>2</sub> (BAUKROWITZ *et al.* 2000), essa enzima leva a formação de IP<sub>3</sub>, o qual atua sobre o retículo endoplasmático causando a liberação de Ca<sup>2+</sup>, sendo esse íon um segundo mensageiro com importantes efeitos sobre a célula (BERRIDGE *et al.* 1998). Experimentos realizados em osteoblastos demonstram que o bloqueio do iAR, através do tratamento com acetato de ciproterona, não é capaz de bloquear a geração de IP<sub>3</sub> e DAG induzida pela testosterona (LIEBERHERR *et al.* 1994). PIP<sub>2</sub> e Ca<sup>2+</sup> podem agir de forma antagônica na estabilidade do citoesqueleto que está próximo à membrana plasmática (JANMEY *et al.* 1994). Proteínas que se ligam a actina, como a gelsolina, são ativadas por Ca<sup>2+</sup>, levando a despolimerização dos filamentos de F-actina, enquanto que o PIP<sub>2</sub> é capaz de antagonizar essa reação, estabilizando os filamentos de actina (JANMEY *et al.* 1994). Em células de Sertoli, o aumento dos níveis de cálcio intracelular pode exercer diversos efeitos sobre o citoesqueleto, as junções celulares, a

movilidade celular e a transcrição gênica. Esses efeitos podem ser importantes na ação regulatória da testosterona sobre o desenvolvimento da série espermatogênica (LOSS *et al.* 2004, LOSS *et al.* 2007).



**Figura 2:** Mecanismo de ação da testosterona na célula de Sertoli (LOSS *et al.* 2011).

Estudos indicam que o mecanismo rápido de atuação da testosterona parece ocorrer pela ativação de um receptor de androgênios localizado na membrana (mAR), um GPCR do tipo Gq. Experimentos utilizando a toxina pertussis, que é capaz de bloquear os receptores do tipo Gq, vêm de encontro a esses achados. A perfusão dos túbulos seminíferos de ratos imaturos com essa toxina é capaz de anular a resposta despolarizante da testosterona, demonstrando a ação desse hormônio através da via de sinalização Gq-PLC-PIP2 (figura 2) (LOSS *et al.* 2004; LOSS *et al.* 2011). Outros trabalhos, realizados em células de Sertoli de ratos de 20 dias de idade, demonstram que a testosterona é capaz de se ligar ao iAR próximo à membrana plasmática, ativar e recrutar a enzima tirosina quinase Src. Essa enzima, por sua vez, atua ativando o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), resultando na

fosforilação e ativação da enzima quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc (CREB) (WALKER *et al.* 2003; CHENG *et al.* 2007; WALKER *et al.* 2010). A ativação do CREB pode ser uma consequência do aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular induzido pela testosterona, visto que esse hormônio não produz alterações nas concentrações de AMPc (WALKER *et al.* 2003). O fator de transcrição CREB é de grande importância para o processo de espermatogênese, visto que a inibição da fosforilação do mesmo em células de Sertoli prejudica a produção de espermatozoides. Em cultura de células de Sertoli, o tratamento com testosterona é capaz de promover a expressão gênica do CREB e de genes dependentes da ativação do mesmo. A ativação desse fator de transcrição indica uma ação gênica dos androgênios de forma independente da ativação do receptor clássico intracelular (FIX *et al.* 2004; SCOBAY *et al.* 2001; CHENG *et al.* 2007).

#### **1.4. EPISTESTOSTERONA**

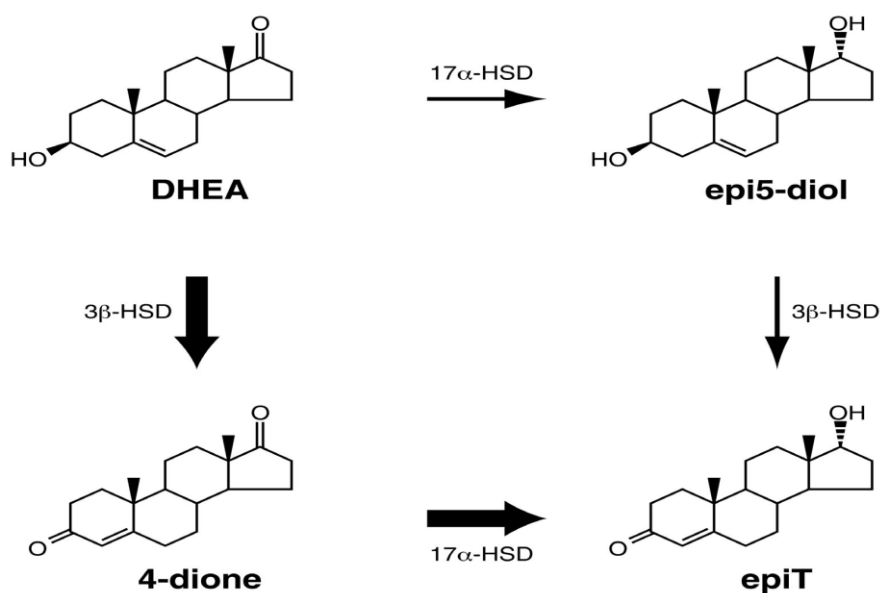
A epitestosterona (17 $\alpha$ -hidroxi-4-androsten-3-ona) é um epímero da testosterona de ocorrência natural. Esse esteroide foi identificado pela primeira vez como um metabólito no tecido hepático de coelhos (CLARK *et al.* 1947; STARKA *et al.* 2003).

A biossíntese da epitestosterona a partir de outros androgênios ocorre de forma espécie-específica. Em alguns animais, como o coelho e o camundongo, que possuem uma elevada atividade da enzima 17 $\alpha$ -hidroesteroide oxidoreductase, uma fração considerável de epitestosterona é

originada a partir da conversão de testosterona em androstenediona, e dessa última em epitestosterona. Em camundongos, o tecido renal é o principal responsável pela síntese deste esteroide a partir de precursores androgênicos (ARIMASA *et al.* 1973; STARKA *et al.* 2003). Em outras espécies de animais, como búfalos, coelhos e ratos, contudo, não foi observada a conversão de testosterona em epitestosterona. Nessas espécies, o tecido testicular constitui a principal fonte desse hormônio (STARKA *et al.* 1967; STARKA *et al.* 2003).

Em seres humanos, experimentos realizados com testosterona marcada com carbono 14 demonstraram que não ocorre a conversão de testosterona em epitestosterona (WILSON e LIPSETT 1966). Em humanos, o tecido testicular é uma importante fonte de epitestosterona, conforme foi demonstrado pela determinação do gradiente de concentração entre os níveis plasmáticos desse hormônio presentes no sangue das veias espermáticas e no das veias periféricas (DEHENIN *et al.* 1993). Além das gônadas masculinas, a glândula adrenal também é capaz de produzir a epitestosterona. Experimentos realizados em homens normais mostraram que o ACTH é capaz de aumentar significativamente a excreção urinária do glicuronídeo de epitestosterona (TAMM *et al.* 1966). Um estudo realizado em homens com hipogonadismo e que tiveram uma estimulação adrenal com ACTH mostrou também um aumento dos níveis do glicuronídeo de epitestosterona na urina em resposta ao ACTH. Através desse estudo, Kicman e colaboradores demonstraram a participação da adrenal na síntese de epitestosterona, conquanto a produção dessa glândula seja modesta em relação à produção testicular (KICMAN *et al.* 1999).

A epitestosterona é sintetizada a partir da pregnenolona através da via delta5 de síntese de esteroides e através da via que envolve a produção de 5-androstene-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol (epi5-diol). O epi5-diol, precursor da epitestosterona, é sintetizado a partir da diidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\alpha$ -HSD) e, posteriormente, convertido em epitestosterona pela enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) (WEUSTEN *et al.* 1989). A enzima 17 $\alpha$ -HSD possui alta homologia com a enzima 17 $\beta$ -HSD, a qual catalisa a transformação de 4-diona em testosterona (RHEAULT *et al.* 1999).



**Figura 3:** Vias de síntese da Epitestosterona (BELLEMARE *et al.* 2005).

A espessura das flechas na figura número 3 demonstra a relevância de cada uma das duas vias de síntese da epitestosterona. A principal via de síntese deste esteroide em células renais de camundongos ocorre a partir da conversão da diidroepiandrosterona (DHEA) em epi5-diol, catalisada pela enzima 17 $\alpha$ -HSD (BELLEMARE *et al.* 2005).

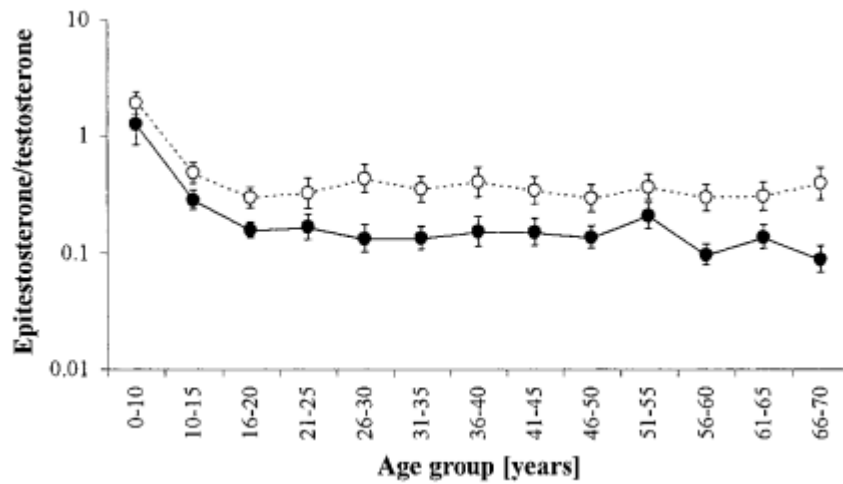
Trabalhos avaliando a excreção urinária de epitestosterona não encontraram diferenças entre indivíduos pré-púberes do sexo masculino e do

sexo feminino (GUPTA *et al.* 1967). Avaliando a excreção deste esteroide em homens, alguns trabalhos demonstraram que a mesma aumenta após a puberdade, alcança um valor máximo entre os 20 e 30 anos de idade, e permanece praticamente constante até a sexta década de vida (HUBL *et al.* 1971; KAUFMANN *et al.* 1968; STARKA *et al.* 2003). Em mulheres, a máxima excreção urinária desse esteroide foi observada aos 22<sup>o</sup> e 23<sup>o</sup> dias do ciclo menstrual (LONGHINO *et al.* 1968; STARKA *et al.* 2003).

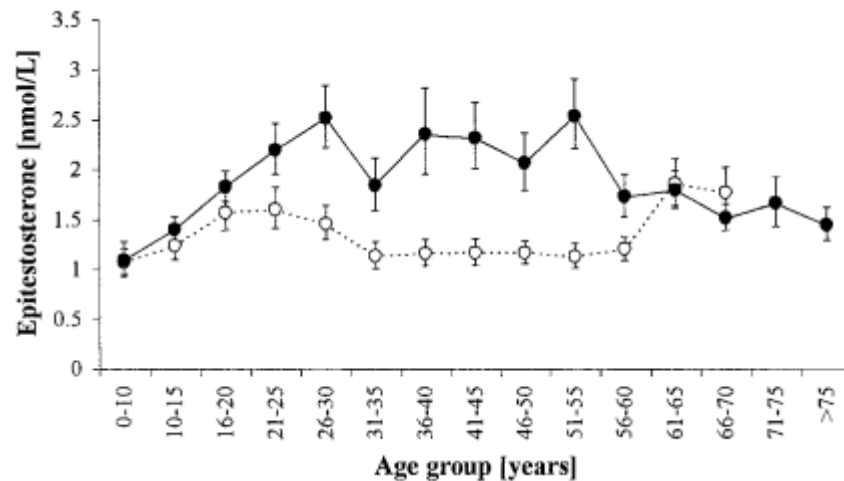
Analisando a variação das concentrações plasmáticas de esteroides androgênicos em diferentes idades, estudos demonstram que indivíduos pré-púberes do sexo masculino possuem maiores níveis de epitestosterona comparando com os de testosterona. Nesse período do desenvolvimento sexual, a razão epitestosterona/testosterona encontra-se elevada, em função de os níveis de testosterona estarem muito baixos, enquanto que os níveis de epitestosterona encontram-se elevados. Até mais ou menos os 10 anos de idade, essa relação se mantém. Em adultos ocorre uma redução na razão epitestosterona/testosterona no plasma em função do aumento dos níveis de testosterona. A concentração sérica de epitestosterona em mulheres atinge um valor máximo ao redor dos 20 anos de idade e depois decai continuamente até o período de menopausa. Em mulheres pós-menopausa ocorre um aumento dessa concentração. Em homens, a concentração sérica atinge um pico máximo ao redor dos 35 anos de idade e após isso decai. Tanto homens como mulheres apresentam uma redução na relação epitestosterona/testosterona logo após a puberdade (figura 4) (LAPCIK *et al.* 1995; HAVLI'KOVA *et al.* 1987).



A



B



**Figura 4:** Razão epitestosterona/testosterona em homens ● e em mulheres ○ em diferentes idades (A). Níveis plasmáticos de epitestosterona em homens ● e em mulheres ○ em diferentes idades (B) (HAVLI'KOVA *et al.* 1987).

A razão testosterona/epitesterona urinária é utilizada para a detecção de doping por esteroides anabolizantes em atletas. Como em seres humanos a testosterona não é convertida em epitestosterona, a razão entre esses andrógenos tende a manter-se constante, a não ser que o indivíduo faça uso de anabolizantes. Os valores estabelecidos para essa razão ficam na faixa de 1 a 6 em unidades arbitrárias (de acordo com o regulamento do Comitê Olímpico Internacional - COI). Valores acima de 6 indicam suspeita de

utilização de anabolizantes (STARKA *et al.* 2003). A análise da razão urinária desses hormônios é válida considerando que ambos possuem um *clearance* renal muito similar e que a testosterona exógena não é convertida em epitestosterona (DEHENIN *et al.* 1996; STARKA *et al.* 2003). A ingestão de algumas substâncias, como o álcool, é capaz de alterar essa razão, principalmente em mulheres (KARILA *et al.* 1996). A administração de androstenediona é capaz de aumentar a excreção urinária de epitestosterona, enquanto que o uso de diidroepiandrosterona promove um aumento na razão testosterona/epitestosterona urinária (CATLIN *et al.* 2002; BOWERS 1999).

Em um estudo realizado em hamsters, cápsulas subcutâneas contendo testosterona ou diidrotestosterona junto com epitestosterona foram implantadas por três semanas nos animais. Após esse período, foi possível verificar que as ações androgênicas da testosterona, como o aumento da pigmentação cutânea, o aumento das glândulas sebáceas e o aumento do diâmetro dos folículos pilosos, não ocorreram na presença da epitestosterona. Os efeitos da diidrotestosterona também foram em parte bloqueados. Esse trabalho demonstrou uma ação antiandrogênica da epitestosterona (NUCK *et al.* 1987). Outros trabalhos demonstraram que esse esteroide é capaz de reduzir os efeitos da testosterona sobre o aumento de peso corporal em ratos castrados (STARKA *et al.* 1996), além de promover uma redução significativa do peso da próstata em ratos não castrados (LAPCIK *et al.* 1994). Comparando o peso dos rins e das vesículas seminais em camundongos castrados com reposição de testosterona e em camundongos castrados que receberam epitestosterona, a diminuição do peso dos tecidos foi muito superior no grupo tratado com epitestosterona. Nesse estudo, o efeito antiandrogênico da epitestosterona

mostrou-se maior do que o apresentado pelo acetato de ciproterona (STARKA *et al.* 1989; STARKA *et al.* 2003). Em um trabalho com camundongos, a epitestosterona promoveu uma redução na densidade óssea e no conteúdo de cálcio e fosfato do osso femoral em animais tratados. Essa redução, porém, mostrou-se muito inferior à apresentada pelo grupo de animais castrados. (BROULIK *et al.* 1997).

Experimentos *in vitro* confirmaram a ação antiandrogênica da epitestosterona, demonstrando que esse esteroide atua como inibidor competitivo da enzima 5 $\alpha$ -redutase, responsável por converter testosterona em diidrotestosterona (STARKA *et al.* 1989; STARKA *et al.* 1991; STARKA *et al.* 2003). Outro mecanismo responsável por esse efeito antiandrogênico é a inibição competitiva do iAR, visto que uma ação direta da diidrotestosterona é também inibida pela epitestosterona (NUCK *et al.* 1987; STARKA *et al.* 2003). Os efeitos negativos da epitestosterona na massa óssea podem, portanto, ser explicados tanto pela redução da formação de diidrotestosterona, bem como por uma ação antagonista sobre o iAR (BROULIK *et al.* 1997). A ligação da epitestosterona ao receptor de androgênios intracelular ocorre com um décimo da afinidade apresentada pela testosterona por esse receptor (VERHOEVEN *et al.* 1975).

Estudos demonstraram que, em folículos pilosos, a epitestosterona é capaz de reduzir os níveis de diidrotestosterona através da inibição da enzima 5 $\alpha$ -redutase, além de bloquear a ligação desse esteroide ao iAR. A redução dos níveis e da ação da diidrotestosterona pode atuar como um fator protetor contra a perda de cabelo, visto que esse hormônio é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento do padrão masculino de calvície. Dessa

forma, o aumento dos níveis de epitestosterona no folículo piloso promove a normalização do crescimento do mesmo e reduz o processo de perda de cabelo. Em indivíduos calvos, junto aos níveis elevados de diidrotestosterona, foi demonstrado haver um aumento na razão testosterona/epitestosterona. A dosagem desses hormônios em indivíduos jovens pode, dessa forma, ser útil na prevenção do desenvolvimento de calvície (CHOI *et al.* 2001; ELLIS *et al.* 1998).

Avaliando o efeito da epitestosterona sobre as gonadotrofinas hipofisárias em ratos, Lapcik e colaboradores (1994) mostraram que os níveis plasmáticos do LH, assim como os níveis desse hormônio no tecido hipofisário, não diferiram entre o grupo tratado com epitestosterona e o grupo controle. Os níveis plasmáticos e hipofisários do FSH igualmente não diferiram entre os grupos. Entretanto, em ratos tratados com epitestosterona, observou-se um aumento significativo nos níveis de RNAm da subunidade beta do LH em todas as doses utilizadas. Os níveis de RNAm da subunidade beta do FSH, por sua vez, não foram diferentes entre os dois grupos; porém, observou-se uma correlação significativa entre o aumento gradual desses níveis e o aumento da dose plasmática de epitestosterona. A elevação dos níveis séricos de epitestosterona foi também correlacionada a um maior conteúdo de RNAm para a subunidade alfa, comum a ambos os hormônios gonadotróficos. Além desses achados, foi possível verificar uma redução nos níveis plasmáticos de testosterona nos ratos tratados com epitestosterona. Esse resultado pode indicar uma ação inibitória dessa última sobre a síntese da primeira (LAPCIK *et al.* 1994).

As concentrações séricas de epitestosterona possuem uma correlação negativa com os níveis de estradiol séricos. Estudos *in vitro* demonstraram a influência da epitestosterona sobre a síntese de estradiol através de uma ação inibitória sobre a enzima  $17\beta$ -HSD; não sendo, porém, encontrada nenhuma ação sobre a atividade da enzima aromatase (BICÍKOVÁ *et al.* 2000).

Estudando o efeito da epitestosterona sobre a espermatogênese, Behre e colaboradores trataram ratos adultos com doses crescentes desse esteroide por três semanas. Entre os achados, foi observado redução no número total de espermátides nos animais tratados. Nos animais tratados com altas doses de epitestosterona, foi encontrada uma correlação negativa entre o conteúdo hipofisário de LH e o número total de células germinativas e espermátides por grama de tecido testicular. Os níveis séricos de testosterona e o número de células diplóides também apresentaram uma correlação negativa. Esses resultados podem indicar a participação deste esteroide na regulação do processo de espermatogênese em ratos (BEHRE *et al.* 1995).

Além de exercer um efeito antiandrogênica, a epitestosterona parece também possuir uma ação através de um mecanismo de membrana. Uma via de ação não-clássica desse esteroide sobre o relaxamento do músculo liso uterino foi descrita (PERUSQUIA *et al.* 1996). Um mecanismo de ação semelhante foi demonstrado para o  $17\alpha$ -estradiol (epiestradiol), por muito tempo considerado como sendo um isômero inativo do  $17\beta$ -estradiol. Um estudo realizado por Perusquía e Navarrete revelou que ambos os isômeros do estradiol,  $17\alpha$  e  $17\beta$ -estradiol (epiestradiol), promovem o relaxamento do músculo liso uterino através de uma via não genômica. De forma similar à epitestosterona em relação à testosterona, o epiestradiol apresenta uma ação

antagonista em relação ao estradiol (ação antiestrogênica), reduzindo a resposta do tecido uterino a esse esteroide (PERUSQUÍA E NAVARRETE 2005).

Estudos realizados por Hammond e colaboradores (2001) demonstraram uma ação neuroprotetora da epitestosterona em cultura de células de neurônios humanos submetidos à privação de soro. Nessas células, esse esteroide promoveu uma redução significativa nas taxas de apoptose. O bloqueio do receptor intracelular de androgênios, com o antagonista flutamida, não modificou o seu efeito neuroprotetor, indicando que esse ocorre por uma via independente do iAR. Uma possível explicação para esses resultados seria a aromatização da epitestosterona em  $17\alpha$ -estradiol, que possui uma ação neuroprotetora através de um mecanismo não-clássico (HAMMOND *et al.* 2001).

Pouco ainda se compreende sobre o papel fisiológico da epitestosterona. Nesse sentido, a maioria dos estudos busca investigar o efeito deste hormônio através do mecanismo de ação clássico dos andrógenos, enfocando o seu efeito antiandrogênico. Há, por conseguinte, a necessidade de mais pesquisas enfocando um possível mecanismo não clássico desse esteroide. Além disso, não existem trabalhos sobre a ação desse hormônio em células de Sertoli de ratos imaturos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAIS**

- Estudar o mecanismo de ação não clássico da epitestosterona sobre o potencial e a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de diferentes idades.
- Estudar o envolvimento do cálcio nas ações não clássicas da epitestosterona no tecido testicular de ratos imaturos.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Comparar a resposta da epitestosterona com a da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de diferentes idades.
- Verificar o envolvimento do receptor intracelular de androgênios na ação da epitestosterona sobre o potencial e a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos imaturos, utilizando bloqueadores desse receptor, como a flutamida.
- Verificar o envolvimento da fosfolipase C (PLC) na ação da epitestosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos imaturos, utilizando bloqueadores dessa enzima, como o U73122.
- Verificar o envolvimento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L na ação da epitestosterona sobre o potencial de membrana em

células de Sertoli de ratos imaturos, utilizando bloqueadores desses canais, como o verapamil.

- Verificar a ação da epitestosterona sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos imaturos.
- Comparar a resposta da epitestosterona com a da testosterona sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos imaturos.
- Verificar o envolvimento do receptor intracelular de androgênios na ação da epitestosterona sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos imaturos, utilizando bloqueadores desse receptor, como a flutamida.



## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos com 10, 12, 15, 21 e 35 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Esta dissertação faz parte do projeto: “Ações da epitestosterona através de um mecanismo de membrana em células de Sertoli de ratos imaturos: implicações no desenvolvimento sexual”, o qual obteve aprovação no Comitê de Ética sob o número 18084 no CEUA-UFRGS.

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos do animal por incisão abdominal, limpos e decapsulados. As carcaças dos animais e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao biotério do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS.

#### **3.1.2. Soluções**

Foi utilizada uma solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) como meio de incubação, em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções estoques conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Composição salina e concentrações presentes nas soluções de estoque de Krebs e na solução final.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final na Solução KRb (mM)
	(g/L)	(M)	
<b>NaCl</b> CLORETO DE SÓDIO	180,00		146
<b>KCl</b> CLORETO DE POTÁSSIO	9,20	0,123	4,7
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO	4,22	0,031	1,2
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> BICARBONATO DE SÓDIO	54,60	0,65	25
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> SULFATO DE MAGNÉSIO	7,64	0,031	1,2
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b> CLORETO DE CÁLCIO	9,60	0,065	2,5
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b> Glicose	25,00	0,14	5,5

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obterem-se as concentrações finais descritas na tabela 1. A solução era gaseificada com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em pHmetro. A solução assim obtida foi mantida em gelo durante a preparação do experimento. O descarte dos resíduos não tóxicos, por exemplo, das soluções salinas que não foram utilizadas, foi feito no esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos

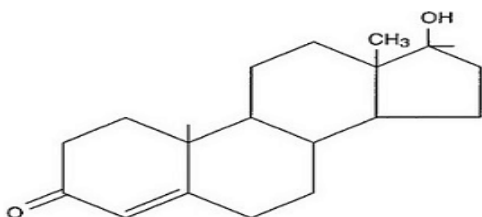
experimentos foram acondicionados em frascos para serem encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para o procedimento correto quanto ao descarte. Os resíduos radioativos foram acondicionados e encaminhados conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS.

### 3.1.3. Substâncias utilizadas

a) Isótopo radioativo de Cálcio [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]: atividade específica 1mCi/mg, adquirido da Du Pont – NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ . A meia vida é de 163 dias, e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela Du Pont-NEN Research Products, em função da data de fabricação.

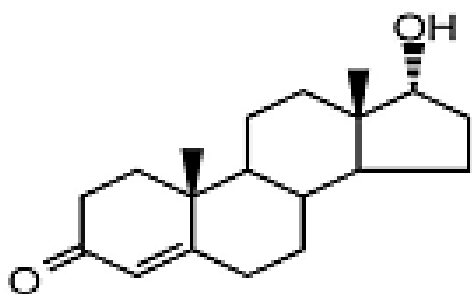
b) Líquido de Cintilação: Optiphase Hisafe III (Wallac, Finlândia). Foi utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

c) Testosterona (figura 5): (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Hormônio esteroide com ação androgênica e anabólica, pesado em balança analítica e diluído em etanol e posteriormente em KRb, produzindo uma solução com 1 $\mu\text{M}$  de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.



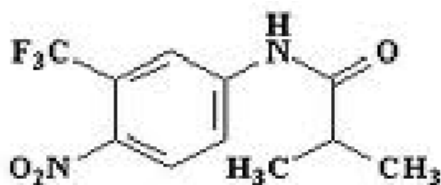
**Figura 5:** Estrutura molecular da Testosterona.

d) Epitestosterona (figura 6): é um epímero da testosterona de ocorrência natural. Foi pesado em balança analítica e diluído em etanol e posteriormente em KRb, produzindo soluções com 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M e 2 $\mu$ M de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.



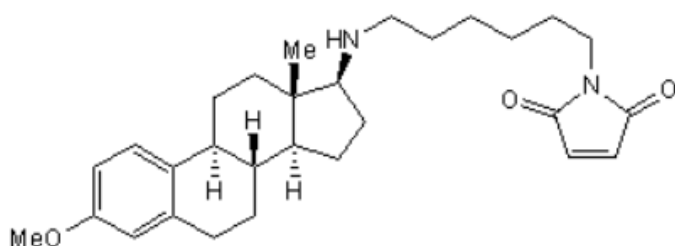
**Figura 6:** Estrutura molecular da Epitestosterona.

e) Flutamida (Sigma-Aldrich, Inc-USA) (figura 7): Bloqueador do receptor intracelular de androgênios. Solúvel em DMSO. Foi utilizada em concentrações de 1 $\mu$ M. Os experimentos realizados com flutamida foram protegidos da luz, visto se tratar de uma substância fotossensível. Os experimentos foram conduzidos e processados sob lâmpada de sódio. A concentração de DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



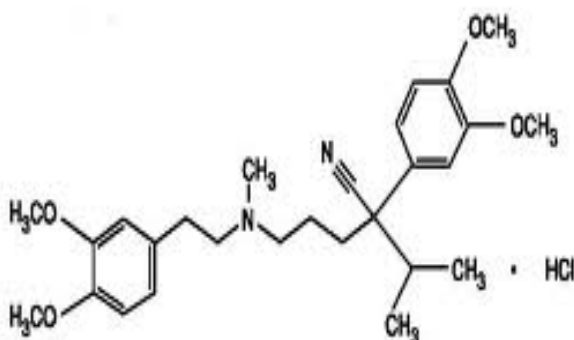
**Figura 7:** Estrutura molecular da Flutamida.

g) U73122 (Sigma-Aldrich, Inc-USA) (figura 8): (1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione). Bloqueador da enzima fosfolipase C (PLC), pesado em balança analítica e diluído em etanol e posteriormente em KRb, produzindo uma solução com 2 $\mu$ M de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução.



**Figura 8:** Estrutura molecular do U73122.

h) Verapamil (Sigma-Aldrich, Inc-USA) (figura 9): Bloqueador dos canais de cálcio tipo L voltagem-dependente (L-VDCC). Pesado em balança analítica, diluído em etanol e posteriormente em KRb, produzindo uma solução com 100 $\mu$ M de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução.



**Figura 9:** Estrutura molecular do verapamil.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular

Após serem decapsulados, os testículos foram cuidadosamente estirados em uma câmara de perfusão com o auxílio de duas pinças de ponta fina. Os túbulos seminíferos expostos (5 a 10) foram presos no fundo da câmara com uma grade de fio ortodôntico. A câmara foi preenchida com 1 mL de KRb glicosado e levada para a perfusão. Os túbulos foram perfundidos com o fluxo de 1 mL/min de KRb glicosado (5 mmol/l), a 36°C, pH 7,4, equilibrado com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5; v/v).

O potencial de membrana das células de Sertoli foi registrado com microeletrodos preenchidos com 3 mol/L de KCl, com uma resistência de 15 a 25 MΩ (figura 10). O microeletrodo foi conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK), e o sinal era monitorado por um osciloscópio (Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210). Os traçados observados no osciloscópio foram adquiridos e armazenados em um computador através de uma placa e um programa de interface (Wavestar Lite Version 1.0.10). Pulsos quadrados de corrente (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) para avaliar a resistência da membrana. As substâncias testadas (epitestosterona e testosterona) foram aplicadas topicamente ao banho após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos. Antagonistas ou bloqueadores (flutamida, U73122 ou verapamil) foram aplicados, minutos antes do hormônio, por perfusão na

câmara onde estão localizados os túbulos seminíferos. Os registros da variação do potencial de membrana e da resistência da membrana foram realizados com os diferentes tratamentos. Cada tratamento foi repetido por no mínimo cinco vezes em diferentes células (figura 11).

### 3.2.2. Cálculo da Resistência da Membrana

A resistência da membrana foi calculada utilizando-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

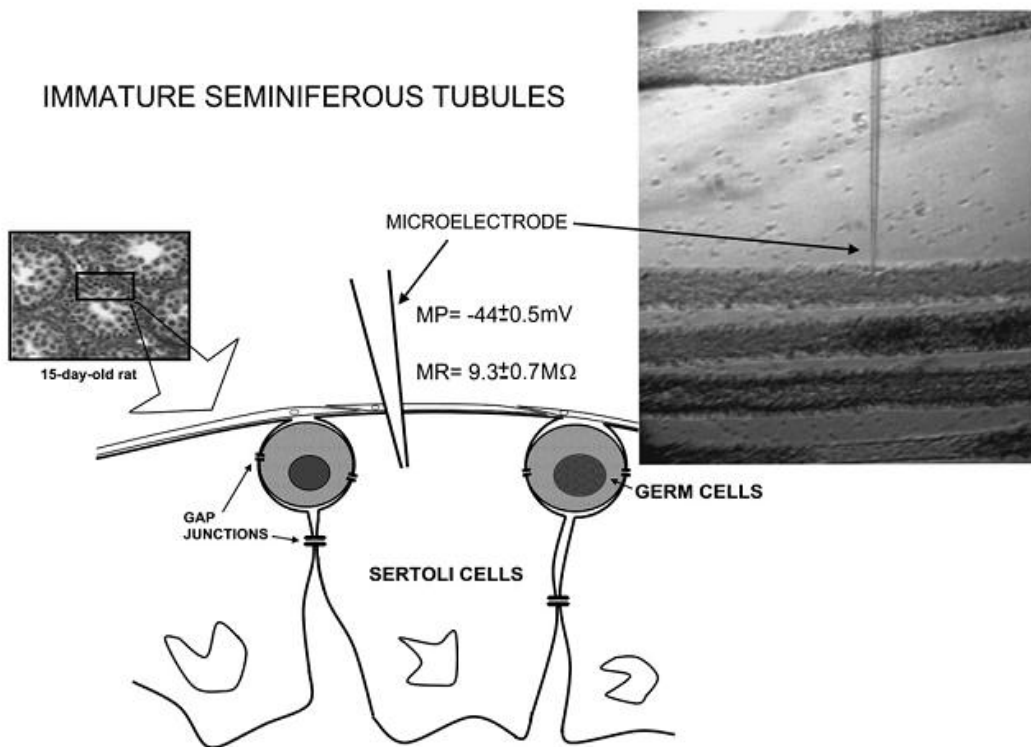
R= resistência ( $\Omega$ - ohms)

LEI DE OHM:

$$I=V/R \Rightarrow R=V/I$$

Resistência da membrana = Voltagem registrada no osciloscópio / pulso de corrente aplicado.

A voltagem registrada no osciloscópio esta relacionada com o valor de resistência correspondente ao traçado vertical, obtido no registro do potencial de membrana da célula em decorrência do pulso de corrente aplicado. O pulso de corrente aplicado foi de 0,5nA.



**Figura 10.** Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana (PM) e resistência da membrana (RM) (LOSS *et al.* 2011)



**Figura 11.** Representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5nA.

### 3.2.3. Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos inteiros

Foram utilizados ratos de 10-12 dias de idade. Os animais foram mortos através de deslocamento cervical. Os testículos, após serem retirados, foram limpos, pesados, decapsulados e colocados em salina, Krebs Ringer bicarbonato (KRb) (mantida a 32°C, pH 7,4, gaseificada com mistura de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$



(95:5; v/v). As gônadas foram pré-incubadas por 60 minutos em KRb na presença de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (4,44 KBq/20ng), para alcançar o equilíbrio intra e extracelular de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , e na presença ou ausência de flutamida (1 $\mu\text{M}$ ). Os testículos foram incubados por 5 minutos na presença de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com ou sem testosterona (1 $\mu\text{M}$ ) ou epitestosterona (1 $\mu\text{M}$ ). Para finalizar a incubação foram adicionados a cada frasco, 2mL de cloreto de lantânio (10mM) a 2°C para parar o fluxo de captação de cálcio (BATRA *et al.* 1983). O sobrenadante foi preservado e os testículos foram lavados duas vezes com a solução de cloreto de lantânio fria. Os testículos, então, foram removidos para tubos com 1mL de água destilada. Todos os tubos foram congelados por 24 horas e os testículos foram fervidos por dez minutos. Alíquotas de 100 $\mu\text{L}$  do meio interno e externo foram tomadas para a medida de radioatividade em líquido de Aquasol 2. A radioatividade foi dosada em contagens por minuto (cpm) em um espectrômetro de Cintilação LKB Rack-Beta modelo 1215 (LKB Produkter AB, Bromma, Suécia) com eficiência de 85 a 90%. O valor em cpm foi convertido à pmoles de cálcio de acordo com o decaimento da atividade específica do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , fornecido pelo fabricante. Os resultados foram expressos pela razão pmoles  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / g de tecido.

### 3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos da análise da resposta eletrofisiológica foram dados pela média  $\pm$  SEM da variação do potencial e da resistência da membrana em diferentes tempos após a aplicação das substâncias estudadas. Os resultados da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foram dados pela média razão pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / g de tecido  $\pm$  SEM.

Para a análise estatística dos resultados da variação do potencial de membrana das células de Sertoli e da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular foi realizado o teste ANOVA de uma ou duas vias para medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para a análise estatística dos resultados da variação da resistência de membrana das células de Sertoli foi realizado o Teste t de Student não pareado. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat versão 3.01, 32 bit para Windows 95/NT (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Foram considerados significativos resultados que apresentaram um  $p < 0.05$ .

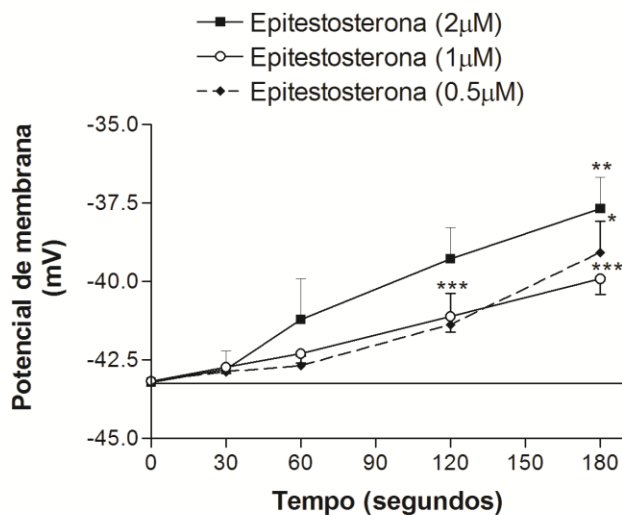
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Valores do potencial e da resistência de membrana basais das células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade

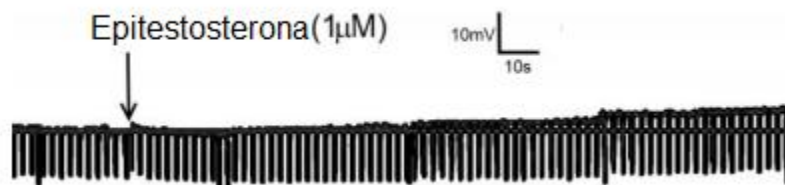
Nas condições experimentais desse trabalho, as características elétricas basais registradas das células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade foram as seguintes: potencial de repouso de  $-44 \pm 9.0 \text{ mV}$  ( $n=29$  células) e resistência de membrana de  $32.9 \pm 10 \text{ M}\Omega$  ( $n=29$  células). As características elétricas basais registradas das células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade foram as seguintes: potencial de repouso de  $-46 \pm 6.7 \text{ mV}$  ( $n=11$  células) e resistência de membrana de  $19.7 \pm 6 \text{ M}\Omega$  ( $n=11$  células). As características elétricas basais registradas das células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade foram as seguintes: potencial de repouso de  $-39 \pm 7.9 \text{ mV}$  ( $n=9$  células) e resistência de membrana de  $23.3 \pm 7 \text{ M}\Omega$  ( $n=9$  células). Essas condições permaneceram estáveis pelo menos por 30 minutos antes do experimento.

#### 4.2. Efeito da epitestosterona em diferentes doses sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

A aplicação da epitestosterona ocasionou uma resposta de despolarização no potencial de membrana das células de Sertoli (figura 13), sendo significativa aos 120 segundos após a aplicação na dose de 1  $\mu$ M e aos 180 segundos após a aplicação nas doses de 0,5, 1 e 2  $\mu$ M, em comparação com o repouso (figura 12).



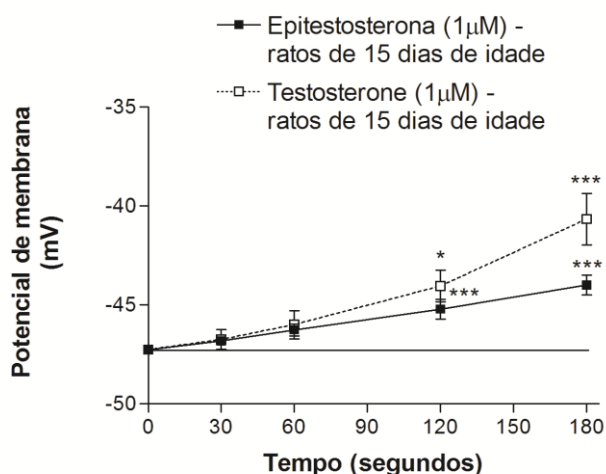
**Figura 12:** Efeito da epitestosterona nas doses de 0,5  $\mu$ M (n=5 células), 1  $\mu$ M (n=9 células) e 2  $\mu$ M (n=6 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 em relação ao repouso).



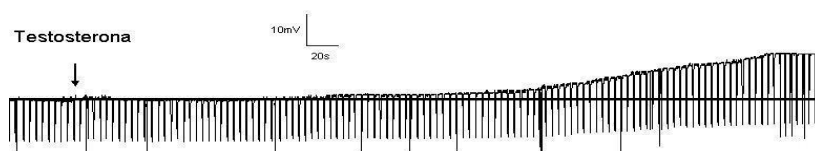
**Figura 13:** Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica após a aplicação tópica da epitestosterona (1  $\mu$ M). Potencial de repouso: -44 mV.

### 4.3. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

A epitestosterona ocasionou uma resposta de despolarização no potencial de membrana das células de Sertoli, sendo significativa aos 120 e 180 segundos após a aplicação, em comparação com o repouso (figura 14). A testosterona ocasionou também uma resposta de despolarização significativa aos 120 e 180 segundos após a aplicação, em comparação com o repouso (figura 15). Não houve diferença significativa em relação à resposta despolarizante desses dois hormônios (figura 14).



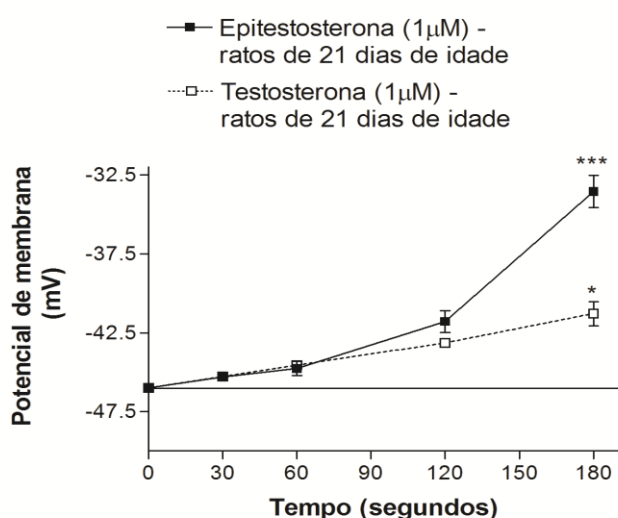
**Figura 14:** Efeito da epitestosterona (1µM) (n=9 células) e da testosterona (1µM) (n=9 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05 e \*\*\*p<0.001 em relação ao repouso).



**Figura 15:** Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica após a aplicação tópica da testosterona (1µM). Potencial de repouso: -42mV

#### 4.4. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade.

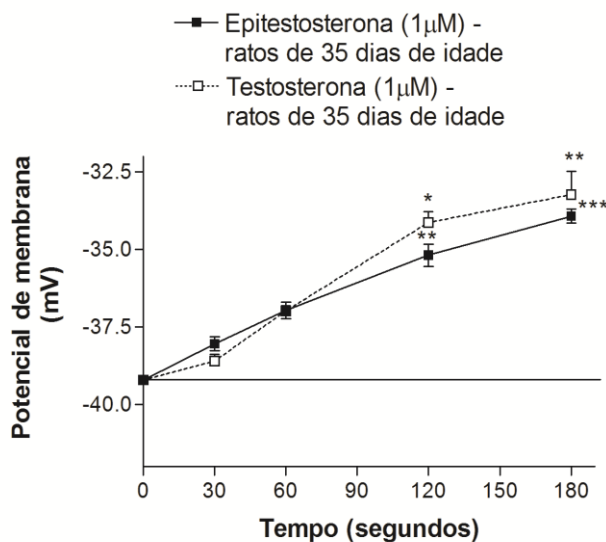
A epitestosterona ocasionou uma resposta de despolarização no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade, sendo significativa aos 180 segundos após a aplicação, comparando com o repouso (figura 16). A testosterona ocasionou também uma resposta de despolarização significativa aos 180 segundos após a aplicação, em comparação com o repouso (figura 16). Não houve diferença significativa em relação à resposta despolarizante desses dois hormônios.



**Figura 16:** Efeito da epitestosterona (1µM) (n=6 células) e da testosterona (1µM) (n=5 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05 e \*\*\*p<0.001 em relação ao repouso).

#### 4.5. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade.

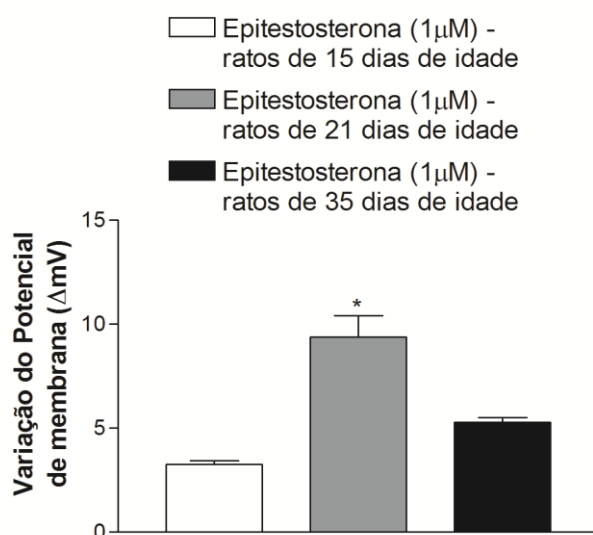
A epitestosterona ocasionou uma resposta de despolarização no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade, sendo significativa aos 120 e 180 segundos após a aplicação, comparando com o repouso (figura 17). A testosterona ocasionou também uma resposta de despolarização significativa aos 120 e 180 segundos após a aplicação, em comparação com o repouso (figura 17). Não houve diferença significativa em relação à resposta despolarizante desses dois hormônios.



**Figura 17:** Efeito da epitestosterona (1µM) (n=5 células) e da testosterona (1µM) (n=4 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 em relação ao repouso).

#### 4.6. Comparação do efeito da epitestosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade.

Comparando o efeito da epitestosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade, houve diferença significativa entre essa variação em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade em comparação com células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade (figura 18).

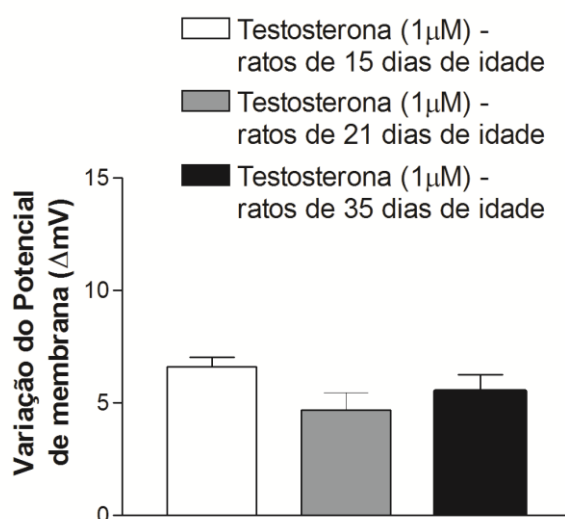


**Figura 18:** Comparação do efeito da epitestosterona ( $1 \mu M$ ) sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas ( $*p < 0.05$  em relação à variação do potencial de membrana do grupo de ratos de 15 dias).



#### 4.7. Comparação do efeito da testosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade.

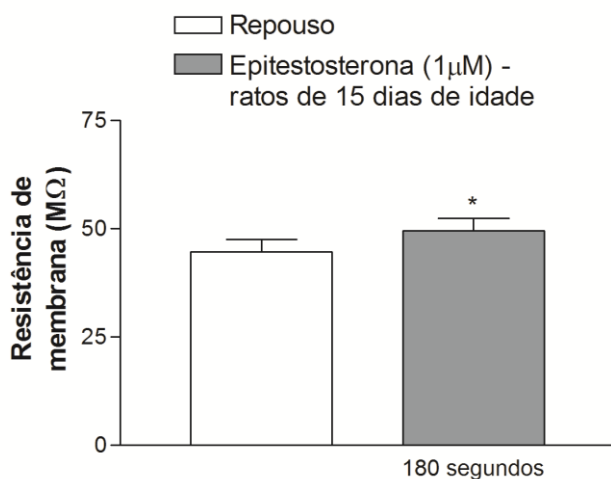
Comparando o efeito da testosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade, não houve diferença significativa entre essa variação nas três idades testadas (figura 19).



**Figura 19:** Comparação do efeito da testosterona ( $1 \mu M$ ) sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas.

#### 4.8. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

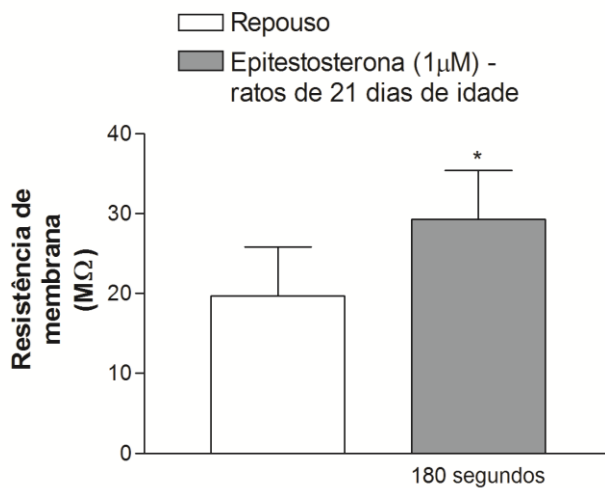
A epitestosterona ocasionou um aumento na resistência de membrana das células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. Essa resposta foi significativa aos 180 segundos após a aplicação, em comparação com o repouso (figura 20).



**Figura 20:** Efeito da epitestosterona (1μM) (n=9 células) sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. Teste t de Student (\*p<0.05 em relação ao repouso).

#### 4.9. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade.

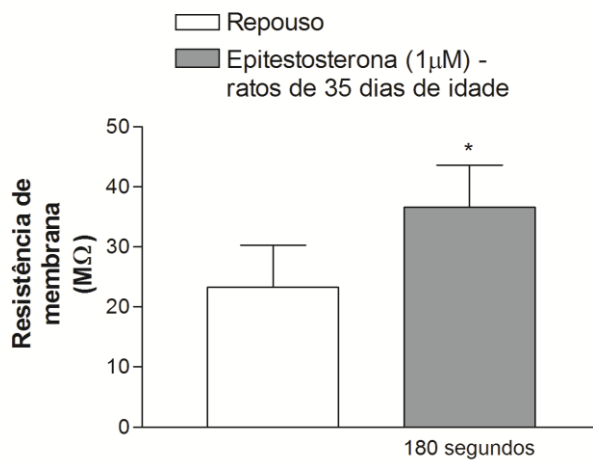
A epitestosterona ocasionou um aumento na resistência de membrana das células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade. Essa resposta foi significativa aos 180 segundos após a aplicação comparando com o repouso (figura 21).



**Figura 21:** Efeito da epitestosterona (1µM) (n=6 células) sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 21 dias de idade. Teste t de Student (\*p<0.05 em relação ao repouso).

#### 4.10. Efeito da epitestosterona sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade.

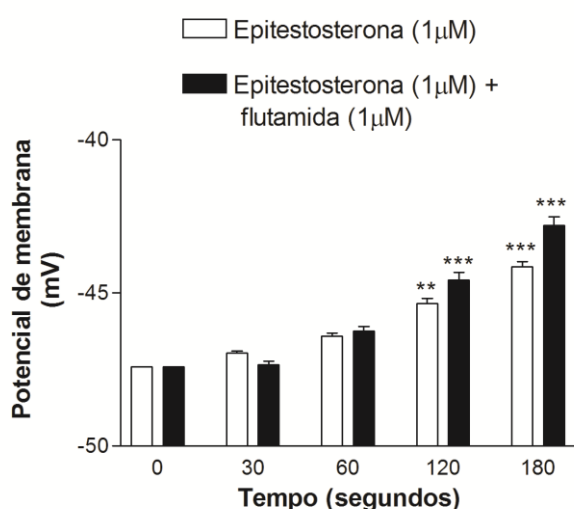
A epitestosterona ocasionou um aumento na resistência de membrana das células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade. Esta resposta foi significativa aos 180 segundos após a aplicação comparando com o repouso (figura 22).



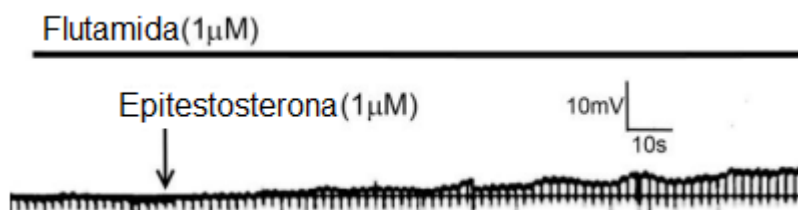
**Figura 22:** Efeito da epitestosterona (1µM) (n=5 células) sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 35 dias de idade. Teste t de Student (\*p<0.05 em relação ao repouso).

#### 4.11. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a resposta despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

Na presença do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, a epitestosterona continuou apresentando uma resposta despolarizante significativa aos 120 e 180 segundos após a aplicação, comparando com o repouso (figuras 23 e 24). Não houve diferença significativa na resposta de despolarização da epitestosterona entre as células com e sem flutamida.



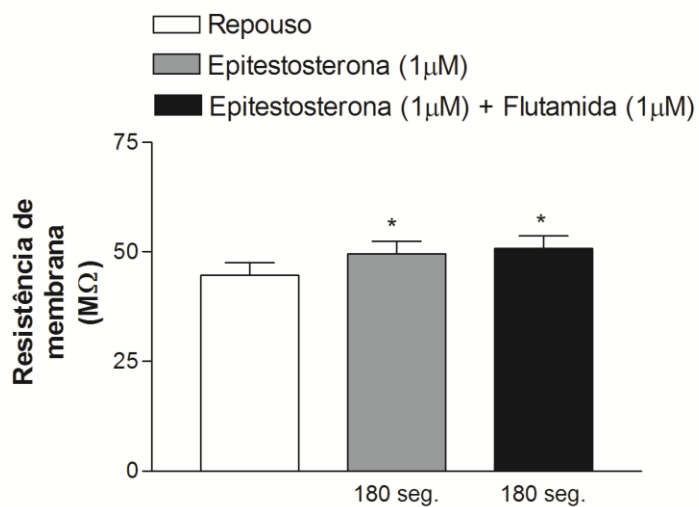
**Figura 23:** Efeito da flutamida (1µM) sobre a resposta despolarizante da epitestosterona (1µM) (n=6 células) em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. (\*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001 em relação ao repouso).



**Figura 24:** Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica perfundida com flutamida, após a aplicação tópica da epitestosterona (1µM).

#### 4.12. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a ação da epitestosterona na resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

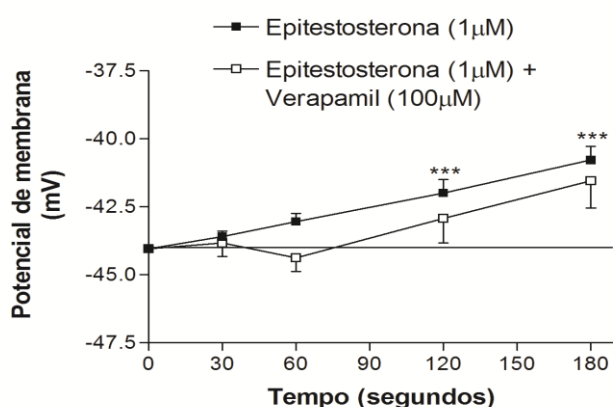
Na presença do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, a epitestosterona continuou apresentando uma resposta de aumento da resistência de membrana em células de Sertoli (figura 25). Essa resposta foi significativa aos 180 segundos após a aplicação comparando com o repouso. Não houve diferença significativa nessa resposta da epitestosterona entre as células com e sem flutamida.



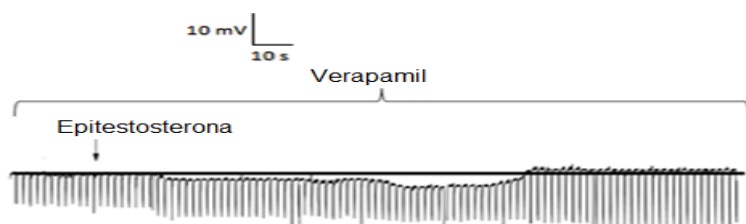
**Figura 25:** Efeito da flutamida (1μM) sobre a ação da epitestosterona (1μM) (n=6 células) sobre a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05 em relação ao repouso).

#### 4.13. Efeito do bloqueador dos canais de cálcio tipo L, verapamil, sobre a ação despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

Na presença do bloqueador dos canais de cálcio tipo L, verapamil, a resposta despolarizante da epitestosterona foi parcialmente reduzida, não havendo diferença significativa na variação do potencial de membrana das células estimuladas com epitestosterona em relação ao potencial de repouso (figuras 26 e 27). Comparando a variação do potencial de membrana das células com e sem verapamil, não houve diferença significativa. O conjunto dos resultados indica um bloqueio parcial da resposta desse hormônio pelo fármaco verapamil.



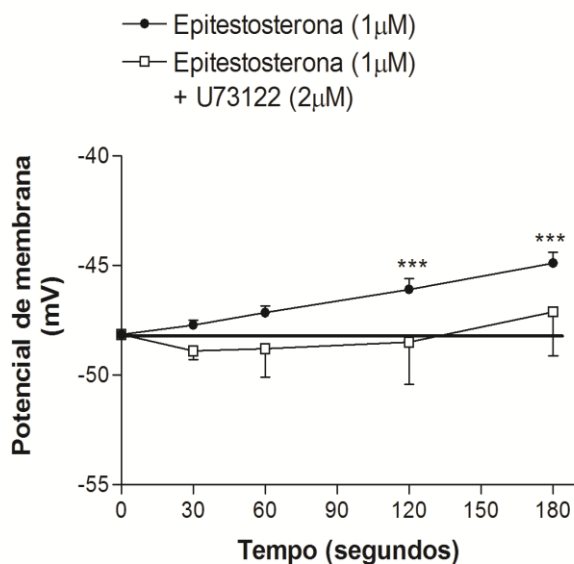
**Figura 26:** Efeito do verapamil (100µM) sobre a ação da epitestosterona (1µM) (n=6 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*\*p<0.001 em relação ao repouso).



**Figura 27:** Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica perfundida com verapamil, após a aplicação tópica da epitestosterona (1µM).

#### 4.14. Efeito do inibidor da enzima fosfolipase C, U73122, sobre a ação despolarizante da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.

Na presença do bloqueador da enzima fosfolipase C, U73122, a resposta despolarizante da epitestosterona foi parcialmente reduzida, não havendo diferença significativa na variação do potencial de membrana das células estimuladas com epitestosterona em relação ao potencial de repouso (figura 28). Comparando a variação do potencial de membrana das células com e sem U73122, não houve diferença significativa. O conjunto dos resultados indica um bloqueio parcial da resposta desse hormônio na presença do U73122.

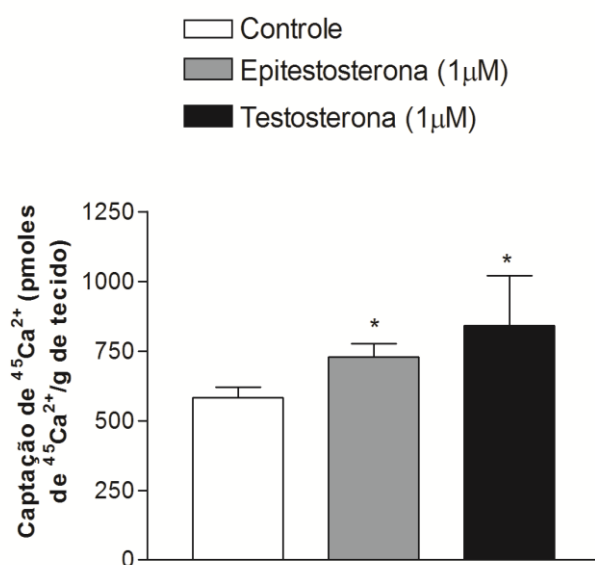


**Figura 28:** Efeito do U73122 (2µM) sobre a ação da epitestosterona (1µM) (n=8 células) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*\*\*) $p < 0.001$  em relação ao repouso).



#### 4.15. Comparação do efeito da epitestosterona e da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade.

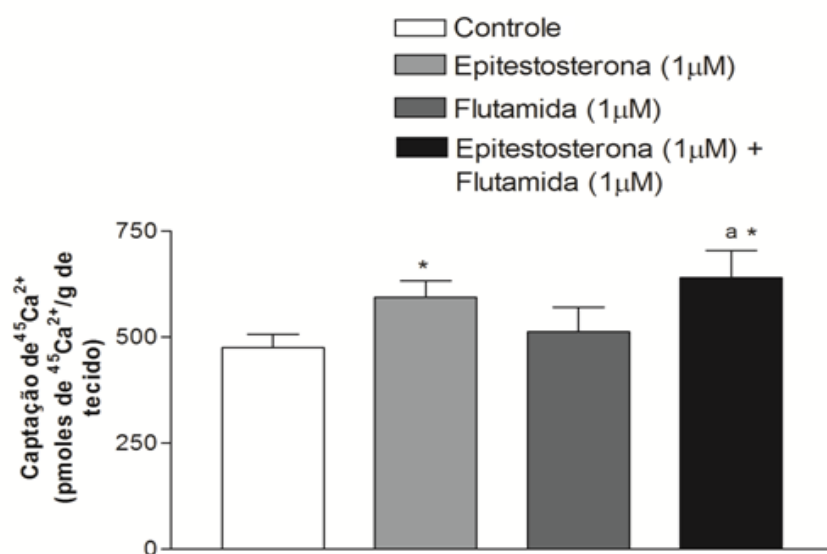
A epitestosterona ocasionou um aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade após 5 minutos de incubação. Esse aumento foi significativo em comparação com o basal (figura 29). A testosterona também ocasionou um aumento na captação  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular após 5 minutos de incubação (figura 29). Esse aumento foi significativo comparando com o basal. Não houve diferença em relação à resposta desses dois hormônios.



**Figura 29:** Comparação do efeito da epitestosterona (1µM) (n=5) e da testosterona (1µM) (n=5) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05 em relação ao controle).

**4.16. Efeito do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, sobre a ação da epitestosterona na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade.**

Na presença do bloqueador do receptor de androgênios intracelular, flutamida, a epitestosterona continuou apresentando uma resposta de aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade após 5 minutos de incubação (figura 30). Esse aumento foi significativo em comparação com o basal e em comparação com o grupo flutamida.



**Figura 30:** Efeito da flutamida (1 $\mu\text{M}$ ) sobre a ação da epitestosterona (1 $\mu\text{M}$ ) (n=5) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0.05 em relação ao controle e <sup>a</sup>p<0.05 em relação ao grupo flutamida).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram um mecanismo de ação rápido da epitestosterona em células de Sertoli de ratos Wistar imaturos. Em diferentes doses (0,5, 1 e 2 $\mu$ M), esse hormônio promoveu uma resposta de despolarização do potencial de membrana, significativa aos 120 e 180 segundos após sua aplicação, em comparação com o repouso (figura 12). Na figura 13, há o registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica após a aplicação tópica da epitestosterona, demonstrando esta resposta despolarizante. O curto período em que a ação desse hormônio foi deflagrada é incompatível com o tempo necessário para os processos de transcrição gênica e síntese protéica resultantes da ligação dos esteroides ao iAR, que podem levar de minutos até horas (LOSEL *et al.* 2003). Essa resposta rápida ocorre, provavelmente, através da ligação da epitestosterona em um receptor localizado na membrana plasmática, assim como já foi descrito para outros androgênios (SUN *et al.* 2006; MACHELON *et al.* 1998; LOSS *et al.* 2004; CAVALARI *et al.* 2012). Conquanto esse receptor androgênico não tenha sido ainda caracterizado em nível molecular, receptores de membrana para outros esteroides, como o estradiol e a progesterona, já foram identificados e são os responsáveis pela ação não clássica desses hormônios (HAZELL *et al.* 2009; LINDSEY *et al.* 2009). Esses dados também corroboram com os resultados encontrados sobre a ação rápida da epitestosterona em células musculares lisas no tecido uterino (PERUSQUIA *et al.* 1996). Assim como a epitestosterona, que é um isômero da testosterona, o 17 $\alpha$ -estradiol, que, anteriormente, se acreditava tratar de um isômero hormonalmente inativo do

17 $\beta$ -estradiol, também apresentou uma resposta não clássica no tecido uterino (PERUSQUIA *et al.* 2005).

Em ratos, as células de Sertoli proliferam-se entre o período fetal e o neonatal, até mais ou menos 15 a 20 dias após o nascimento. Após esse período, ocorre um processo de maturação, que envolve a perda da capacidade proliferativa e a formação de junções oclusivas entre as células para a formação da barreira hematotesticular. Apesar da presença de algumas células de Sertoli adultas ao final do período neonatal, essas se tornam prevalentes após os 30 dias de idade, momento em que a maioria completa seu processo maturativo (SHARPE *et al.* 2003). No presente estudo, comparamos as respostas despolarizantes da epitestosterona e da testosterona em células de Sertoli de ratos com 15, 21 e 35 dias de idade. Nessas idades, as células de Sertoli encontram-se em diferentes fases do seu desenvolvimento, sendo as mesmas caracterizadas, respectivamente, como: fase de proliferação, de diferenciação e fase adulta (SHARPE *et al.* 2003). A resposta eletrofisiológica despolarizante da epitestosterona foi semelhante à apresentada pela testosterona em todas as idades avaliadas (figuras 14, 15, 16 e 17). Na figura 15 há o registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica após a aplicação tópica da testosterona, demonstrando um padrão de despolarização semelhante ao apresentado pela epitestosterona. Esses resultados indicam para um possível mecanismo de ação similar desses dois hormônios, que se mantém ao longo do desenvolvimento das células de Sertoli.

Trabalhos envolvendo as ações não clássicas da testosterona em células de Sertoli constataram que, quando a mesma é aplicada topicamente

em concentrações fisiológicas (0,1 a 0,25  $\mu\text{M}$ ), produz uma despolarização imediata ( $< 1$  segundo) sobre o potencial de membrana (VON LEDEBUR, *et al.* 2002, LOSS *et al.*, 2004). Esta despolarização aumenta com o tempo, chegando ao seu máximo em 5 minutos, e retorna ao potencial de repouso após a preparação ser lavada com solução salina (VON LEDEBUR *et al.* 2002). A resposta à testosterona é específica, uma vez que nem a progesterona nem o estradiol exercem algum efeito na membrana destas células (VON LEDEBUR *et al.* 2002). O perfil da resposta de despolarização desse hormônio em células de Sertoli é similar para diferentes concentrações (0,1 à 10  $\mu\text{M}$ ), variando apenas em intensidade e sendo maior nas doses mais elevadas (VON LEDEBUR *et al.* 2002). Apesar de a epitestosterona apresentar uma ação antagônica em relação à testosterona sobre o receptor de androgênios intracelular (NUCK *et al.* 1987; STARKA *et al.* 2003), ambos os esteroides parecem atuar de forma semelhante sobre um provável receptor localizado na membrana em células de Sertoli.

Além disso, quando comparamos o efeito da epitestosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos nas três idades testadas, verificamos uma diferença significativa entre as células de ratos de 21 dias de idade e as células de ratos de 15 dias de idade. Em células de ratos com 21 dias, a variação do potencial de membrana, 180 segundos após a aplicação do hormônio, foi significativamente maior do que em células de ratos com 15 dias (figura 18). Essa diferença encontrada pode estar refletindo modificações sofridas pelas células de Sertoli ao longo do seu desenvolvimento, uma vez que, após os 15-17 dias de idade do rato, essas células cessam sua atividade proliferativa e iniciam uma fase de diferenciação

(SHARPE *et al.* 2003). Quando comparamos o efeito da testosterona sobre a variação do potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15, 21 e 35 dias de idade, não se observa diferença significativa entre essa variação nas três idades testadas (figura 19).

Em células de Sertoli de ratos nas três idades estudadas, a epitestosterona promoveu um aumento na resistência de membrana, significativo após 180 segundos de sua aplicação, em comparação com o repouso (figuras 20, 21 e 22). Essa resposta eletrofisiológica pode indicar uma redução da corrente iônica ao longo da membrana celular, que, por sua vez, pode estar ligada ao fechamento de canais iônicos. Uma ação semelhante a essa foi encontrada para outros esteroides, como a testosterona e a nandrolona, e para a catequina, um flavonoide de ocorrência natural (LOSS *et al.* 2004; CAVALARI *et al.* 2012). Estudando a ação da nandrolona e da catequina sobre o potencial e a resistência de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade, Cavalari e colaboradores (2012) demonstraram que a aplicação tópica dessas substâncias promove uma resposta despolarizante, assim como um aumento da resistência de membrana, de forma semelhante à testosterona (CAVALARI *et al.* 2012).

Para investigar a participação do receptor intracelular de androgênios (iAR) na resposta eletrofisiológica da epitestosterona em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade, foi utilizada a flutamida, um antagonista desse receptor. Na presença desse bloqueador, tanto a resposta eletrofisiológica de despolarização como a de aumento da resistência de membrana, ocasionadas pela epitestosterona, não foram modificadas (figuras 23, 24 e 25). Na figura 24 há o registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica

perfundida com flutamida, após a aplicação tópica da epitestosterona, demonstrando que a resposta despolarizante deste esteróide ocorre mesmo na presença desse antagonista do iAR. Esses achados indicam, portanto, que as ações não clássicas da epitestosterona em células de Sertoli parecem ocorrer através da ligação dessa a outro receptor, que não o iAR. Corroborando com os resultados encontrados, há vários estudos mostrando que muitas das respostas rápidas dos esteroides androgênicos ocorrem de forma independente do iAR. Machelon e colaboradores (1998), investigando os efeitos não genômicos da androstenediona em células granulosas humanas, demonstraram que esse esteroide é capaz de aumentar os níveis de cálcio intracelular mesmo na presença de hidroxiflutamida. Em células de Sertoli, o esteroide nandrolona e o flavonoide catequina são, igualmente, capazes de promover uma resposta rápida de despolarização, assim como um aumento na resistência de membrana e na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , mesmo na presença de flutamida (CAVALARI *et al.* 2012). Apesar disso, há também muitos trabalhos discutindo a possibilidade do receptor de androgênios de membrana tratar-se do próprio iAR. Um estudo realizado em células de Sertoli demonstrou que a testosterona, em doses de 100nM, é capaz de induzir, em 5 minutos, a migração do iAR para a membrana plasmática (CHENG *et al.* 2007). Outro trabalho realizado em células de Sertoli demonstrou que a utilização de hidroxiflutamida foi capaz de bloquear o aumento dos níveis de cálcio citoplasmático induzidos pela testosterona (GORCZYNSKA e HANDELSMAN 1995). No tecido prostático, o aumento dos níveis desse íon ocasionado pela testosterona foi igualmente bloqueado pelo uso de flutamida; porém, não pelo uso de acetato de ciproterona (LYNG *et al.* 2000). Conquanto ainda sejam

necessários muitos estudos para esclarecer qual o receptor envolvido nas respostas não clássicas dos androgênios, em relação às ações da epitestosterona em células de Sertoli, os presentes resultados indicam que as mesmas ocorrem de forma independente do iAR.

A fim de verificar a participação dos L-VDCC na resposta eletrofisiológica da epitestosterona, foi utilizado o bloqueador desses canais, o fármaco verapamil (figuras 26 e 27). Na presença desse bloqueador, não houve diferença no potencial de membrana após 180 segundos de aplicação do hormônio, em comparação com o repouso. Esse resultado indica um bloqueio na resposta despolarizante desse esteroide. Porém, comparando a variação do potencial de membrana das células com e sem verapamil, não houve também diferença significativa. Esses achados caracterizam, portanto, um bloqueio parcial da resposta de despolarização da epitestosterona na presença de verapamil e demonstram a participação dos L-VDCC nesta resposta. Na figura 27 há o registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica perfundida com verapamil, após a aplicação tópica da epitestosterona, demonstrando a ausência da resposta de despolarização desse esteroide na presença desse fármaco. O envolvimento desses canais nas ações rápidas de membrana também foi constatado para outros hormônios em diversos tipos celulares. Em osteoblastos, a testosterona foi capaz de promover, após cinco segundos, um aumento nos níveis de cálcio intracelular através dos canais L-VDCC, e também através da mobilização dos estoques presentes no retículo endoplasmático (LIEBERHERR *et al.* 1994). Experimentos realizados em células de Sertoli de ratos imaturos demonstraram que a resposta despolarizante da testosterona é capaz de induzir a abertura de



canais do tipo L-VDCC, levando ao aumento dos níveis de cálcio intracelular. Estudos demonstraram que, na presença de agentes bloqueadores desses canais, tais como verapamil, nifedipina e  $\text{Ni}^{+2}$ , ocorre uma redução na resposta despolarizante da testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2011). Outros trabalhos igualmente mostraram que a utilização de inibidores dos L-VDCC pode suprimir o aumento do cálcio citoplasmático deflagrado por esse hormônio (GORCZYNSKA e HANDELSMAN 1995; LOSS *et al.* 2004). Em células granulosas, o aumento dos níveis desse íon ocasionado pela androstenediona também foi inibido na presença de verapamil (MACHELON *et al.* 1998).

Analisando a participação da enzima fosfolipase C na resposta despolarizante da epitestosterona, utilizou-se o inibidor dessa enzima, o U73122. Na presença do mesmo, a ação eletrofisiológica desse esteroide foi inibida. Não ocorreu diferença significativa entre o potencial de membrana 180 segundos após a aplicação e o repouso. Contudo, comparando a variação do potencial de membrana entre as células com e sem U73122, não foi encontrada também diferença significativa, caracterizando uma inibição parcial dessa resposta (figura 28). Esses achados apontam, por conseguinte, para o envolvimento dessa enzima nas ações de membrana da epitestosterona em células de Sertoli. A participação da PLC nas respostas rápidas de membrana de esteroides foi demonstrada por diversos trabalhos. Estudando a ação despolarizante da testosterona em células de Sertoli, foi possível constatar que a mesma pode ser inteiramente bloqueada com a utilização de U73122 (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2004). Além disso, o aumento da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos imaturos pode igualmente ser

completamente anulado na presença desse bloqueador. Esses achados apontam para uma conexão entre as ações não clássicas da testosterona e a estimulação da PLC (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2004; LOSS *et al.* 2011). A redução da quantidade de PIP<sub>2</sub> na membrana, ocasionada pela ativação dessa enzima, tem como consequência a redução da condutância produzida pelos canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, devido ao desequilíbrio de cargas iônicas da superfície da membrana, levando ao acúmulo de íons K<sup>+</sup> e a despolarização do potencial de membrana (WASSERMANN *et al.* 2004; BAUKROWITZ *et al.* 2000; LOSS *et al.* 2011). Assim como a epitestosterona e a testosterona, o esteroide sintético nandrolona e o flavonoide catequina também possuem uma resposta rápida de membrana em células de Sertoli, a qual é inibida na presença de U73122 (CAVALARI *et al.* 2012). A estimulação da PLC pode estar relacionada a uma ação de membrana da epitestosterona através de um GPCR do tipo Gq; entretanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

De forma semelhante à testosterona, a epitestosterona promoveu um aumento na captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> no tecido testicular de ratos de 10-12 dias de idade, após 5 minutos de incubação. Esse aumento foi significativo em comparação com o basal (figura 29). Na presença de flutamida, não ocorreu nenhuma alteração na resposta de captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (figura 30). Esses resultados reforçam a participação desse íon nas ações de membrana da epitestosterona em células de Sertoli. Em diversos tipos celulares, o cálcio pode funcionar como um segundo mensageiro, regulando inúmeros processos celulares, como a transcrição gênica, a apoptose, a motilidade e a proliferação celular. As variações nos níveis de cálcio intracelular podem ser detectadas por

várias proteínas, como, por exemplo, a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina, e possuem diferentes padrões temporais e espaciais (CRUZALEGUI *et al.* 2000; BERRIDGE *et al.* 1998). Em células de Sertoli, as oscilações desse íon podem sinalizar tanto processos de expressão gênica (LYNG *et al.* 2000; BERRIDGE *et al.* 1998), bem como modificações no citoesqueleto envolvidas com o desenvolvimento da série espermatogênica (LOSS *et al.* 2004). A epitestosterona, conforme demonstrado neste trabalho, promoveu o aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , o qual parece estar ligado à abertura dos canais do tipo L-VDCC; porém, mais estudos são necessários para verificar se outros mecanismos de entrada do cálcio também podem estar colaborando com esse aumento, como, por exemplo, a liberação desse íon de estoques no retículo endoplasmático.

Em relação à epitestosterona, muito se discute qual seria a sua função fisiológica. Trabalhos demonstram um papel deste esteroide na modulação da ação de hormônios, como a testosterona e a dihidrotestosterona, uma vez que o mesmo possui uma conhecida ação antiandrogênica (NUCK *et al.* 1987; STARKA *et al.* 1996; STARKA *et al.* 2003). Nesse sentido, há relatos sobre a influência da epitestosterona sobre a massa óssea (BROULIK *et al.* 1997), sobre os folículos pilosos (CHOI *et al.* 2001), sobre o tecido prostático (LAPCIK *et al.* 1994) e sobre as glândulas sebáceas (NUCK *et al.* 1987). Há também dados demonstrando o envolvimento da epitestosterona na expressão gênica dos hormônios hipofisários (LAPCIK *et al.* 1994) e na espermatogênese (BEHRE *et al.* 1995).

Poucos estudos, no entanto, existem sobre um mecanismo de ação rápida desse hormônio. Assim como outros esteróides androgênicos, quais

sejam a testosterona (VON LEDEBUR *et al.* 2002; LOSS *et al.* 2004; LOSS *et al.* 2011), a androstenediona (MACHELON *et al.* 1998) e a nandrolona (CAVALARI *et al.* 2012), a epitestosterona igualmente apresenta uma resposta rápida de membrana, promovendo a entrada de cálcio. O aumento desse íon no meio intracelular pode sinalizar muitos processos de transcrição gênica (LYNG *et al.* 2000, BERRIDGE *et al.* 1998), importantes, sem dúvida, para a maturação celular. Nesse sentido, a epitestosterona pode estar atuando, durante o período de desenvolvimento das células de Sertoli, de forma semelhante e complementar à testosterona, na regulação desse processo.

## 6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos obter as seguintes conclusões: A epitestosterona possui um mecanismo de ação através da membrana em células de Sertoli, apresentando uma resposta rápida (em minutos) sobre o potencial e a resistência de membrana e sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Essas respostas são semelhantes às apresentadas pela testosterona em células de Sertoli nas fases de proliferação, de diferenciação e fase madura. As respostas não clássicas desse hormônio em células de Sertoli parecem ocorrer de forma independente do receptor de androgênios intracelular. Além disso, as respostas eletrofisiológicas da epitestosterona envolvem a ativação da enzima PLC e a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L.

Os dados apresentados neste trabalho vêm, dessa forma, acrescentar novas informações sobre o mecanismo de ação e o papel fisiológico desse hormônio, ainda pouco compreendidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIMASA N., KOCHAKIAN C.D. Epitestosterone and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol: the characteristic metabolites of androst-4-ene-3,17-dione produced by mouse kidney in vitro. *Endocrinology*, v.92, p.72-82, 1973.
2. BATRA S, SJOGREN C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Science*, v.32, p.315-319, 1983.
3. BAUKROWITZ T., FAKLER B. K<sub>ATP</sub> channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *European Journal of Biochemistry*, v.267, p.5842-5848, 2000.
4. BEHRE H.M., HAMPL R., LAPCIK O., HILL M., STARKA L. The effect of epitestosterone on spermatogenesis in rats. *Endocrine Regulations*, v.29, n.4, p.195-199, 1995.
5. BELLEMARE V., FAUCHER F., BRETON R., LUU V. The Characterization of 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity (17 $\alpha$ -HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone. *BMC Biochemistry*, v.6, p.12, 2005.
6. BENTEN W.P., GUO Z., KRUCKEN J., WUNDERLICH F. Rapid effects of androgens in macrophages. *Steroids*, v.69, p.585-590, 2004.
7. BERRIDGE M.J., BOOTMAN M.D., LIPP P. Calcium – a life and death signal. *Nature*, v.395, p.645-648, 1998.
8. BICÍKOVÁ M., KLAK J., HILL M., STÁRKA L. The effect of epitestosterone on estrogen biosynthesis in vitro. *Hormone and Metabolic Research*, v.32, n.4, p.125-128, 2000.
9. BOWERS L.D. Oral dehydroepiandrosterone supplementation can increase the testosterone/epitestosterone ratio. *Clinical Chemistry*, v.45, p.295–297, 1999.
10. BRINKMAN A.O., AND TRAPMAN J. Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Advances in Pharmacology*, v.47, p.317-341, 2000.

11. BROULIK P.D., STARKA L. Effect of Antiandrogens Casodex and Epi-testosterone on Bone Composition in Mice. *Bone*, v.20, n.5, p.473-475, 1997.
12. CATLIN D.H., LEDER B.Z., AHRENS B.D., HATTON C.K., FINKELSTEIN J.S. Effects of androstenedione administration on epi-testosterone metabolism in men. *Steroids*, v.67, p.559–564, 2002.
13. CAVALARI F.C., DE CASTRO A.L., FRACASSO B.M., LOSS E.S. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: Effects of nandrolone decanoate and catechin. *Steroids*, v.77, p.118-125, 2012.
14. CHENG J., WATKINS S.C., WALKER W.H. Testosterone Activates MAP Kinase Via Src Kinase and the EGF Receptor in Sertoli Cells. *Endocrinology*, v.148, p.2066-2074, 2007.
15. CHOI M.H., YOO Y.S., CHUNG B.C. Biochemical roles of testosterone and epi-testosterone to 5 $\alpha$ -reductase as indicators of male-pattern baldness. *Journal of Investigative Dermatology*, v.116, p.57–61, 2001.
16. 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.
17. COUROT M., KILGOUR R.J. Endocrine control of mammalian testicular ontogenesis. *Archivos de Biologia y Medicina Experimentale*, v.17, p.249-255, 1984.
18. CRUZALEGUI F.H., BADING H. Calcium-regulated protein kinase cascades and their transcription factor targets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.57, p.402–410, 2000.
19. DEHENIN L. Secretion by the human testes of epi-testosterone with its sulfoconjugate and precursor androgen 5-androstene-3,17-diol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.44, p.171–177, 1993.
20. DEHENIN L., PERES G. Plasma and urinary markers of oral testosterone misuse by healthy men in presence of masking epi-testosterone administration. *International Journal of Sports Medicine*, v.17, p.315-319, 1996.

21. ELLIS J.A., STEBBING M., HARRAP S.B. Genetic analysis of male-pattern baldness and the 5 $\alpha$ -reductase genes. *Journal of Investigative Dermatology*, v.110, p.849-853, 1998.
22. FAWCETT D.W. Sistema reproductor masculino. In: *Tratado de Histología*. 11 ed. México: Ed. Interamericana – McGraw-Hill, 1993.
23. FIX C., JORDAN C., CANO P., WALKER W.H. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.101, p.10919-10924, 2004.
24. GANONG - *Fisiología Médica*. 19 ed. Ed. Mcgraw-Hill, 2000.
25. GORCZYNSKA E., HANDELSMAN D.J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology*, v.136, p.2052-2059, 1995.
26. GRISWOLD M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Developmental Biology*, v.9, p.411-416, 1998.
27. GUPTA D. Separation and estimation of testosterone and epitestosterone in the urine of pre-pubertal children. *Steroids*, v.10, p.457–471, 1967.
28. 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.
29. HAVLI'KOVA' 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.
30. HAZELL G.J., YAO S.T., ROPER J.A., PROSSNITZ E.R., O'CARROLL A.M., LOLAIT S.J. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *Journal of Endocrinology*, v.202, n.2, p.223-236, 2009.



31. HUBL W., SIEBERT W., BUCHNER M., HERING H. Die Ausscheidung von Testosterone, Epitosterone und Androstendion vor und nach HCG-Applikation bei normalen Männern und Patienten mit primärem und sekundärem Hypogonadism. *Endokrinologie*, v.58, p.62–74, 1971.
32. JANMEY P.A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annual Review of Physical Chemistry*, v.56, p.169-191, 1994.
33. KAMPA M., PAKONSTANSTI E.A., HATZOGLU A., STATHOPOULOS S., STOURNARAS C., CASTANAS E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB Journal*, v.16, p.1429-1431, 2002.
34. KARILA T., KOSUNEN V., LAINONEN A., TAHTELA R., SAPPALA T. High doses of alcohol increase urinary testosterone-to-epitosterone ratio in females. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v.687, p.109–116, 1996.
35. KAUFMANN J. Neue endokrinologische Befunde zur Entstehung der Prostata-Hypertrophie. *Organorama*, v.6, p.4–6, 1968.
36. KICMAN A.T., COUTTS S.B., COWAN D.A., HANDELSMAN D.J., HOWE C.J., BURRING S. Adrenal and gonadal contributions to urinary excretion and plasma concentration of epitosterone in men—effect of adrenal stimulation and implications for detection of testosterone abuse. *Clinical Endocrinology*, v.51, p.661–668, 1999.
37. LAPCIK O., HAMPL R., HILL M., STARKA L. Plasma levels of epitosterone from prepuberty to adult life. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.55, p.405-408, 1995.
38. LAPCIK O., PERHEENTUPA A., BICIKOVA M., HUHTANIEMI I., HAMPL R., STARKA L. The effect of epitosterone on gonadotrophin synthesis and secretion. *Journal of Endocrinology*, v.143, p.353-358, 1994.
39. LEITE L., LUCHI R., VON LEDEBUR E.I., 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. *Medical Science Research*, v.27, p.25–28, 1999.

40. LIEBERHERR M., GROSSE B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.10, p.7217–7223, 1994.
41. LINDSEY S.H., COHEN J.A., BROSNIHAN K.B., GALLAGHER P.E., CHAPPELL M.C. Chronic Treatment with the G Protein-Coupled Receptor 30 Agonist G-1 Decreases Blood Pressure in Ovariectomized mRen2.Lewis Rats. *Endocrinology*, v.150, n.8, p.3753-3758, 2009.
42. LONGHINO N., TAJI' C M., VERDIS M., JANKOVI' C D., DROBNJAK P. Urinary excretion of androstenedione, testosterone, epitestosterone and dehydroepiandrosterone during the normal menstrual cycle. *Acta Endocrinologica*, v.59, p.644–651, 1968.
43. LOSEL, R.M et al. Non-genomic steroid action: controversies, questions and answers. *Physiology Reviews*, v.83, p.965-1016, 2003.
44. LOSS E.S., JACOBSEN M., COSTA Z.S.M., JACOBUS, A.P., BORELLI F., WASSERMANN G.F. Testosterone modulates  $K^+$ <sub>ATP</sub> channels in Sertoli Cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. *Hormone Metabolism Research*, v.36, p.519-525, 2004.
45. LOSS E.S., JACOBUS A.P., WASSERMANN G.F. Diverse FSH and Testosterone signaling pathways in the Sertoli Cell. *Hormone Metabolism Research*, v.39, p.806-812, 2007.
46. LOSS E.S., JACOBUS A.P., WASSERMANN G.F. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: Calcium inflow and electrophysiological changes. *Life Science*, v.89, p.577-583, 2011.
47. LYNG F.M., JONES G.R., ROMMERTS F.F. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biology of Reproduction*, v.63, p.736–747, 2000.
48. MACHELON V., NOME F., TESARIK J. Nongenomic effects of androstenedione on human granulosa luteinizing cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.83, p.263–269, 1998.
49. MRUK D.D., CHENG C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the

- seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, v.25, p.747 – 806, 2004.
50. NUCK B.A., LUCKY A.W. Epi-testosterone. A potential new antiandrogen. *Journal of Investigative Dermatology*, v.89, p.209–211, 1987.
51. PERUSQUIA M., HERNANDEZ R., KUBLI-GRAFIAS C.. Epi-testosterone induces testosterone-like uterine relaxation, in: *Proceedings of the 10th International Congress Endocrinology*, vol. 1, abstract no. P2-578, San Francisco, p.549, 1996.
52. PERUSQUÍA M., NAVARRETE E. Evidence that 17 $\alpha$ -estradiol is biologically active in the uterine tissue: Antiuterotonic and antiuterotrophic action. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.3, p.30, 2005.
53. RHEAULT P., CHARBONNEAU A., LUU-THE V. Structure and activity of the murine type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1447, p.17-24, 1999.
54. SANTEN R.J. The testis. In: *Endocrinology and metabolism*. 3<sup>ed</sup>. 1995.
55. SCHELLHAMMER P., SHARIFI R., BLOCK N. A controlled trial of bicalutamide versus flutamide, each in combination with luteinizing hormone releasing hormone analogue therapy, in patients with advanced prostate cancer. *Urology*, v.45, p.745-752, 1995.
56. SCOBEY M.J., BERTERA S., SOMERS J.P., WATKINS S.C., ZELEZNIK A.J., WALKER W.H. Delivery of a Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein (CREB) Mutant to Seminiferous Tubules Results in Impaired Spermatogenesis. *Endocrinology*, v.142, p.948-954, 2001.
57. SHARPE R.M., MCKINNELL C., KIVLIN C., FISHER J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v.125, p.769-784, 2003.
58. SILVA F.R.M.B., LEITE, L.D., WASSERMANN G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology*, v.147, p.425-433, 2002.

59. SKINNER M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, v.12, n.1, p.45-77, 1991.
60. STARKA L. Epitestosterone. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.87, p.27-34, 2003.
61. STARKA L., BICÍKOVÁ M., HAMPL R. Epitestosterone—an endogenous antiandrogen? *Journal of Steroid Biochemistry*, v.33, p.1019–1021, 1989.
62. STÁRKA L., BREUER H. Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel von 17-Epitestosteron in Testisgewebe der Ratte, des Kaninchens und des Stieres. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, v.348, p.808–814, 1967.
63. STÁRKA L., BROULIK P.D., HAMPL R., NEDVÍDKOVÁ J., HILL M. Antirenotropic action of antiandrogens cyproterone acetate, casodex, flutamide and epitestosterona. *Endocrine Regulation*, v.30, p.93–97, 1996.
64. STÁRKA L., HAMPL R., BÍČÍKOVÁ M., JELÍNEK R., DOSKOČIL M. Observations on the biological activity of epitestosterona. *Physiological Reviews*, v.40, p.317–326, 1991.
65. STEINBERGER A., STEINBERGER E. Replication pattern of Sertoli cell in maturing rat testes *in vivo* in organ culture. *Biology of Reproduction*, v.4, p.84-87, 1971.
66. SUN Y-H, GAO X, TANG Y-J, XU C-L, WANG L-H. Androgen induce increase in intracellular calcium via a G protein-coupled receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Andrology*, v.27, p.671-678, 2006.
67. TAMM J., APOSTOLAKIS M., VOIGT K.D. The effects of ACTH and hCG on the urinary excretion of testosterone in male patients with various endocrine disorders. *Acta Endocrinologica*, v.53, p.61–72, 1966.
68. VENTUROLI S., MARESCALCHI O., COLOMBO F.M. A prospective randomized trial comparing low-dose flutamide, finasteride, Ketoconazole, and cyproterone acetate-estrogen regiments in the treatment of hirsutism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.84, p.1304-1310, 1999.

69. VERHOEVEN G., HEYNS W., DE MOOR P. Testosterone receptors in the prostate and other tissues. *Vitamins and Hormones*, v.33, p.265–242, 1975.
70. VON LEDEBUR E.I., ALMEIDA J.P., LOSS E.S., WASSERMANN G.F. Rapid Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential, Relationship with  $K^+_{ATP}$  channels. *Hormone Metabolism Research*, v.34, p.550-555, 2002.
71. WALKER W.H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.365, p.1557-1569, 2010.
72. WALKER W.H. Nongenomic actions of androgens in Sertoli cells. *Current topics in developmental biology*, v.56, p.25-53, 2003.
73. WASSERMANN G.F., LOSS E.S. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a  $K_{IR6.x}$  channel related effect. *Current Pharmaceutical Design*, v.10, p.2649-2656, 2004.
74. WEUSTEN J.J., LEGEMAAT G., VAN DER WOUW M.P., SMALS A.G., KLOPPENBORG P.W., BENRAAD T. The mechanism of the synthesis of 16-androstenes in human testicular homogenates. *Journal of Steroid Biochemistry*, v.32, p.689-694, 1989.
75. WILSON H., LIPSETT M.B. Metabolism of epitestosterone in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.26, p.902–914, 1966.