

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

Efeito não-clássico da testosterona e da epitestosterona em testículos de ratos neonatos.

Luciana Abreu da Rosa

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloísa da Silveira Loss

Porto Alegre

2014

Luciana Abreu da Rosa

Efeito não clássico da testosterona e da epitestosterona em testículos de ratos neonatos.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloísa da Silveira Loss

Porto Alegre

2014

*“Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã.”*

Mahatma Gandhi

## AGRADECIMENTOS

À professora Eloísa Loss pela oportunidade, confiança, incentivo e dedicação.

Ao professor Guillermo Federico Wasserman pelo legado científico e estrutural.

Ao professor Luciano Stürmer de Fraga pelo auxílio e orientação nos experimentos de imunistoquímica, paciência e constante disposição em ajudar.

À professora Wania Partata pelas valiosas sugestões, disponibilização do laboratório e empréstimo de materiais para a técnica de imunistoquímica.

À professora Maria Flávia pelas valiosas contribuições.

Aos colegas do LABENEX Gustavo Escott, Fernanda Cavallari, Clara Schneider, Natalia Morelo, Laura Ayres, Tadeu Dourado e Letícia Arruda pela ajuda nos experimentos, paciência e amizade.

Aos amigos Rafaela Siqueira e Rafael Colombo pela amizade e companheirismo.

À Dona Elsa e Dona Ritinha pelo carinho.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia comparada e Neurobiologia do comportamento pela disponibilidade em ajudar.

Ao CREAL, em especial à veterinária Fernanda Mello pela constante disposição em ajudar e ao Joel pelo cuidado no transporte dos animais.

Aos professores do PPGCB: Fisiologia pela oportunidade.

Aos secretários do PPGCB: Fisiologia Vanessa, Diego e Daniela pela pronta disposição em ajudar.

Ao CNPq e PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e me incentivarem.

À minha madrinha Nina Bernieri pelo carinho, incentivo e torcida.

Às amigas Alice e Tatiane Flores, Nara Saraiva, Fernanda Cavalleri, Cristiane dos Santos e Elisiane Oliveira pela amizade, carinho e incentivo.

## RESUMO

A concentração intratesticular de andrógenos no período fetal e neonatal é elevada, entretanto as células de Sertoli não expressam o receptor intracelular de andrógenos (iAR). Assim, neste período as células de Sertoli não respondem aos andrógenos através dos mecanismos clássicos. A importância fisiológica da elevada concentração de andrógenos ainda não é compreendida, acredita-se ser em virtude de sua ação através de mecanismos não-clássicos. Os hormônios T (testosterona) e FSH atuam sinergicamente para aumentar a eficiência da espermatogênese, entretanto estudos mostram que o FSH bloqueia a fosforilação ERK mediada pela ação não-clássica da T. Este estudo teve por objetivos: avaliar a expressão de iAR em células de Sertoli de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn; avaliar o efeito da T e da EpiT sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn; avaliar o efeito da T sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 5º dpn; e avaliar a interação entre os efeitos eletrofisiológicos da T e epitestosterona (EpiT) com o FSH em células de Sertoli de ratos no 14º dpn. A técnica de imunistoquímica foi utilizada para a avaliação da imunorreatividade ao iAR (n=5 por grupo). Na técnica de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  testículos inteiros de ratos no 4º dpn foram pré-incubados com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por 60 minutos e incubados com T (1  $\mu\text{M}$ ) ou EpiT (1  $\mu\text{M}$ ) por 5 minutos (n=5 por grupo). O potencial e a resistência de membrana das células de Sertoli foram registrados através da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. O registro intracelular da célula de Sertoli foi realizado utilizando microcapilares de borossilicato preenchidos com KCl 3 M acoplados a um eletrômetro. Nos testículos de animais no 5º dpn foi realizada a aplicação de T (1  $\mu\text{M}$ ), n=4. Nos animais no 14º dpn foi realizada a aplicação de FSH (4 mU) seguida da aplicação de T (1  $\mu\text{M}$ ) ou EpiT (1  $\mu\text{M}$ ), após 30 segundos (n=7 e 6, respectivamente); e EpiT (1  $\mu\text{M}$ ) após 5 minutos (n=6). Os resultados foram dados como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados pelo teste T student para comparação entre dois grupos, ANOVA para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni e teste de Friedmann, seguido do pós-teste de Dunn. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFRGS nº 22635. A imunorreação ao iAR foi observada nas células de Leydig e células peritubulares em todas as idades. Não foi observada marcação referente a iAR em células de Sertoli de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn. T e EpiT estimularam a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. A aplicação tópica de T promoveu a despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 4º dpn. A aplicação de FSH seguida da aplicação de T e EpiT promoveu uma redução da resposta dos dois hormônios. Já aplicação de EpiT 5 minutos após a aplicação do FSH resultou em um retardo da despolarização promovida pela EpiT. A resistência da célula também foi reduzida, em comparação com a resistência da aplicação isolada da EpiT. Concluímos que: as células de Sertoli de ratos *Wistar* não expressam iAR no 4º e 5º dpn; T e EpiT atuam através do mecanismo de ação não clássico estimulado a captação de cálcio em testículos inteiros de ratos no 4º dpn; e a T produz um efeito despolarizante sobre a membrana de células de Sertoli de ratos no 5º dpn similar ao já observado aos 15 dias. Este efeito não-clássico produzido pelos andrógenos é mediado por um receptor, ainda não identificado, localizado na membrana celular ou próximo a ela, estruturalmente diferente do iAR. A interação entre os efeitos do FSH e andrógenos sobre o potencial de membrana de células de Sertoli resulta na redução da resposta despolarizante desencadeada pelos hormônios.

## ABSTRAT

The intratesticular testosterone concentration is high in the early postnatal period, but the intracellular androgen receptor expression is still absent in Sertoli cells. Thus, these cells do not respond to androgens, through classical mechanisms. The physiological importance of the high concentration of androgens in the testes is not fully understood, it is believed to be due to its action through non-classical mechanisms. Both FSH and T (testosterone) increase the spermatogenic efficiency, however studies show that FSH blocks testosterone-mediated activation of ERK mediated by non-classic action. This study aimed to evaluate iAR expression in Sertoli cells from Wistar rats on post-natal day (pnd) 4 and 5; the non-classical effects of testosterone and epitestosterone on calcium uptake and the electrophysiological effects of testosterone (1  $\mu$ M) on Sertoli cells from rats on pdn 4 and 5 with lack of expression of intracellular androgen receptor (iAR), and evaluate the crosstalk on electrophysiological effects of testosterone and epitestosterone with FSH in Sertoli cells from rats on pnd 14. Immunohistochemistry was used to evaluate iAR immunoreactivity in Sertoli cells from Wistar rats (n = 5 each group). Calcium uptake was investigated using whole testes from rats on pdn 4. The testicular tissue was pre-incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS) with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  for 60 min (n=5 in each group). Then, testes were incubated in HBSS with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , with or without T (1  $\mu$ M) or EpiT (1  $\mu$ M) for five minutes. The membrane potential of Sertoli cells was recorded using a standard single microelectrode technique. The intracellular recording of Sertoli cells was performed using microcapillaries filled with 3 M KCl coupled to an electrometer. T (1  $\mu$ M) it was apply in testis of rats on pnd 5 (n=5). In animals on pnd 14 FSH (4 mU) injection was followed by the application of T (1  $\mu$ M) or EpiT (1  $\mu$ M) after 30 seconds (n = 7 and 6, respectively) and EpiT (1 $\mu$ M), after 5 minutes (n = 6). The results are given as mean  $\pm$  SEM. For statistical analyses it was used Student T-test, ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni post-test and Friedman test followed by Dunn's post-test. This study was approved by the Ethics Committee for animal research of UFRGS (process number CEUA/UFRGS n° 22635). The iAR immunoreactivity was observed in Leydig and peritubular cells at all ages. No immunoreaction concerning of iAR was observed in Sertoli cells on pnd 4 and 5. At this age both, testosterone and epitestosterone increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, within 5 minutes of incubation. Testosterone promoted membrane potential depolarization of Sertoli cells on pnd 5. FSH application followed by testosterone and epitestosterone reduced the depolarization of the two hormones. Application of epitestosterone five minutes after FSH resulted in a delay of epitestosterone-promoted depolarization. The cell resistance was also reduced in comparison with the resistance of the isolated application EpiT. Sertoli cells from rats on pnd 4 and 5 do not express iAR. Both T and EpiT act through non-classical mechanism stimulating calcium uptake in whole rat testes on dpn 4. T produces a depolarizing effect on the Sertoli cell membrane of rats on pnd 5 similar to observed at 15-day-old rats. This non classical action of androgens is mediated by a receptor, not yet identified, situated in the membrane cell or close to it, different from iAR. FSH, and testosterone/epitestosterone affect each other electrophysiological responses suggesting a cross talking in the intracellular signaling pathways.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenvolvimento dos testículos.....	16
Figura 2 - (A) Conversão de DHEA a epi5 $\alpha$ -diol e a epitestosterona. (B) Conversão de DHEA a 4-dione e epitestosterona. ....	18
Figura 3 - Conversão de testosterona a epitestosterona.....	18
Figura 4 - 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. ....	22
Figura 5 – Sinalização não-clássica da testosterona e epitestosterona.....	24
Figura 6 - Efeito do FSH (4 mU/mL) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade.....	26
Figura 7 - Desenho Experimental da técnica de imunistoquímica.....	33
Figura 8 - Desenho experimental da técnica de captação de cálcio.....	36
Figura 9 - Experimento de captação de cálcio.....	36
Figura 10 - Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.....	38
Figura 11 - A. Representação esquemática da técnica eletrofisiológica B. Representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47 mV.....	39
Figura 12 - Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular em células de Sertoli de ratos neonatos. ....	40
Figura 13 - Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular em células de Sertoli de ratos no 14 <sup>o</sup> dpn.....	40
Figura 14 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos de ratos adultos mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B).....	46
Figura 15 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos adultos mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B)..	47

Figura 16 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 4º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B). .....	48
Figura 17 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 4º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B). .....	49
Figura 18 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 5º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B). .....	50
Figura 19 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 5º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B). .....	51
Figura 20 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos mostrando a ausência de imunorreatividade ao iAR nos cortes do controle-negativo .....	52
Figura 21- Efeito da testosterona (1µM) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. ....	53
Figura 22 - Efeito da epitestosterona (1µM) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. ....	53
Figura 23 – Comparação entre o efeito da testosterona (1µM) e da epitestosterona (1µM) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. ....	54
Figura 24 - Representação do potencial de repouso de uma célula de Sertoli típica de testículo de rato neonato. ....	54
Figura 25 - Representação do potencial de membrana de uma célula de Sertoli típica após aplicação de testosterona (1µM). ....	55
Figura 26 - Efeito da aplicação de testosterona (1µM) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 5º dpn .....	55
Figura 27 – Interação entre as respostas da testosterona (1µM) e do FSH (4 mU) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 14º dpn. ....	56



Figura 28 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da testosterona (1 $\mu$ M) .....	56
Figura 29– Comparação do efeito do FSH (4 mU) e FSH (4 mU) + testosterona (1 $\mu$ M) sobre a resistência membrana das células de Sertoli .....	57
Figura 30 Interação entre as respostas da epitestosterona (1 $\mu$ M) e do FSH (4 mU) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 14º dpn.....	57
Figura 31 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da epitestosterona (1 $\mu$ M).....	58
Figura 32 – Comparação do efeito do FSH (4 mU) e FSH (4 mU) + epitestosterona (1 $\mu$ M) sobre a resistência membrana das células de Sertoli .....	58
Figura 33 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da epitestosterona (1 $\mu$ M).....	59
Figura 34– Comparação do efeito da epitestosterona (1 $\mu$ M) e FSH (4 mU) + epitestosterona (1 $\mu$ M) aplicada 5 min após o FSH, sobre a resistência membrana das células de Sertoli .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e concentrações dos reagentes presentes nas soluções estoque e final para tampão HBSS .....	30
Tabela 2 - Composição e concentração dos reagentes presentes na solução de lantânio.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$ : microlitro

$\mu\text{M}$ : micromolar

17 $\alpha$ -HSD: enzima 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase

3 $\beta$ -HSD: enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ : isótopo radioativo de cálcio

4-dione: androstenediona

5 $\alpha$ -dione: androstenediona

AMH: hormônio Anti-Mülleriano

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

Anti-iAR: anticorpo anti-receptor intracelular de andrógenos

ARKO: camundongo *Knockout* para iAR

ATP: adenosina trifosfato

BHT: barreira hemato-testicular

$\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio

Cpm: contas por minuto

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

CREB: proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc

DAB: cromógeno diaminobenzidina

DAG: 1,2-diacilglicerol

DHEA: desidroepiandrosterona

DHT: di-hidrotestosterona

Dpn: dia pós-natal

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal

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

EpiT: epitestosterona

FSH: hormônio folículo estimulante

FSHR: receptor de FSH

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

GPCR: receptor acoplado à proteína G

$\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solucion*

Hz: hertz

I: corrente

iAR: receptor intracelular de androgênios

IgG: imunoglobulina G

$\text{IP}_3$ : inositol-3,4,5-trifosfato

K<sup>+</sup>: íon potássio

K<sub>ATP</sub><sup>+</sup>: canais de potássio sensíveis a ATP

KCl: cloreto de potássio

LH: hormônio luteinizante

M: molar

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

mAR: receptor de andrógenos de membrana

mCi: microCurri

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitros

mM: milimolar

ms: milissegundos

mV: miliVolts

MΩ: megaohms

nA: nanoampére

PAP: complexo peroxidase antiperoxidase

PBS: tampão fosfato salino

PBS-T: tampão fosfato salino acrescido de Triton

pH: potencial Hidrogeniônico

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA : proteína cinase A

PLC: fosfolipase C

PTX: toxina pertussis

R: resistência (Ω- ohms)

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

V = voltagem (V- volts)

VDCC-L: Canais de Ca<sup>+2</sup> dependentes de voltagem do tipo L

α: Alfa

β: Beta

Ω: Ohm

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Gônada Masculina .....	13
1.2 Andrógenos.....	16
1.3 Ação Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor Intracelular .....	19
1.4 Ação Não-Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor de Membrana.....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Animais .....	29
3.2 Soluções Utilizadas .....	29
3.3 Substâncias Utilizadas .....	31
3.4 Imunoistoquímica .....	33
3.5 Captação de Cálcio .....	35
3.6 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular .....	37
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>42</b>
<b>5 BIOSSEGURANÇA .....</b>	<b>43</b>
<b>6 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>44</b>
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
7.1 Imunoistoquímica .....	45
7.2 Captação de Cálcio .....	53
7.2.1 Efeito da Testosterona sobre a Captação de Cálcio .....	53
7.2.2 Efeito da Epitestosterona sobre a Captação de Cálcio.....	53
7.2.3 Comparação entre o Efeito da Testosterona e da Epitestosterona Sobre a Captação de Cálcio .....	54
7.3 Técnica de Registro Intracelular em Células de Sertoli de Ratos Neonatos.....	54
7.3.1 Potencial de Membrana Basal.....	54
7.3.2 Efeito da Testosterona Sobre o Potencial de Membrana .....	55
7.4 Técnica de Registro Intracelular em Células de Sertoli de Ratos no 14º dpn .....	56
7.4.1 Interação entre os Efeitos Eletrofisiológicos da Testosterona e do FSH.....	56
7.4.2 Interação Entre os Efeitos Eletrofisiológicos da Epitestosterona e do FSH .....	57
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>9 CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>10 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gônada Masculina

Os testículos são órgãos bilaterais, ovoides e encapsulados pela túnica albugínea (Santen 1995). A função básica dos testículos é promover a produção dos espermatozoides (espermatogênese) e de hormônios, esteroides e proteicos, essenciais à função reprodutiva masculina (Fawcett 1993). A espermatogênese é um processo complexo através do qual as células germinativas indiferenciadas dão origem a espermatozoides (REY, 1999).

Os testículos são constituídos de dois compartimentos funcional e morfológicamente distintos: uma rede de túbulos seminíferos e um tecido intersticial. Os túbulos seminíferos, responsáveis pela produção e transporte de espermatozoides são formados pelas células de Sertoli, células germinativas e células miodes peritubulares. A célula de Sertoli tem papel fundamental no desenvolvimento do testículo funcional e na expressão do fenótipo masculino. O tecido intersticial é composto pelas células de Leydig, que tem a função de produzir hormônios androgênicos, além de vasos sanguíneos e linfáticos que são responsáveis pelo movimento de hormônios e nutrientes para dentro e para fora dos testículos (O'DONNELL et al., 2006; REY, 1999). Os túbulos seminíferos são revestidos externamente pelas células miodes peritubulares que junto com as células de Sertoli formam a membrana basal dos túbulos seminíferos (SMITH; WALKER, 2014).

O desenvolvimento dos testículos inicia-se na diferenciação sexual do feto e estende-se até a maturidade sexual no animal adulto. Ao longo do desenvolvimento, os testículos sofrem importantes mudanças morfológicas e funcionais, de forma que a gônada do adulto será significativamente diferente da gônada do recém-nascido. Desta forma, o desenvolvimento das gônadas divide-se em duas fases: fase imatura, proliferativa, que compreende o período do desenvolvimento sexual e uma fase madura, não proliferativa, relativa à gônada adulta. A transição entre as duas fases, denominada maturação sexual, ocorre durante a puberdade. A principal mudança ocorre nos túbulos seminíferos, onde as células de Sertoli apresentam estrutura morfológica, funções e regulação características de cada fase (REY, 1999; SHARPE et al., 2003).

O rato é um animal conveniente para o estudo do desenvolvimento sexual, pois cresce rapidamente, se reproduz frequentemente, sua criação e manutenção são relativamente fáceis e de baixo custo, seus sinais externos de maturação sexual, embora escassos, são facilmente detectáveis. Além disso, muitos dos resultados obtidos em ratos podem ser extrapolados para outras espécies, incluindo a humana (OJEDA; SKINNER, 2006).

A fase imatura compreende os períodos fetal, neonatal, pré-pubere e púbere (OJEDA; SKINNER, 2006). No feto masculino, a diferenciação sexual inicia-se, a partir da expressão do gene SRY (Região Y Determinante do Sexo), com a diferenciação das células de Sertoli (REY, 1999). Uma vez diferenciadas, as células de Sertoli iniciam e regulam a diferenciação testicular; expressam sua primeira proteína, o hormônio Anti-Mülleriano (AMH) (ALLARD et al., 2000; NEF, 2000); e impedem que as células germinativas entrem em meiose (SHARPE et al., 2003). Formam-se então finos cordões seminíferos sem lúmen e as células de Sertoli e as células germinativas iniciam a fase proliferativa (CUPP; SKINNER, 2005).

Durante o período neonatal, que inicia-se com o nascimento e estende-se até o 7º dia pós-natal (dpn), em ratos, os finos cordões seminíferos consistem predominantemente em células de Sertoli e células germinativas primordiais.

Presentes em maior número, as células de Sertoli apresentam formato colunar ou cuboidal e repousam sobre a membrana basal dos cordões seminíferos. Seu citoplasma apresenta projeções apicais que preenchem o centro dos cordões (NOVI; SABA, 1968). A proliferação das células de Sertoli iniciada no período fetal continua até, aproximadamente, o 15º dpn (SHARPE et al., 2003).

As células germinativas primordiais apresentam formato quase redondo, são maiores do que as células de Sertoli e localizam-se no centro dos cordões seminíferos, ao nascimento (RAMOS; DYM, 1979; SHARPE et al., 2003). A partir do 4º dpn, as células germinativas migram em direção à membrana basal realocando-se periféricamente entre as células de Sertoli (DONOVAN; DEMIGUEL, 2005; MCGUINNESS; ORTH, 1992). O formato das células germinativas é alterado tornando-se alongadas (NOVI; SABA, 1968). Uma vez em contato com a membrana basal essas células reiniciam o processo de proliferação (GRISWOLD; MCLEAN, 2006).

A maturação sexual é um processo de múltiplas etapas que ocorre durante a puberdade, envolvendo mudanças radicais na morfologia e função das células de Sertoli. O resultado final da maturação é a perda da capacidade de proliferação das células de Sertoli (caracterizando a transição da fase imatura/ proliferativa para uma fase madura/não-proliferativa); o início das divisões meióticas das células germinativas (iniciando o processo de diferenciação que dará origem aos espermatozoides); e a formação da barreira hemato-testicular (BHT). A formação da BHT se dá através da formação de complexos juncionais entre células de Sertoli adjacentes criando um compartimento adluminal exclusivo onde as células germinativas meióticas e pós-meióticas ficam isoladas em um ambiente especializado.

Ao final da 3ª semana, como resultado da proliferação das células germinativas e maturação das células de Sertoli, os cordões seminíferos adquirem lúmen e aumentam significativamente seu diâmetro convertendo-se em túbulos seminíferos (RAMOS; DYM, 1979; REY, 1999).

A gônada madura tem intensa capacidade secretória produzindo grandes quantidade de androgênios, inibina, ativina e proteína de ligação aos androgênios (REY, 1999). A célula de Sertoli fornece suporte físico e estrutural à espermatogênese. Essa função é de extrema importância uma vez que a BHT origina dois compartimentos: compartimento basal e compartimento adluminal. No compartimento basal, localizado junto à membrana basal dos túbulos, as células de Sertoli e as células germinativas primordiais mantêm contato com o tecido intersticial. No compartimento adluminal, as células da linhagem espermatogênica (células em diferentes estágios de diferenciação) são isoladas pela BHT, o que impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial. Assim, essas células tornam-se totalmente dependentes das células de Sertoli (GRISWOLD, 1998; SHARPE et al., 2003). Uma vez que cada célula de Sertoli possui a capacidade de fornecer suporte a um número limitado de células germinativas, a capacidade de produção de espermatozoides na vida adulta depende do número de células de Sertoli.

A fase imatura afeta diretamente a função reprodutiva do animal adulto (SHARPE et al., 2003). É de fundamental importância que o animal mantenha-se imaturo pelo tempo necessário para que as células de Sertoli proliferem-se adequadamente e amadureçam sendo capazes de, então, fornecer o suporte adequado à espermatogênese. Os mecanismos



envolvidos na manutenção da imaturidade sexual são bastante complexos. A produção de androgênios, a expressão do receptor intracelular de androgênios, o AMH e o FSH estão intimamente relacionados e possivelmente estejam envolvidos neste processo.

Na figura 1 podemos observar as alterações que ocorrem nos testículos ao longo do desenvolvimento.

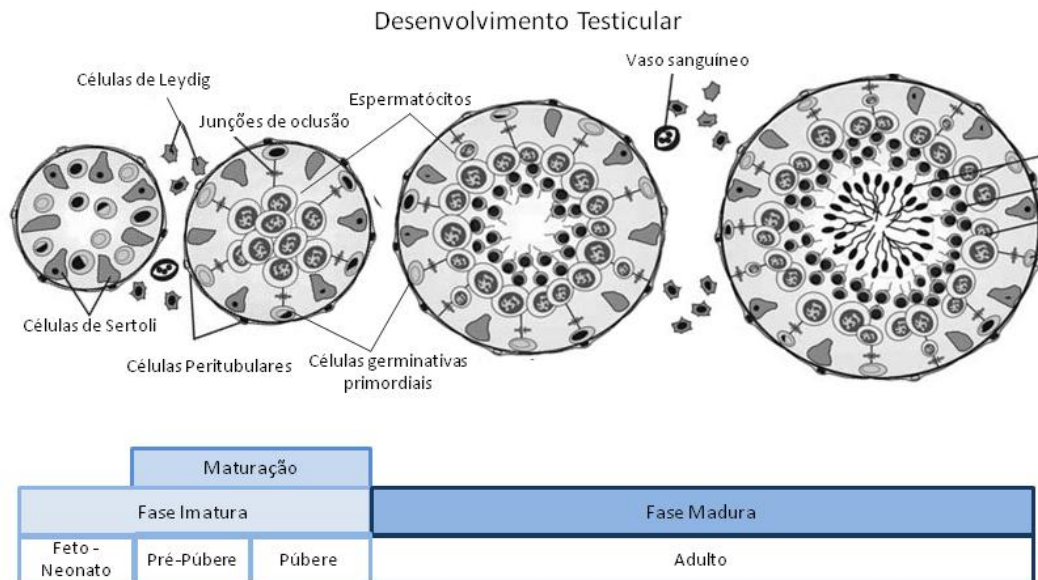


Figura 1 - Desenvolvimento dos testículos. Modificado de Rolland, A., Jégou, B., & Pineau, C. (2009).

## 1.2 Andrógenos

Andrógenos são hormônios esteroides envolvidos primariamente no desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogênese, no desenvolvimento da maturação sexual na puberdade, na manutenção da função reprodutora, da espermatogênese e do comportamento sexual (PATRÃO; SILVA; AVELLAR, 2009). As células de Leydig são as principais responsáveis pela secreção dos andrógenos testosterona (T) e epitestosterona (EpiT).

A T é o principal andrógeno produzido pelas células de Leydig em resposta ao hormônio luteinizante (LH), secretado pela hipófise, o qual é estimulado pela liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) pelo hipotálamo (COUNIS et al., 2005). Após ser secretada, a T difunde-se para dentro dos túbulos onde se ligará a receptores presentes

nas células de Sertoli (WALKER, 2010). Em nível celular, a T pode ser convertida, pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, em DHT (dihidrotestosterona), seu metabólito mais potente.

No feto, as células de Leydig iniciam a síntese de T logo após se diferenciarem. A T será essencial para o desenvolvimento da genitália externa, maturação dos cordões seminíferos e desenvolvimento dos ductos de Wolff que se diferenciam formando os epidídimos, os canais deferentes e as vesículas seminais, no feto (BAARENDS et al., 1995; REY, 1999; WILSON; GEORGE; GRIFFIN, 1981).

A concentração intratesticular de T atinge seu pico no final do período fetal declinando rapidamente após o nascimento, talvez refletindo a ausência das gonadotrofinas provenientes da placenta (LEE et al., 1975; TAPANAINEN et al., 1984). Na puberdade a concentração intratesticular de T eleva-se novamente permanecendo estável durante toda a vida adulta. A elevação da concentração intratesticular de T na puberdade promove a maturação da célula de Sertoli, a inibição da produção de AMH e o início da espermatogênese completa (CHEMES et al., 2008; REY et al., 2009). Já a concentração plasmática de T apresenta algumas particularidades em relação a sua concentração intratesticular. Durante toda a fase imatura os níveis plasmáticos de T são inferiores aos níveis intratesticulares. Observa-se um declínio nos níveis plasmáticos de T após o nascimento, entretanto, a elevação dos níveis plasmáticos na puberdade ocorrerá somente após o aumento dos níveis intratesticulares de T.

A epitestosterona (17-hidroxi-4-androsten-3-ona) (EpiT) é um epímero da T, de ocorrência natural, presente nos fluidos biológicos de muitos mamíferos (STÁRKA, 2003). Por muito tempo, a EpiT foi tratada como um hormônio inativo (SANDERS, 2007). Sua biossíntese ocorre por diversas rotas, principalmente, a partir da 4-dione (androstenediona). Acreditava-se não haver síntese de EpiT a partir da desidroepiandrosterona (DHEA) (BLAQUIER; DORFMAN; FORCHIELLI, 1967), porém estudos recentes comprovam a existência desta via. Segundo Bellemare et al (2005), a EpiT pode ser produzida a partir da DHEA através de 2 vias diferentes (Figura 2). Em decorrência da eficiência catalítica de 3 $\beta$ -hidróxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) e da 17 $\alpha$ -hidróxiesteroide desidrogenase (17 $\alpha$ -HSD) acredita-se que a principal via de produção de EpiT é através da conversão de DHEA em 4-dione e esta em EpiT (BELLEMARE et al., 2005).

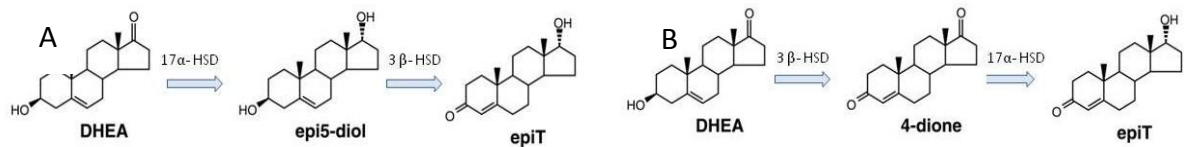


Figura 2 - (A) Conversão de DHEA a epi5 $\alpha$ -diol e a epitestosterona. (B) Conversão de DHEA a 4-dione e epitestosterona. Fonte: Adaptado de (Bellemare *et al.*, 2005)

Segundo Starka *et al.* (1993), em algumas espécies animais (coelho, porco-da-india e camundongos) quantidades significativas de EpiT originam-se da conversão de T em androstenediona (5 $\alpha$ -dione) e depois em EpiT (Figura 3). Nenhuma conversão de T em EpiT foi observada em testículos de ratos ou touros, assim como em humanos, apesar da principal fonte de EpiT ser testicular nestas espécies. A formação de EpiT é espécie-específico, provavelmente, dependendo da atividade da enzima 17 $\alpha$ -HSD.



Figura 3 - Conversão de testosterona a epitestosterona Fonte: Adaptado de (Bellemare *et al.*, 2005)

As células de Leydig são a principal fonte de EpiT. Uma quantidade modesta deste hormônio circulante também é produzida pelas glândulas adrenais (Dehennin, 1993; Kicman *et al.*, 1999; Havlikova *et al.*, 2002). Este hormônio está presente no sangue e no tecido prostático em concentrações suficientes para produzir um efeito androgênico geral nos tecidos periféricos (Hill *et al.*, 2000).

Em crianças, a relação T:EpiT no sangue é 1:1. A concentração de EpiT aumenta da infância à puberdade, sendo maior que a concentração da T no período pré-púbere. Na puberdade ocorre um drástico aumento na concentração de T, de forma que a relação T:EpiT passa para 5-10:1. Durante a vida adulta a concentração de EpiT mantém-se relativamente estável, atingindo seu pico em torno dos 35 anos de idade e diminuindo progressivamente após os 50 anos. Como a concentração de T também é estável a relação

T:EpiT é constante durante a vida adulta (HAVLÍKOVÁ et al., 2002; LAPCIK et al., 1994; STÁRKA et al., 1996).

Quando a T, a di-hidrotestosterona (DHT) ou a androstenediona são administradas, a taxa de excreção urinária de EpiT aumenta, assim como a relação T:EpiT, uma vez que a T não é convertida em EpiT e é constante, em humanos. Desta forma, a relação T:EpiT é utilizada pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) como controle anti-doping. Valores até 6:1 são considerados normais pelo COI, e valores acima disso são considerados como suspeita de abuso de esteroides anabolizantes (BELLEMARE et al., 2005; HAVLÍKOVÁ et al., 2002; STÁRKA et al., 1997).

A ação da EpiT pode ocorrer através da inibição competitiva do receptor intracelular de andrógenos (iAR), da inibição da biossíntese de T e da redução da conversão de T em DHT, por meio do bloqueio da enzima 5 $\alpha$ -redutase (HILL et al., 2000; MONSALVE; BLAQUIER, 1977; NUCK; LUCKY, 1987). Além disso, a EpiT parece agir inibindo a P<sub>450</sub>C17 testicular em ratos e humanos (BICÍKOVÁ; HAMPL; STÁRKA, 1992). Sua ação antiandrogênica foi demonstrada em tecidos de ratos, de camundongos e de humanos (STÁRKA, 1993). A afinidade de ligação da EpiT ao receptor intracelular de andrógenos (iAR) é dez vezes menor que a da T (HAVLÍKOVÁ et al., 2002). Segundo Starka (2003) a EpiT poderia estar atuando como um hormônio que contribui para a regulação da ação androgênica. Ao menos no período pré-pubere, a EpiT parece contribuir para a manutenção da imaturidade sexual (HAVLÍKOVÁ et al., 2002).

### **1.3 Ação Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor Intracelular**

O receptor intracelular de andrógenos (iAR) é uma proteína nuclear com 110 kDa e aproximadamente 918 aminoácidos. Este receptor é um fator de transcrição, membro da superfamília de receptores dos hormônios esteroides (MATSUMOTO et al., 2008; REY et al., 2009; SMITH; WALKER, 2014).

Os principais ligantes do iAR são a T, a DHT, seu metabólito mais potente e a EpiT (HAVLÍKOVÁ et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2008). Está descrito que estes esteroides se difundem através da membrana plasmática indo ligar-se ao iAR localizado no citosol ou no núcleo da célula. Com essa ligação, o iAR sofre uma mudança conformacional sendo liberado

da proteína de choque térmico. O complexo hormônio-receptor é translocado até o núcleo onde se liga a uma sequência específica no DNA, resultando em recrutamento de coativadores e regulação da expressão gênica. São necessários, ao menos 30-45 minutos para ocorrer alteração da expressão gênica e horas ou até mesmo dias para a produção de novas proteínas. Este mecanismo de ação dos hormônios esteroides é descrito como ação clássica (LÖSEL; WEHLING, 2003; WALKER, 2010).

O iAR é expresso no núcleo de células peritubulares e de células de Leydig desde o início da vida fetal (REY et al., 2009). Em ratos da linhagem *Sprague Dawley*, foi observada intensa coloração referente ao iAR nas células peritubulares e nas células de Leydig no período pós-natal. Nas células de Sertoli, é observada discreta coloração somente a partir do 5º dpn (BREMNER et al., 1994; YOU; SAR, 1998). Apesar da elevada concentração intratesticular de T, as células de Sertoli não expressam iAR durante a vida fetal e início do período pós-natal. Assim caracterizando um período de insensibilidade da célula de Sertoli aos andrógenos (BREMNER et al., 1994; REY et al., 2009).

Alguns estudos mostram que a T, através da ligação ao iAR, reduz a proliferação das células de Sertoli, *in vitro*, levando ao término precoce da fase de maturação destas células (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003). Além disso, a T suprime a secreção de FSH (hormônio foliculo estimulante), principal estimulador da proliferação das células de Sertoli (SUMMERVILLE; SCHWARTZ, 1981). Acredita-se que o iAR atue modificando/controlando a sinalização da T (SMITH; WALKER, 2014). Assim, esse período de insensibilidade da célula de Sertoli aos andrógenos parece proteger as células da maturação precoce (REY et al., 2009).

No rato adulto, os níveis de T são mantidos relativamente constantes, assim como a expressão de iAR nas células mioides peritubulares, células de Leydig e pequenas arteríolas (REY et al., 2009). Os dados sobre a expressão de iAR nas células germinativas são controversos. No estudo realizado por Bremner (1994), com ratos em diversas idades, as células germinativas em nenhum momento expressaram iAR. Embora outros estudos identifiquem a expressão de iAR nas células germinativas, sua presença não parece ser essencial para a espermatogênese (SMITH; WALKER, 2014; TSAI et al., 2006). Em contraste, a expressão de iAR nas células de Sertoli apresenta variações significativas durante os estágios do ciclo dos túbulos seminíferos (SMITH; WALKER, 2014).

Muitos estudos vêm sendo realizados com modelos animais geneticamente modificados, que não expressam iAR em todos os tecidos (ARKO) ou somente na célula de Sertoli (SCARKO). Com base nesses trabalhos, observa-se que a ausência de iAR afeta a maturação da célula de Sertoli, resultando em atraso e alteração na formação da BHT, alteração na expressão de genes relacionados à adesão celular e no desenvolvimento do citoesqueleto da célula de Sertoli, além de falha na manutenção/progressão da espermatogênese (O'SHAUGHNESSY; MONTEIRO; ABEL, 2012; WILLEMS et al., 2010). É evidente que a ação da T sobre o iAR é fundamental para a função reprodutiva masculina. Entretanto, a concentração intratesticular de T é cerca de 10 vezes maior do que no sangue em ratos e 25-125 vezes em humanos. A importância fisiológica desta elevada concentração de T nos testículos ainda não é completamente compreendida. Acredita-se ser em virtude de sua ação através de mecanismos não clássicos, uma vez que os níveis de T necessários para seu efeito no iAR são muito inferiores (WALKER, 2009).

#### **1.4 Ação Não-Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor de Membrana**

Vários estudos têm demonstrado que os hormônios esteroides podem alterar processos celulares de uma forma rápida (DE CASTRO et al., 2013; GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; VON LEDEBUR et al., 2002). Inicialmente, chamou-se essa ação de não-genômica, porém este termo não é adequado visto que esta ação de início rápido pode culminar em uma alteração da transcrição gênica. Pesquisadores passaram então a chamá-la de ação não-clássica (Walker, 2010). Através da via não-clássica os andrógenos transformam sinais em alterações da função celular pela ativação de cascatas de sinalização intracelular, em segundos a minutos.

Nas células de Sertoli, duas vias de sinalização não-clássica são observadas (HEINLEIN; CHANG, 2002; SMITH; WALKER, 2014). Na primeira via, a T media a fosforilação das enzimas cinases Src, cascata MAPK e CREB. O estímulo da célula de Sertoli pela T faz com que uma população de iAR se aproxime da membrana plasmática. A ligação da T ao receptor ativa a proteína cinase Src, esta fosforila o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) que ativa a cascata MAPK (RAF, MEK e ERK), resultando na subsequente fosforilação do fator de transcrição CREB e ativação de fatores de transcrição mediados por CREB (SMITH; WALKER,

2014). A fosforilação de ERK e CREB ocorre dentro de 1 minuto e sinais celulares gerados por esta fosforilação podem ser mantidos por ao menos 12 horas (FIX et al., 2004). A fosforilação de Scr e ERK mediada pela via não-clássica altera processos críticos para a regulação da espermatogênese. Os estudos indicam que esta via está envolvida em processos como a formação e manutenção da BHT, adesão das células de Sertoli às células germinativas em processo de maturação e liberação dos espermatozoides (SHUPE et al., 2011; SMITH; WALKER, 2014).

Na outra via, os andrógenos promovem o influxo de cálcio para a célula, de forma independente do iAR, conforme será discutido a seguir (SMITH; WALKER, 2014). Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foi observado que a aplicação tópica de T e EpiT em concentrações fisiológicas desencadeia uma despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos, significativa já aos 120 segundos, conforme pode ser observado na figura 4 (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013).

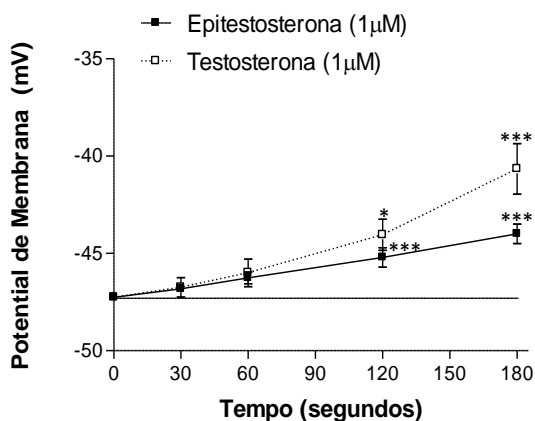


Figura 4 - Efeito da epitestosterona (1µM) e da testosterona (1µM) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas (\*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 em relação ao repouso, n=9 em cada grupo). Fonte: De Castro, et al. (2013).

Esta resposta de despolarização das células de Sertoli aos andrógenos, T e EpiT, é específica, uma vez que não é observada após administração de outros esteroides como o estradiol ou progesterona (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011). Entretanto, outras substâncias, como o esteroide sintético nandrolona (1 µM) e o flavonoide catequina (1 µM), também são capazes de promover uma despolarização do potencial de membrana em

células de Sertoli de ratos imaturos, semelhante à ocasionada pela T e EpiT (CAVALARI et al., 2012).

A aplicação de T (1  $\mu$ M) e EpiT (1  $\mu$ M) em células de Sertoli perfundidas com flutamida (1  $\mu$ M), fármaco capaz de bloquear a ligação dos andrógenos ao iAR, não interferiu na despolarização do potencial de membrana (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013) indicando que esta resposta ocorre de forma independente do iAR.

Além da semelhança no padrão da despolarização do potencial de membrana T, EpiT, nandrolona e catequina também promovem um aumento da resistência da membrana das células de Sertoli de ratos imaturos, significativo aos 180 segundos. Este aumento na resistência indica uma redução da corrente iônica ao longo da membrana celular que, por sua vez, pode estar ligada ao fechamento de canais iônicos (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013).

Através da utilização de bloqueadores foi possível mapear esta via identificando as moléculas e canais envolvidos, conforme pode ser visualizado na figura 5. Glibenclamida e tolbutamida são sulfonilureias que agem bloqueando os canais de potássio sensíveis a ATP ( $K^+_{ATP}$ ), produzem uma despolarização muito semelhante à produzida pela T, gerando também aumento da resistência da membrana (Von Ledebur, et al. 2002). A perfusão dos túbulos seminíferos com a toxina pertussis (PTX), inibidor da proteína Gq; U 73122, inibidor da fosfolipase C (PLC); e diaxozida, fármaco estimulador dos canais de  $K^+_{ATP}$ , resultou em bloqueio da despolarização desencadeada pela aplicação tópica da T, assim como da EpiT (DE CASTRO et al., 2013; LOSS et al., 2004).

A T e a EpiT são capazes de estimular a captação de cálcio em tecido testicular de ratos imaturos, após 5 minutos de incubação. Esta resposta rápida é independente do iAR, uma vez que não é alterada na presença de flutamida e, portanto, caracteriza uma ação não-clássica. Este influxo de cálcio ocorre, ao menos em parte, através de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (VDCC-L), pois a perfusão dos túbulos seminíferos com verapamil, um bloqueador do VDCC -L, ocasiona um bloqueio parcial da despolarização provocada por esses andrógenos (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013; VON LEDEBUR et al., 2002)



Esses achados indicam que essa resposta ocorre a partir da ligação dos andrógenos a um receptor acoplado a uma proteína G (GPCR) do tipo  $G_{\alpha q}$ , e na consequente ativação da PLC, que hidrolisa o fosfolípido de membrana PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) em IP3 (inositol-1,4,5-trifosfato) e DAG (1,2-diacilglicerol). A redução dos níveis de PIP2 na membrana promove o fechamento dos  $K^+_{ATP}$ , causando um aumento na resistência e despolarização do potencial de membrana, com a consequente abertura de VDCC -L e influxo de cálcio. Ao mesmo tempo, IP3 estimula a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (DE CASTRO et al., 2013; LOSS et al., 2004; VON LEDEBUR et al., 2002).

A ação não-clássica da T também promove rápido aumento na concentração intracelular de cálcio em células de Sertoli isoladas (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; LEITE et al., 1999) e muitos outros tipos celulares como cardiomiócitos (VICENCIO et al., 2006), células T (BENTEN et al., 1999), osteoblastos (LIEBERHERR; GROSSE, 1994) e células cancerígenas como as de câncer de próstata (LIAO et al., 2013). O cálcio é um importante segundo mensageiro que está envolvido na regulação de inúmeros processos celulares, como proliferação celular, plasticidade neural e apoptose (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998).

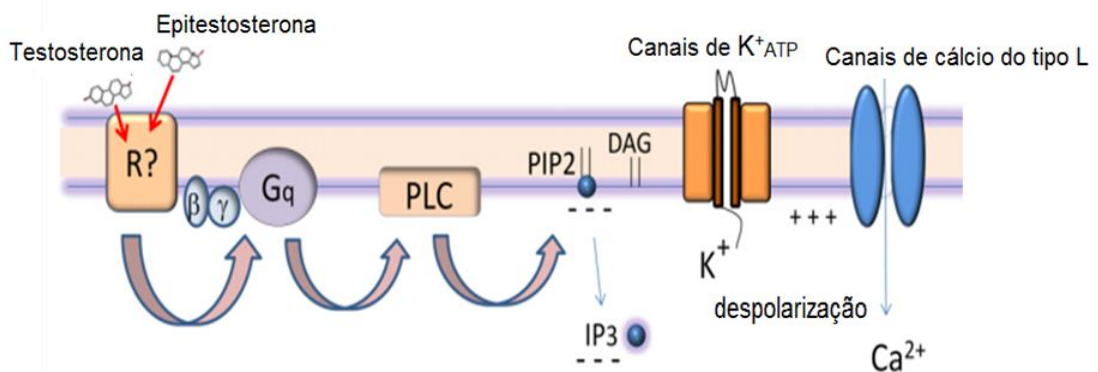


Figura 5 – Sinalização não clássica da testosterona e epitestosterona. Fonte: De Castro, et al. (2013)

O mecanismo de ação não-clássico que resulta na fosforilação da ERK é medido pela ligação da T ao iAR que é translocado para região próxima à membrana (SMITH; WALKER, 2014). Já o receptor envolvido na via de sinalização não-clássica que resulta no influxo de cálcio ainda não foi identificado. Contudo, a identificação de receptores de membrana distintos do receptor intracelular para outros esteroides (como o GPCR 30 e mPR envolvidos

nas ações de membrana do estrógeno e progesterona, respectivamente) e a inefetividade dos antagonistas de iAR em bloquearem a ação não-clássica dos Andrógenos reforçam a hipótese de que esta via seja mediada por um receptor de membrana distinto de iAR (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013; THOMAS et al., 2005).

Inicialmente acreditava-se que os hormônios esteroides atuavam do mecanismo de ação não clássico como uma via complementar aos mecanismos genômicos, aumentando a diversidade e aprimorando os efeitos destes hormônios na célula de Sertoli (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Entretanto, estudos recentes indicam que a sinalização da via não-clássica pode estar envolvida na regulação da via clássica, uma vez que a ativação de enzimas cinases pode resultar na regulação da transcrição gênica. Assim, via clássica e via não-clássica atuam em conjunto para coordenar a regulação gênica, contribuindo para a manutenção da espermatogênese e da fertilidade (LIAO et al., 2013; SMITH; WALKER, 2014; WALKER, 2010).

Além dos andrógenos o FSH também desempenha papel fundamental no desenvolvimento e na função da célula de Sertoli. Durante o período neonatal e pré-pubere, estimula a proliferação das células de Sertoli tendo um papel crítico no número de célula de Sertoli (SHARPE, 2005)

Nos testículos, o receptor para FSH (FSHR) é um GPCR expresso exclusivamente nas células de Sertoli (SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997). A ligação do FSH ao FSHR resulta na ativação de diferentes cascatas de sinalização intracelular. Em uma destas vias, ocorre a ativação da enzima adenilato ciclase, seguida de aumento dos níveis intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato ciclico) e ativação de proteínas cinases, como a proteína cinase A (PKA). A PKA fosforila proteínas estruturais, enzimas e fatores de transcrição (MEANS et al., 1980; SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997). Além deste efeito, o FSH é capaz de rapidamente aumentar a concentração intracelular de cálcio (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995). A aplicação tópica de FSH em células de Sertoli de ratos imaturos promove uma rápida hiperpolarização, em torno de 30 segundos, seguida de uma prolongada despolarização do potencial de membrana, conforme pode ser visualizado na figura 6 (WASSERMANN et al., 1990).

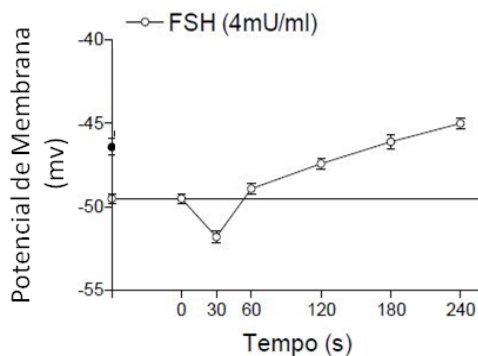


Figura 6 - Efeito do FSH (4 mU/ml) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli de ratos de 15 dias de idade. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. Adaptado de: Jacobus et al (2010).

A hiperpolarização é bloqueada pelos fármacos tolbutamida e glibenclamida, inibidores do canal de  $K^+_{ATP}$ , indicando que este canal é o responsável pela fase de hiperpolarização (JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010). A fase de despolarização ocorre em virtude do influxo de cálcio por CCVD-L e da liberação de cálcio intracelular associada à produção de AMPc (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; WASSERMANN et al., 1992).

FSH e T agem sinergicamente para aumentar a eficiência da espermatogênese e da fertilidade (MCLACHLAN et al., 1996). Entretanto, vários estudos mostram que o FSH bloqueia a fosforilação da ERK mediada pela ação não-clássica da T, em cultura de célula de Sertoli de ratos imaturos. Este bloqueio ocorreu dentro de 5 minutos e permaneceu reduzida por ao menos 60 minutos (CRÉPIEUX et al., 2001; SHUPE et al., 2011).

Considerando os altos níveis de andrógenos presentes nos testículos no período fetal e neonatal, quando as células de Sertoli ainda não expressam iAR, é provável que os andrógenos estejam agindo através da via de ação não-clássica. Em nossos estudos anteriores (DE CASTRO et al., 2013; VON LEDEBUR et al., 2002) foi mostrado que tanto a T quanto a EpiT atuam através da via de ação não-clássica, promovendo respostas rápidas como a despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli e o influxo de cálcio no tecido testicular de ratos imaturos (15 dias). Tais respostas ocorrem mesmo na presença de flutamida, fármaco que bloqueia a ligação dos andrógenos ao iAR. Assim, sugerindo que

esta via de ação não-clássica ocorre por intermédio de um receptor de andrógenos localizado na membrana da célula de Sertoli, distinto do iAR.

Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos rápidos dos andrógenos em células de Sertoli de ratos no 4º dpn, as quais não expressam iAR. Entretanto, os estudos que mostram que a imunorreatividade ao iAR em células de Sertoli inicia-se no 5º dpn foram realizados com camundongos e animais da linhagem *Sprague Dawley* (AL-ATTAR et al., 1997; BREMNER et al., 1994; YOU; SAR, 1998). Então, considerando a importância da ontogenia da expressão do iAR e considerando que animais da linhagem *Wistar* são amplamente utilizados para o estudo de aspectos reprodutivos a avaliação da imunorreatividade ao iAR em ratos *Wistar* neonatos se fez necessária.

A interação entre as ações dos andrógenos e do FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli comprovará que a resposta não-clássica gerada pelos andrógenos é o resultado do empalamento de uma célula de Sertoli, visto que, são as únicas células testiculares que expressam o FSHR.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

\* Avaliar a imunorreatividade do iAR em células de Sertoli de ratos *Wistar* neonatos e o seu envolvimento com as ações não-clássicas dos andrógenos.

### 2.2 Objetivos Específicos

\* Avaliar a imunorreatividade do iAR em células de Sertoli de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn;

\* Avaliar o efeito da T e EpiT sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn;

\* Avaliar o efeito eletrofisiológico da T (1  $\mu$ M) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 4º e 5º dpn;

\* Avaliar a interação (*crosstalk*) entre os efeitos eletrofisiológicos dos andrógenos (T e EpiT) e FSH em células de Sertoli de ratos no 14º dpn.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados animais machos, da espécie *Rattus norvegicus* - linhagem *Wistar*, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do ICBS/UFRGS. Até o momento do experimento os animais foram mantidos com a mãe em gaiolas com ventilação individual contendo até 8 filhotes. As mães receberam ração (Nuvilab, Nuvital CR1, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os animais permaneceram em uma sala com temperatura de aproximadamente 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. No dia do experimento os ratos foram retirados da mãe, que permaneceu no CREAL, acondicionados em caixa com maravalha, e imediatamente transportados para o laboratório em veículo com temperatura em torno de 22°C. O ambiente do laboratório também é mantido com temperatura em torno de 22°C. Foram utilizados animais no 4º, 5º e 14º dpn além de animais adultos (60 dias). O dia do nascimento foi considerado como 1º dpn. A idade dos animais será detalhada em cada experimento.

#### 3.2 Soluções Utilizadas

O tampão fosfato salino (PBS), utilizado nos experimentos de imunoistoquímica, é composto por tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, acrescido de NaCl (100 mM) e KCl (2 mM). O tampão fosfato 0,2 M era preparado a partir de uma solução de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M e uma solução de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M. As duas soluções eram tituladas uma na outra de forma a atingir o pH 7,4. Os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da Synth (Diadema, SP, Brasil). Em algumas etapas do experimento de imunoistoquímica o PBS era acrescido de Triton X-100 0,2% (PBS-T). O Triton é um detergente que favorece a penetração dos anticorpos no tecido.

O tampão citrato era preparado a partir de soluções 0,1 M de citrato de  $\text{Na}^+$  e ácido cítrico. As duas soluções eram tituladas uma na outra de forma a atingir pH 5,5. Essa solução era diluída 10x em água destilada obtendo-se então tampão citrato, 0,01 M, pH 5,5.

Nos experimentos de eletrofisiologia e captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foi utilizada a solução tampão HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), como meio de incubação. A solução era preparada imediatamente antes da realização dos experimentos a partir de soluções-estoque, conforme tabela 1, e HEPES, que era pesado e diluído em água destilada no momento do experimento. Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), exceto o HEPES proveniente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Para o preparo do tampão foram misturados volumes iguais de cada solução estoque, o HEPES e água destilada (até completar o volume desejado). O pH da solução era verificado através de pHmetro e ajustado em 7,4 acrescentando-se NaOH (0,1 N). A solução era filtrada em papel filtro e mantida em gelo durante a preparação do experimento.

Tabela 1 - Composição e concentração dos reagentes presentes nas soluções estoque e final para tampão HBSS

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

A solução de lantânio foi utilizada para interromper o fluxo de cálcio nos experimentos de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . A solução era preparada imediatamente antes da realização dos experimentos, conforme tabela 2, e mantida a 0°C até ser utilizada. Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), exceto o HEPES proveniente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Tabela 2 - Composição e concentração dos reagentes presentes na solução de lantânio

Reagentes	Solução Final
NaCl (Cloreto de Sódio)	127,5 mM
KCl (Cloreto de Potássio)	4,6 mM
MgCl <sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio)	1,2 mM
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	5 mM
LaCl <sub>3</sub> (Cloreto de Lantânio)	10 mM
HEPES	10 mM

### 3.3 Substâncias Utilizadas

Anti-AR: Santa Cruz Biotechnology, Inc. AR (Dallas, TX, USA), código sc-816. Anticorpo policlonal, desenvolvido em coelho, diluído em PBS na proporção 1:250.

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

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

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



Epitestosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 17 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3-one, 4-Androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one, cis-Testosterone, Isotestosterone, PM 288,42. Epímero da testosterona de ocorrência natural. Pesado em balança analítica, reconstituído em etanol e diluído em HBSS, produzindo soluções com 1 $\mu$ M de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.

FSH: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Hormônio de hipófise ovina, pesado em balança analítica, reconstituído em água destilada e diluído em HBSS, produzindo soluções com concentração final de 4 mU.

Isótopo radioativo de cálcio ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ): PerkinElmer NEN<sup>®</sup> (Waltham, MA, USA). A meia vida do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  é de 163 dias e o seu decaimento foi calculado a partir de tabela fornecida pelo fabricante, em função da data de fabricação. A atividade específica é de 1 mCi/mg em cada amostra foi adicionado 0,2  $\mu$ Ci/mL.

Líquido de cintilação: Optiphase Hisafe 3- PerkinElmer Inc., USA. Utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

Paraformaldeído 4%: solução de paraformaldeído 8% diluído em igual volume de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4

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

Testosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 17 $\beta$ -Hydroxy-3-oxo-4-androstene, 17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-one, 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-one, trans-Testosterone, PM 288,42. Hormônio esteroide com ação androgênica e anabólica, pesado em balança analítica, reconstituído em etanol e diluído em HBSS, produzindo soluções com 1  $\mu$ M de concentração final. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.

### 3.4 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada para a determinação da imunorreatividade do iAR nas células testiculares de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn. Testículos de animais adultos (60 dias) foram utilizados como controle positivo da técnica. O desenho experimental e o número de animais utilizado em cada grupo podem ser observados na figura 7.

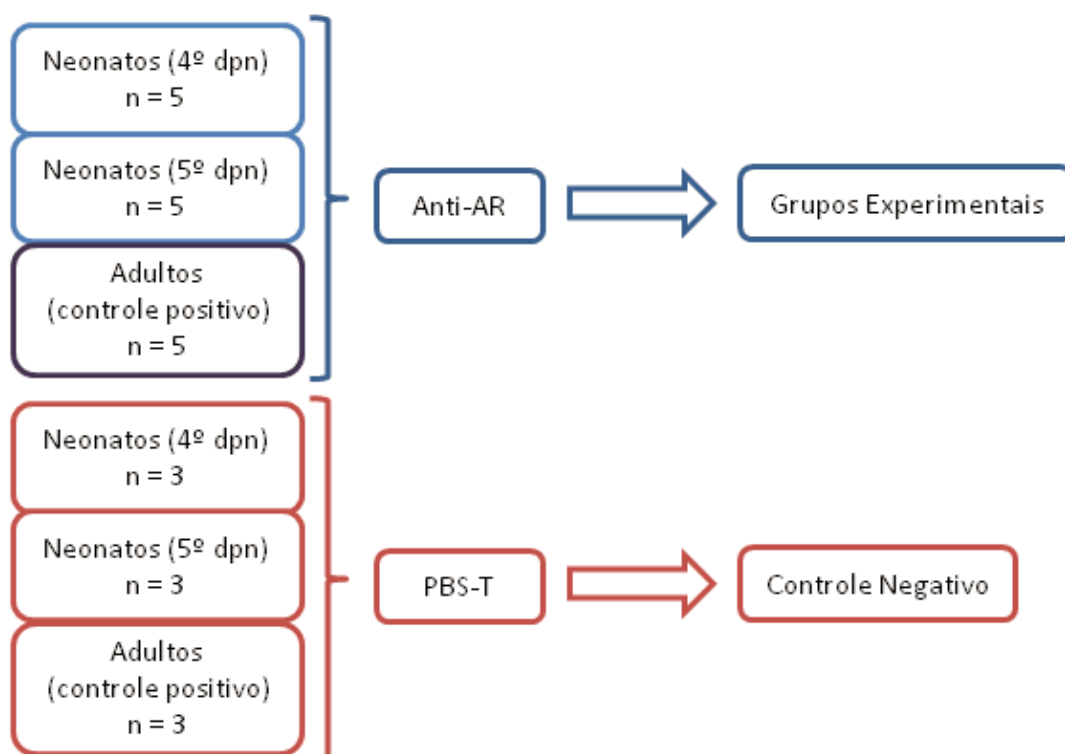


Figura 7 - Desenho experimental da técnica de imunoistoquímica

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (90 mg/kg de peso corporal) administrados por via intraperitoneal. Após a anestesia os animais foram submetidos à toracotomia para exposição do coração. A seguir um cateter intravenoso (Safelet NIPRO®) foi introduzido no ventrículo esquerdo atingindo a luz da aorta e um orifício foi aberto no átrio direito. Os animais foram perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%), para lavagem da árvore vascular, seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4%. Após a perfusão, os testículos foram dissecados e pós-fixados na mesma solução fixadora, durante 4h. A seguir, os tecidos foram desidratados em série

alcoólica crescente (etanol 50, 70, 80 e 96% e álcool isopropílico), durante 1h-1h30 cada, diafanizados em xilol (2 banhos de 1h30 cada), impregnados e incluídos em parafina para posterior secção em micrótomo (Micron<sup>®</sup>) com cortes de 5µm de espessura.

Os cortes foram distendidos sobre lâminas histológicas, desparafinizados em xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (etanol 100, 96 e 90%) durante 1 minuto, seguido de enxágue em água destilada e finalizando em PBS, pH 7,4. Em seguida, os cortes foram submetidos ao procedimento de imunistoquímica para a detecção do receptor iAR.

Para o procedimento de imunistoquímica as lâminas contendo os cortes foram incubadas por 30 minutos em uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% à temperatura ambiente para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena.

A seguir, os cortes foram lavados (2 x 15 min) com PBS acrescido de Triton X-100, 0,2% (PBS-T), transferidos para cubas contendo tampão citrato (0,01M, pH 5,5) e aquecidos em um forno de microondas (3 vezes de 3 min) para a reativação do antígeno. Os cortes foram mantidos à temperatura ambiente até resfriar e, após duas lavagens com PBS-T, foram pré-incubados por 30 minutos com soro normal de cabra 3%, para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo.

Após o bloqueio, iniciou-se a incubação com o anticorpo primário anti-iAR na concentração de 1:250, durante 24h a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos. Após as lavagens, os cortes foram incubados por 1h30 a temperatura ambiente com um anticorpo secundário IgG anti-coelho desenvolvido em cabra na concentração de 1:100. Os cortes foram lavados por mais duas vezes em PBS-T e então incubados com o complexo PAP 1:500 por 1h30. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, que por sua vez, reconhece o anticorpo primário. O PAP combina-se com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), resultando em um complexo HRP·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que pode oxidar diferentes cromógenos. A oxidação desses cromógenos resulta em um precipitado corado. Os cortes foram novamente lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos.

Após este período, foi realizada a revelação da reação imunistoquímica, incubando-se os cortes em uma solução contendo o cromógeno diaminobenzidina (DAB) 0,06% por 10

minutos, sob agitação constante. Em seguida, uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% diluída em água destilada, foi aplicada à solução de DAB na proporção de 1μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% para cada 1000 μL da solução de DAB. Os cortes foram incubados por mais 10 minutos até o aparecimento de um precipitado de cor parda. Após a revelação, os cortes foram lavados diversas vezes em PBS.

Os cortes foram contracorados com hematoxilina por 20 segundos e lavados em água corrente por 20 minutos para que os núcleos adquiriram coloração levemente roxa. Na sequência os cortes foram lavados em água corrente por 20 minutos. Para finalizar o processo as lâminas foram desidratadas em série alcoólica crescente (95 e 100%) duas vezes de 1 min e diafanizadas em xilol por 2 vezes de 2min. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas.

A fim de determinar a especificidade da reação imunoistoquímica observada, um grupo controle negativo foi utilizado para verificar a especificidade do anticorpo utilizado para reconhecer o antígeno em estudo. Assim, no grupo controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS-T.

A observação da reação imunoistoquímica foi realizada em microscópio óptico (NIKON Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital (SONY DSC-W30) acoplada ao microscópio.

### **3.5 Captação de Cálcio**

Foram utilizados ratos no 4º dpn. Os animais foram mortos através de deslocamento cervical. Após serem removidos, por incisão abdominal, os testículos foram limpos, pesados, decapsulados e colocados em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita.

As gônadas foram pré-incubadas por 60 minutos em tubos contendo 500 μL de HBSS e <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (4,44 KBq/20ng), em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C. Com a pré-incubação, o tecido alcança o equilíbrio intra e extracelular de cálcio (Figura 8).

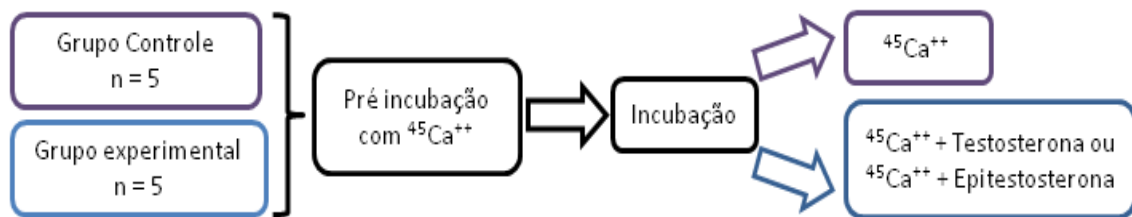


Figura 8 - Desenho experimental da técnica de captação de cálcio

Os testículos foram incubados por 5 minutos na presença de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com ou sem EpiT (1 $\mu\text{M}$ ) ou T (1 $\mu\text{M}$ ). Para finalizar a incubação foram adicionados a cada frasco, 500  $\mu\text{L}$  de cloreto de lantânio (10 mM) a 0°C interrompendo o fluxo de cálcio na preparação, conforme figura 9 (BATRA et al. 1983).

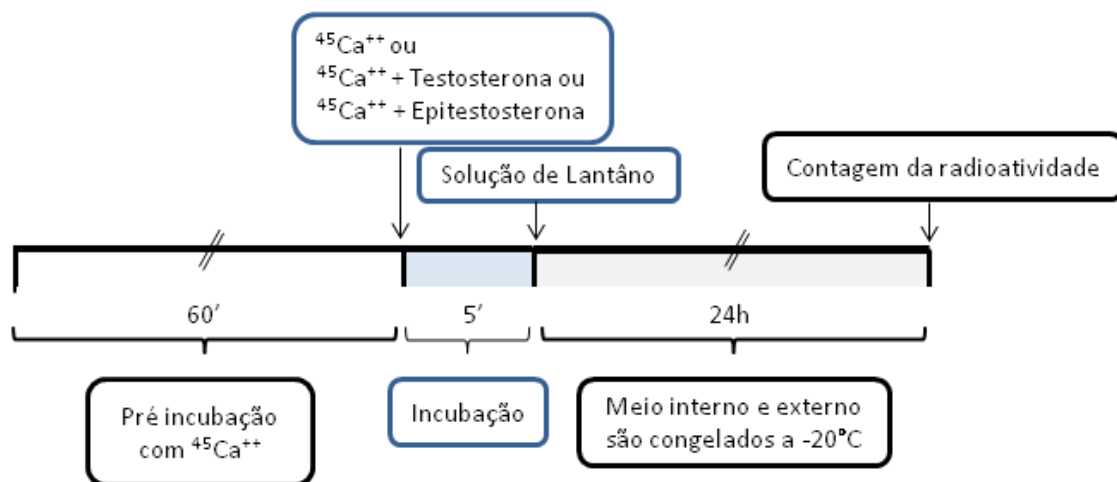


Figura 9 - Experimento de captação de cálcio; n = 5 por grupo

Ao final da incubação o sobrenadante foi preservado, os testículos foram retirados dos tubos, secos em papel filtro, umedecidos com HBSS para remover o excesso de cálcio radioativo aderido à superfície externa da amostra e acondicionados em tubos de vidro com tampa rosca, contendo 500  $\mu\text{L}$  de água destilada. Todos os tubos foram congelados a -20°C, durante 24 horas.

Para a contagem da radioatividade os tubos contendo os testículos foram fervidos por dez minutos, para romper a membrana extracelular e obter o equilíbrio entre o líquido intracelular e a água destilada adicionada. Desse meio foram retiradas alíquotas de 100 µL e colocados em 3 mL de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio intracelular. Do meio de incubação foram retiradas também alíquotas de 100 µL e colocadas em 3 mL de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio extracelular.

A radioatividade das amostras foi determinada em contas por minuto (cpm) em espectrômetro de cintilação LKB Rack Beta modelo 1215 (LKB Produkter AB, Bromma, Suécia) com eficiência de 85 a 90%. Os resultados foram expressos pela relação entre radioatividade do tecido (meio interno) e a radioatividade do meio de incubação (meio externo): relação tecido/meio (T/M).

$T/M = [(cpm \text{ interno} \times 1000) / \text{peso do testículo}] / cpm \text{ externo}$  para pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por miligrama de tecido para o cálcio radioativo.

### **3.6 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular**

Na técnica de eletrofisiologia foram utilizados ratos neonatos (4º e 5º dpn) e imaturos (14º dpn). Os animais foram eutanasiados através da técnica de deslocamento cervical e os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e colocados em solução HBSS mantida no gelo. Em seguida, os testículos foram descapsulados e cuidadosamente estirados com uso de duas pinças de ponta fina, para expor 5 a 10 túbulos seminíferos que foram fixados no fundo de uma câmara de perfusão com um fio ortodôntico (Figura 10).

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

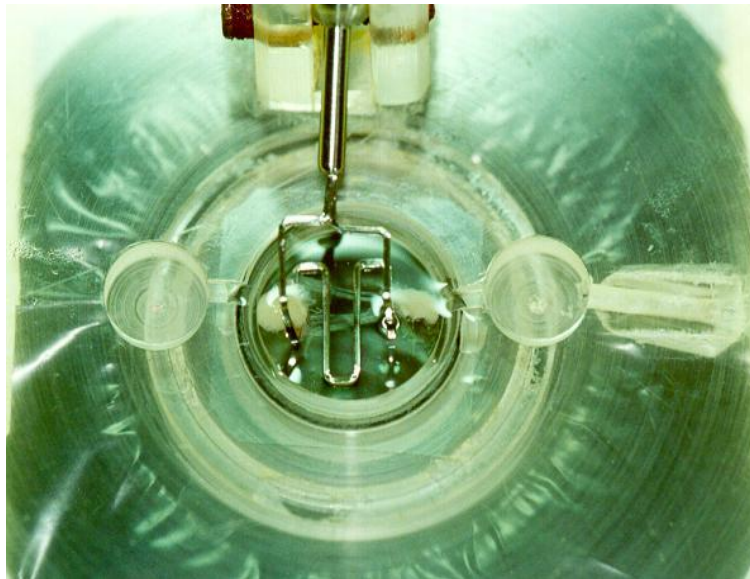


Figura 10 - Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo

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

O potencial de membrana da célula de Sertoli empalada foi registrado através do microeletrodos, preenchido com KCl (3 mol/L), com resistência de 15 a 25 M $\Omega$ . Esse microeletrodo estava conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK), que permite o monitoramento do potencial de membrana da célula através de um osciloscópio (TDS 200 Tectronix, Inc). Os dados foram armazenados em um computador através da placa de aquisição de dados (TDS 210 Tectronix) e do programa Wave Star (Lite versão 1.0.10, 1996 Tectronix, Inc.). Pulsos de corrente quadrados (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) foram aplicados através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass instruments) (Figura 11).

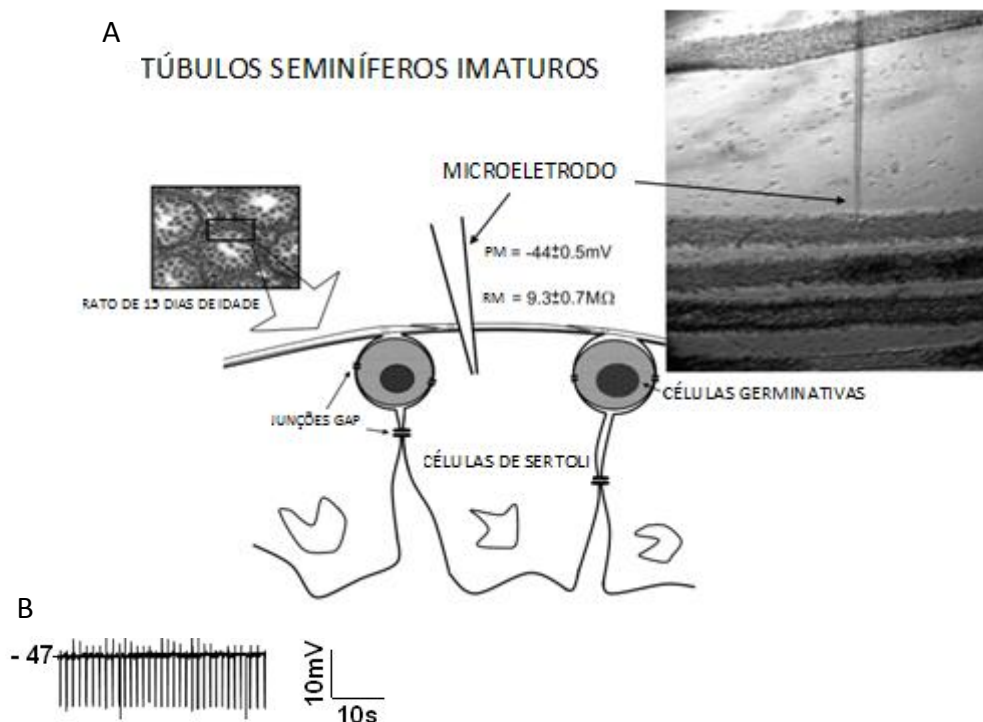


Figura 11 - A. Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana e resistência da membrana. B. representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47 mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5 nA.

Foram utilizadas apenas células que apresentassem potenciais de membrana mais negativos que  $-25 \text{ mV}$ , uma vez que, de acordo com trabalhos anteriores do laboratório, esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli. Após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos os hormônios T, EpiT e FSH foram aplicados tópicamente à câmara de perfusão, sendo registrado o potencial após a aplicação por pelo menos 5 minutos (Figuras 12 e 13). Foram registradas e comparadas as variações do potencial e da resistência da membrana de células de Sertoli após a aplicação tópica dos hormônios.



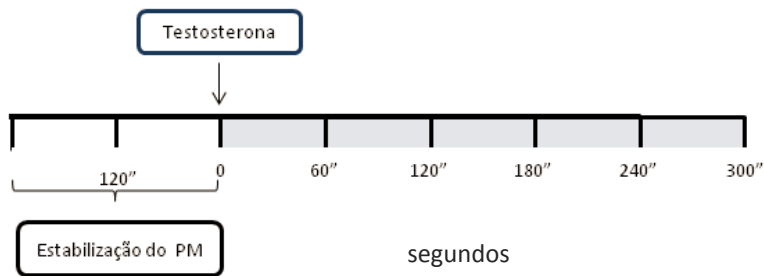


Figura 12 - Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular em células de Sertoli de ratos neonatos; n = 4.

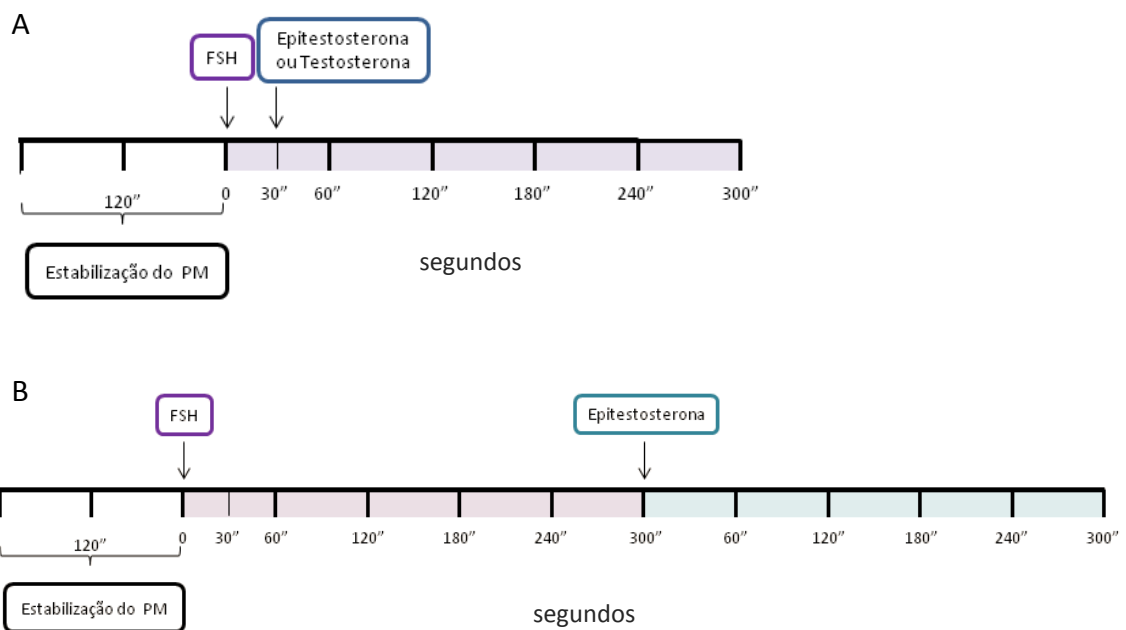


Figura 13 - Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular em células de Sertoli de ratos no 14º dpn.

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)

$$\text{LEI DE OHM: } I = V/R \rightarrow R = V/I$$

$$\text{Resistência da Membrana} = \frac{\text{voltagem registrada no osciloscópio}}{\text{pulso de corrente aplicado}}$$

A voltagem registrada no osciloscópio está 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.

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados o Teste-t de *Student* para comparação entre dois grupos, ANOVA para medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni ou teste de Friedmann, seguido do pós-teste de Dunn. 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)). Os testes específicos utilizados em cada experimento foram citados nos resultados. Foram considerados significativos resultados que apresentaram um  $P < 0,05$ .

## **5 BIOSSEGURANÇA**

Durante a execução dos experimentos propostos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimento e aventais para a sua própria proteção. Quando necessário foram utilizadas máscaras cirúrgicas e óculos de proteção. Nesse caso, a preparação das soluções foi realizada dentro de capela de exaustão.

O descarte dos resíduos não tóxicos, por exemplo, soluções salinas que não foram utilizadas, foram realizadas no esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos experimentos foram acondicionados em frascos e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para o procedimento correto de descarte. Os resíduos radioativos foram acondicionados e encaminhados conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS. As carcaças dos animais e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS.

## 6 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número 22635.

Os animais foram eutanasiados ou anestesiados antes de se iniciar qualquer procedimento. A eutanásia é o procedimento através do qual um ser vivo é levado à morte sem dor. A técnica de deslocamento cervical consiste em uma manobra rápida, devido ao rompimento da medula espinhal, que em segundos leva o animal à perda total de sensibilidade e à morte (RHODEN, 2006). Desta forma, entendemos que o grau de sofrimento ao qual o animal foi submetido é mínimo. De acordo com o Guia de Severidade de Procedimentos Científicos da UFRGS todos os procedimentos são classificados como LEVE. Essa classificação reflete o grau de dor, sofrimento, incômodo ou prejuízo duradouro a ser experienciado pelo animal durante a execução dos procedimentos.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Imunoistoquímica

No presente estudo, avaliamos a imunorreatividade ao iAR em testículos de ratos *Wistar* neonatos, no 4º e 5º dpn, e adultos (60 dias). A imunorreatividade ao iAR foi detectada tanto nos túbulos seminíferos dos testículos dos neonatos quanto dos animais adultos. A reação imunoistoquímica foi detectada pela visualização de um precipitado de coloração parda, que não foi observado quando o anticorpo primário foi omitido.

O padrão de imunorreatividade dos animais adultos foi utilizado como controle-positivo do experimento. Nesses animais, a imunorreatividade foi observada em diferentes tipos celulares dos túbulos seminíferos, incluindo as células de Sertoli da parede do túbulo, as células peritubulares e as células de Leydig (Figura 14 e 15). Como os cortes foram contracorados com hematoxilina, os núcleos das células germinativas primordiais apresentam uma coloração azulada.

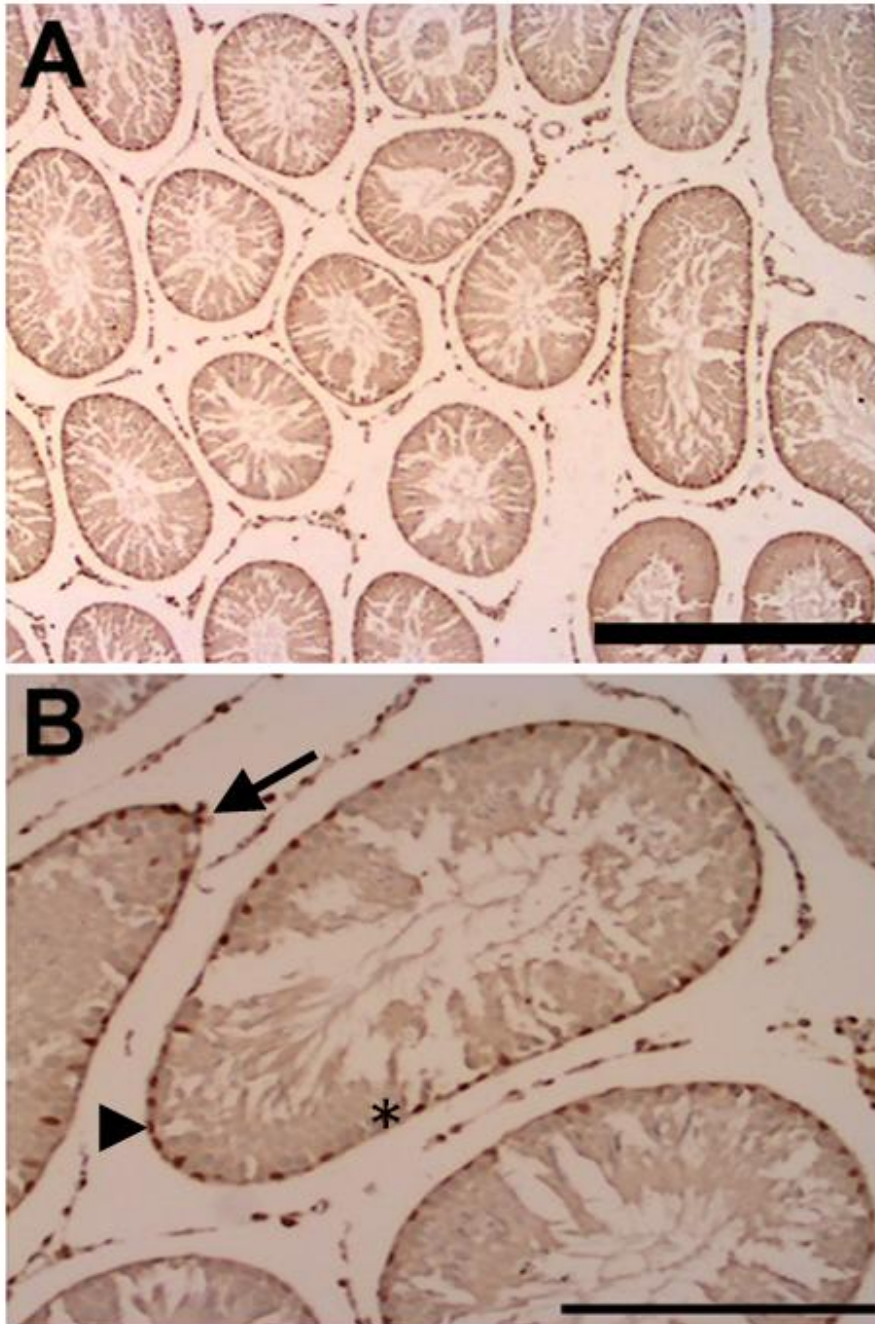


Figura 14 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos adultos mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreacção nas células de Sertoli (asteriscos), células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Barra de calibração = 200  $\mu$ m.

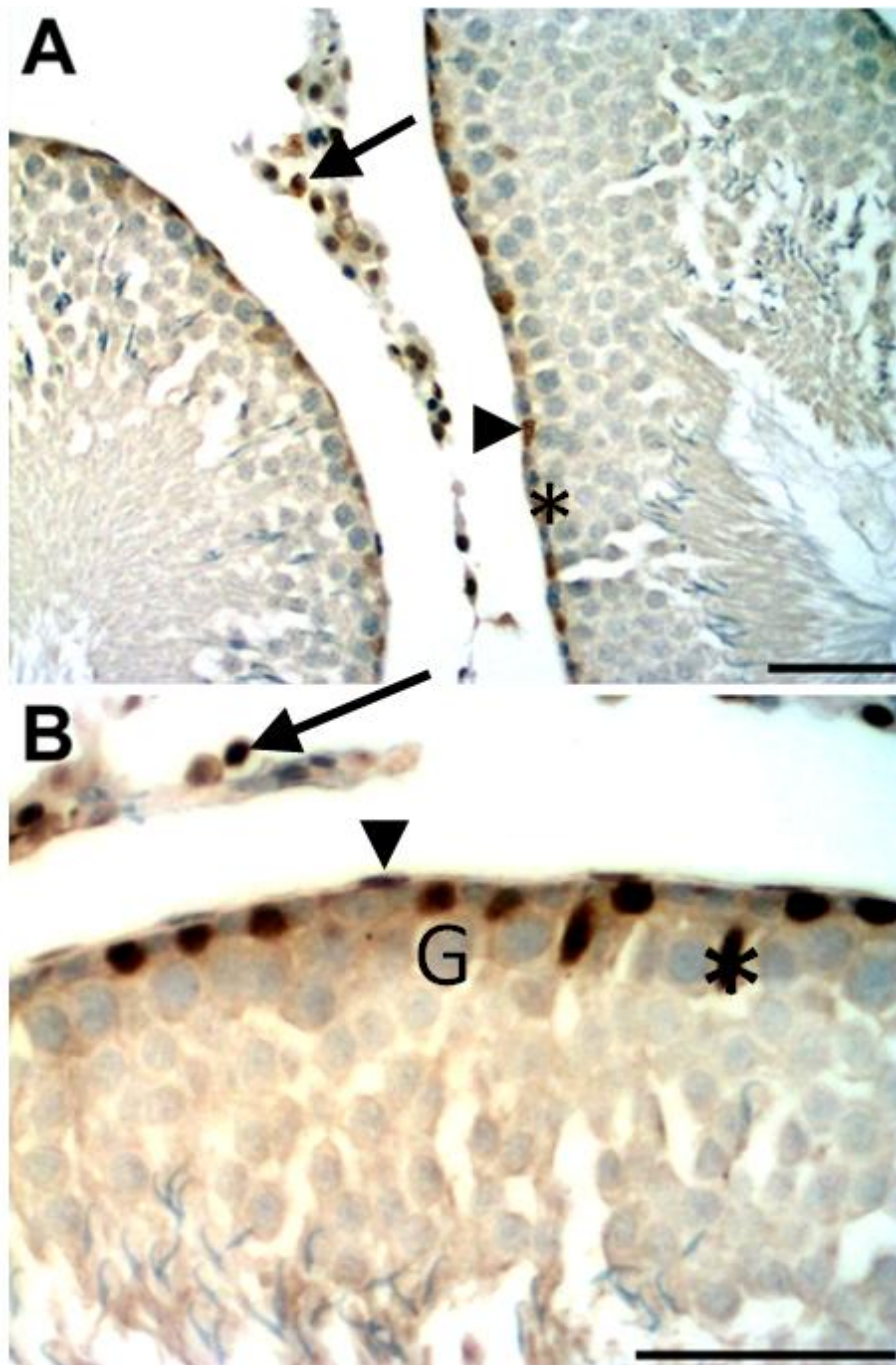


Figura 15 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos adultos mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreacção nas células de Sertoli (asteriscos), células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Algumas células da linhagem espermatogênica estão indicadas por G. Barra de calibração = 50  $\mu$ m.



Nas figuras 16 e 17 o tecido apresenta o padrão de imunorreatividade nos túbulos seminíferos dos animais no 4º dpn. Nesses animais, foi observada imunorreatividade ao iAR nas células peritubulares e nas células de Leydig. Entretanto, não foi observada imunorreção nas células de Sertoli.

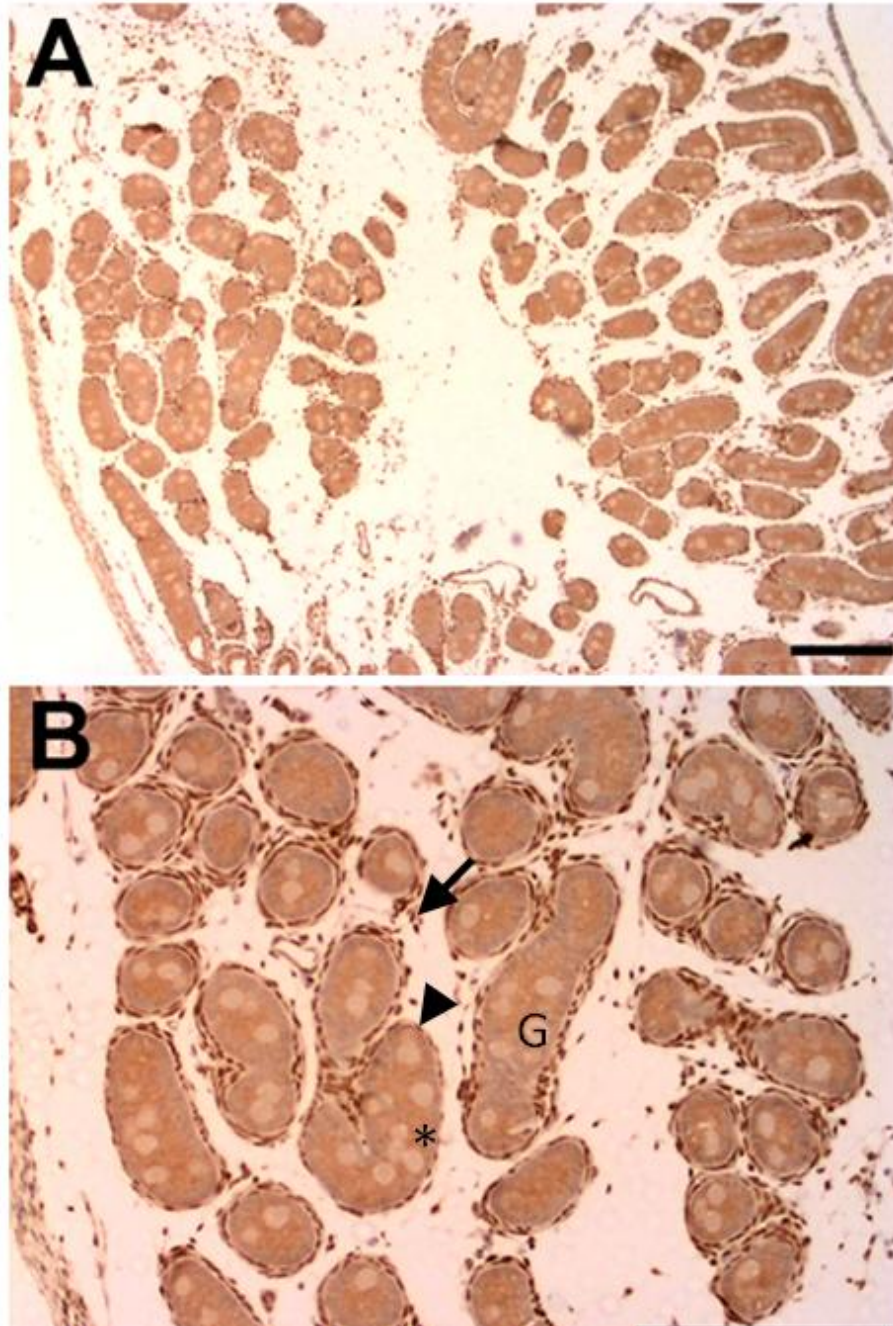


Figura 16 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 4º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreção nas células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Não há imunorreção nas células de Sertoli (asteriscos). Algumas células germinativas primordiais estão indicadas por G. Barra de calibração = 200  $\mu$ m.

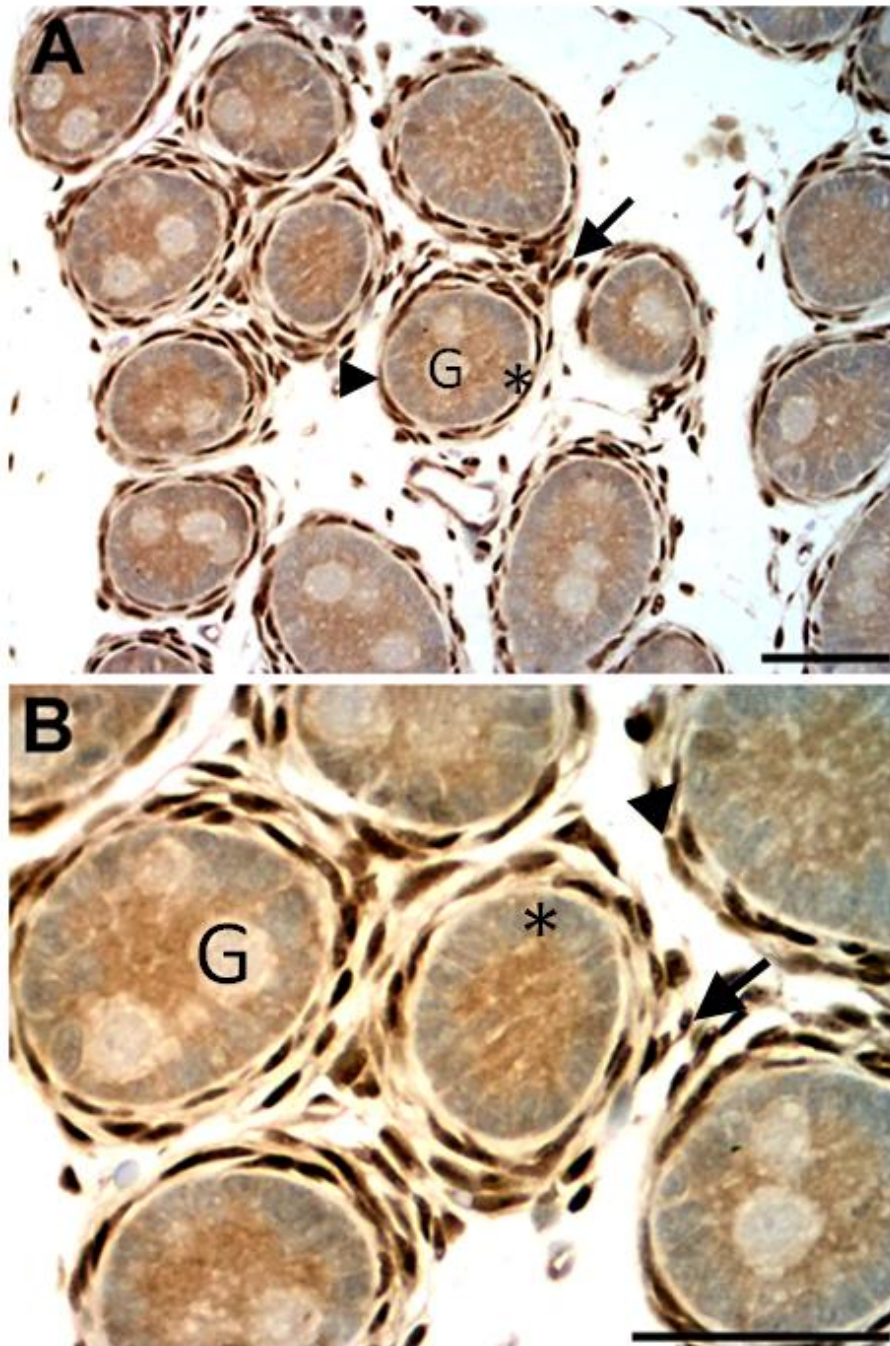


Figura 17 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 4º dpn mostrando o padrão de imunoreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreação nas células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Não há imunorreação nas células de Sertoli (asteriscos). Algumas células germinativas primordiais estão indicadas por G. Barra de calibração = 50  $\mu$ m.

O mesmo padrão de imunorreatividade foi observado nos túbulos seminíferos dos animais no 5º dpn, ou seja, nenhuma imunorreação foi observada nas células de Sertoli, enquanto as células de Leydig e as células apresentaram imunorreatividade ao iAR (Figura 18 e 19).

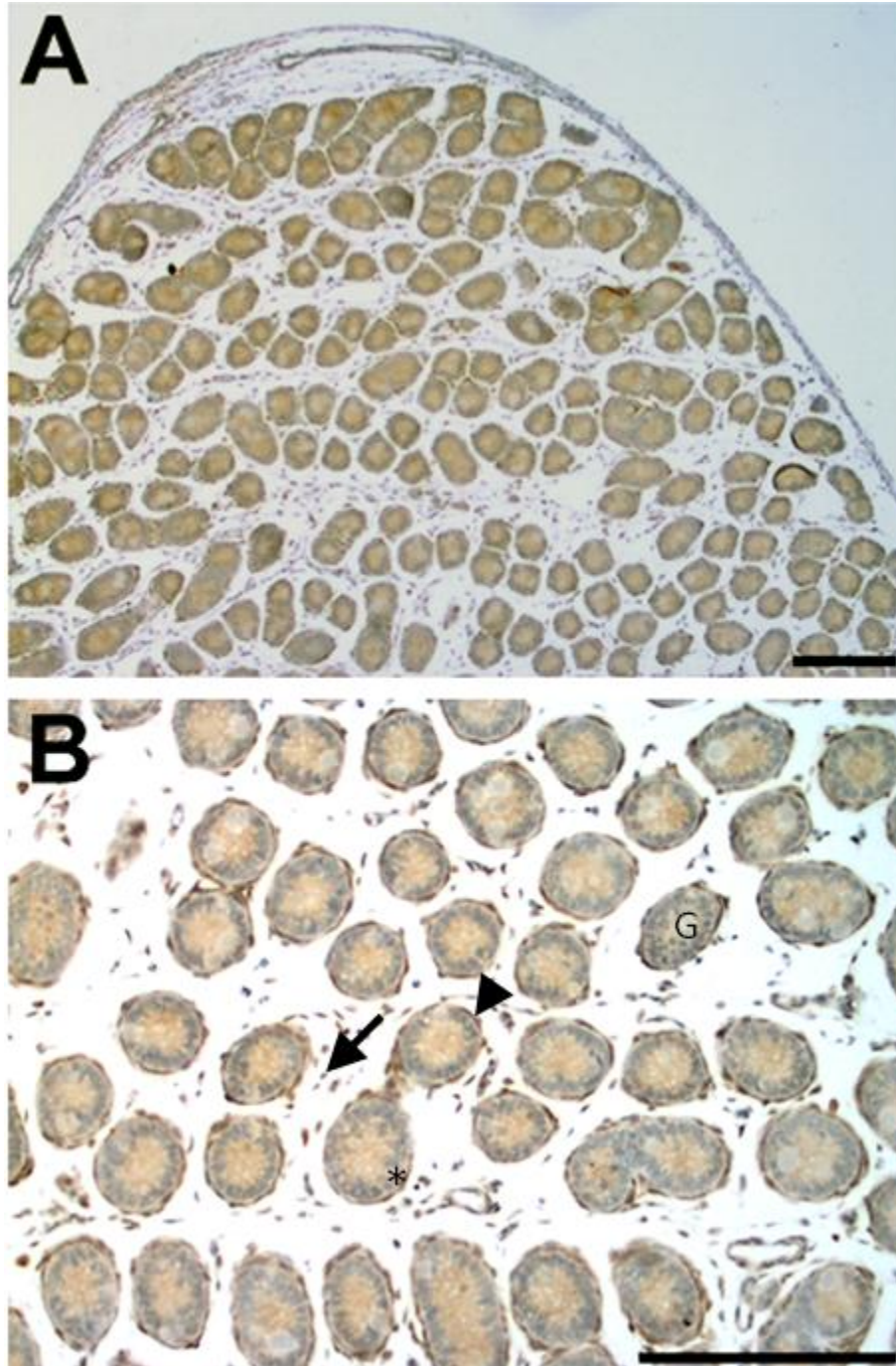


Figura 18 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 5º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 4x (A) ou 10x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreação nas células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Não há imunorreação nas células de Sertoli (asteriscos). Algumas células germinativas primordiais estão indicadas por GC. Barra de calibração = 200 µm.

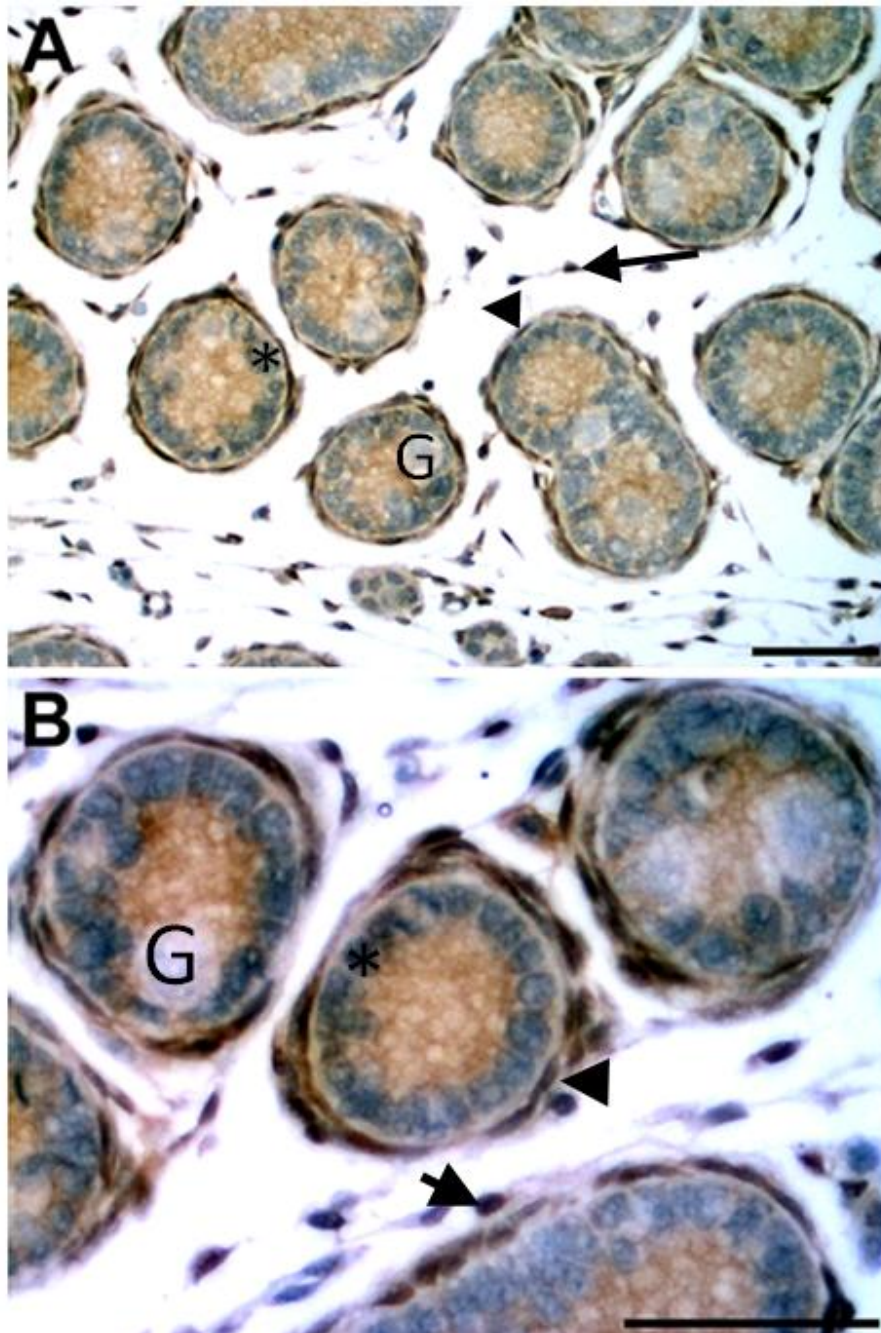


Figura 19 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, de ratos no 5º dpn mostrando o padrão de imunorreatividade ao iAR com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) ou 40x (B). O tecido foi contracorado com hematoxilina. Observe a imunorreacção nas células de Leydig (setas) e nas células peritubulares (cabeças de setas). Não há imunorreacção nas células de Sertoli (asteriscos). Algumas células germinativas primordiais estão indicadas por G. Barra de calibração = 50µm

Para comprovar a especificidade da reação imunoistoquímica, o anticorpo primário foi omitido durante a incubação de alguns cortes (controle-negativo), embora os mesmos tenham sido submetidos a todas as demais etapas da técnica de imunoistoquímica. Nesses cortes, não foi observado nenhum tipo de imunorreação, independentemente da idade dos animais (Figura 20).

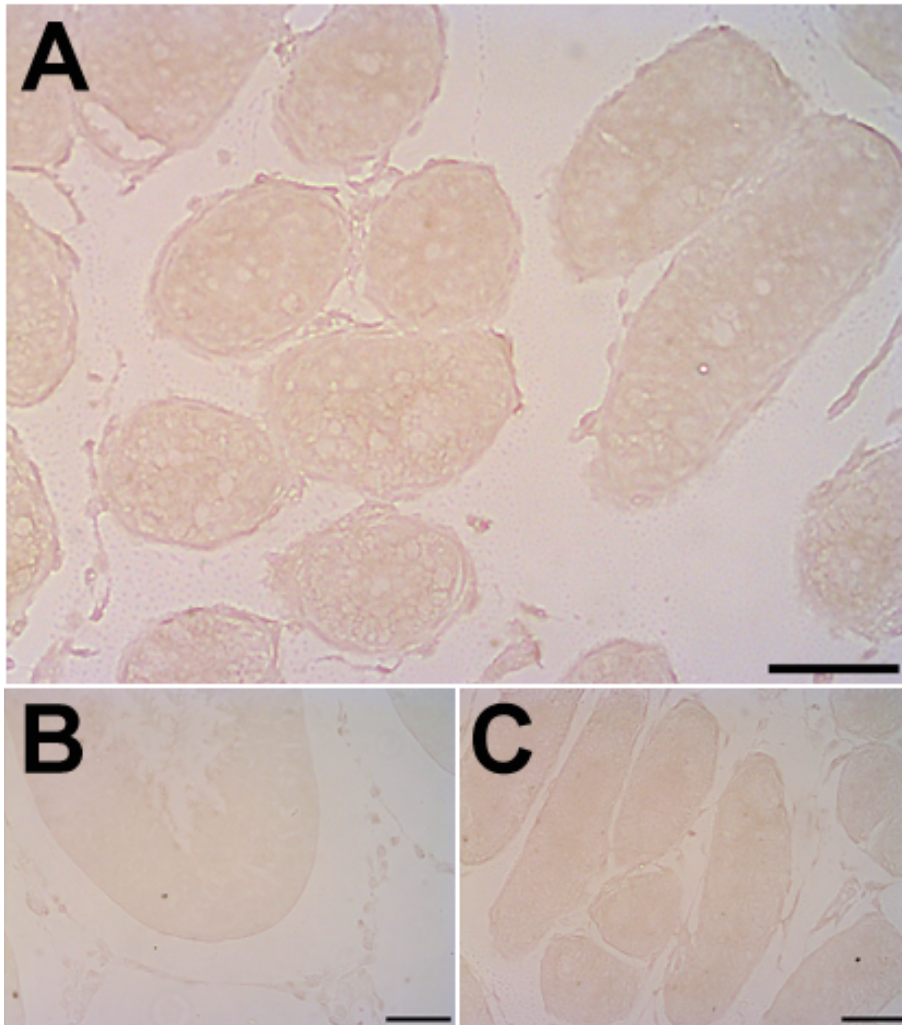


Figura 20 - Fotomicrografias de secções dos túbulos seminíferos, em diferentes planos de corte, mostrando a ausência de imunorreatividade ao iAR nos cortes do controle-negativo (anticorpo primário foi substituído por PBS-T) com a utilização de uma lente objetiva de 20x (A) adulto; (B) 4º dpn e (C) 5º dpn. Barra de calibração: 50  $\mu$ m

## 7.2 Captação de Cálcio

### 7.2.1 Efeito da Testosterona sobre a Captação de Cálcio

A T aumentou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos neonatos após 5 minutos de incubação (Figura 21).

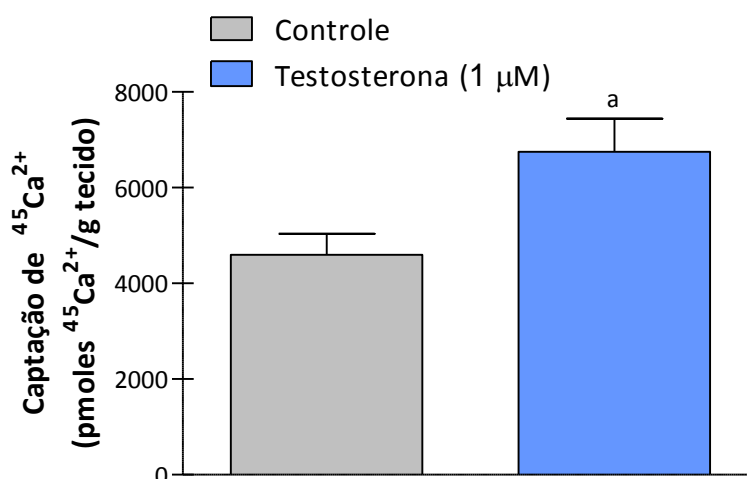


Figura 21- Efeito da testosterona (1  $\mu\text{M}$ ) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. Teste T de *Student*, <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; n = 5 por grupo.

### 7.2.2 Efeito da Epitestosterona sobre a Captação de Cálcio

A EpiT aumentou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos neonatos após 5 minutos de incubação (Figura 22).

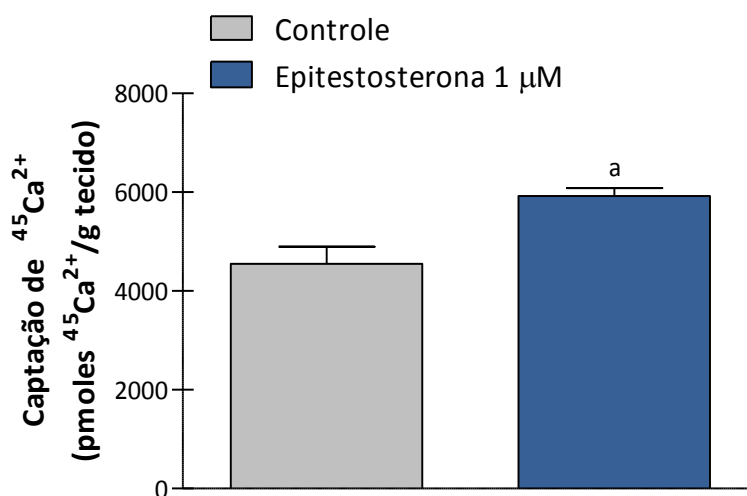


Figura 22 - Efeito da epitestosterona (1  $\mu\text{M}$ ) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. Teste T de *Student*, <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; n = 5 por grupo.

### 7.2.3 Comparação entre o Efeito da Testosterona e da Epitestosterona Sobre a Captação de Cálcio

Não há diferença entre a resposta da T e da EpiT sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos neonatos após 5 minutos de incubação (Figura 23).

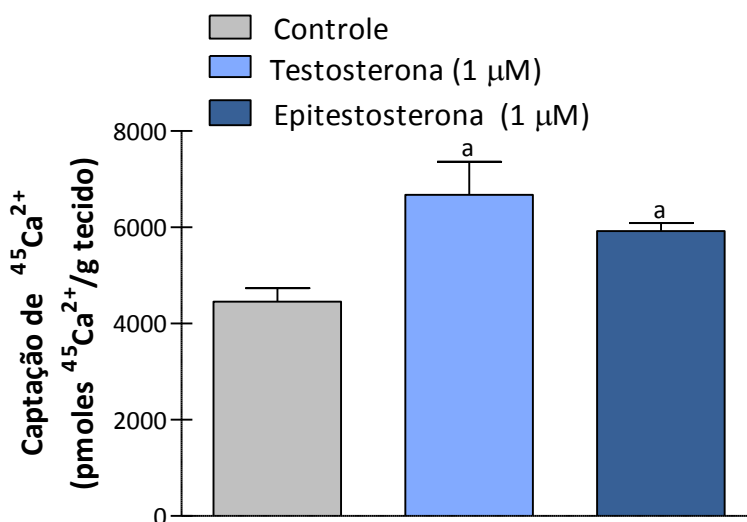


Figura 23 – Comparação entre o efeito da testosterona (1  $\mu\text{M}$ ) e da epitestosterona (1  $\mu\text{M}$ ) sobre a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn. ANOVA, <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; n = 5 por grupo

## 7.3 Técnica de Registro Intracelular em Células de Sertoli de Ratos Neonatos

### 7.3.1 Potencial de Membrana Basal

As células de Sertoli de ratos neonatos no 4º e 5º dpn apresentaram potencial de membrana médio de  $-32,62 \pm 2,32$  mV e resistência média de  $16,25 \pm 0,71$  M $\Omega$  (Figura 24).

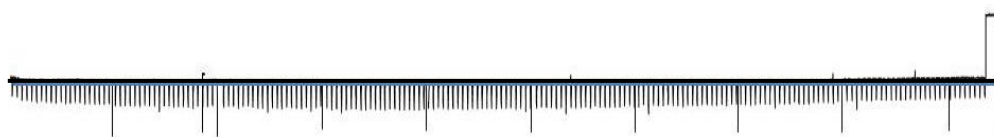


Figura 24 - Representação do potencial de repouso de uma célula de Sertoli típica de testículo de rato neonato no 5º dpn. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5nA.

### 7.3.2 Efeito da Testosterona Sobre o Potencial de Membrana

A aplicação tópica de T resultou em despolarização do potencial de membrana (Figura 25 e 26), significativa aos 180 e 240 segundos.



Figura 25 - Representação do potencial de membrana de uma célula de Sertoli no 5º dpn após aplicação de testosterona (1 $\mu$ M). Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5nA.

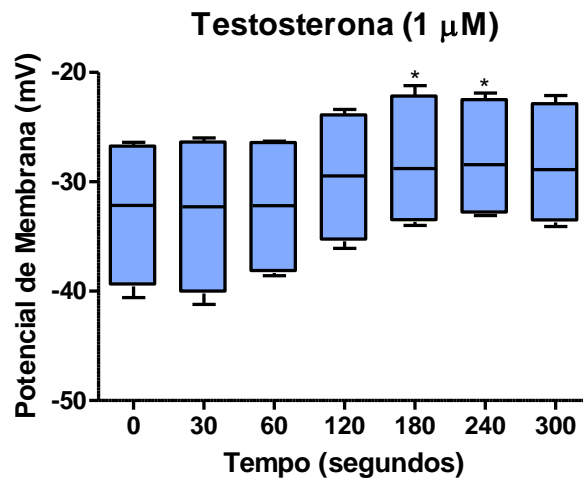


Figura 26 - Efeito da aplicação de testosterona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 5º dpn. Teste de Friedman, <sup>a</sup> $P < 0,001$  em relação ao repouso; n = 4.



## 7.4 Técnica de Registro Intracelular em Células de Sertoli de Ratos no 14º dpn

### 7.4.1 Interação entre os Efeitos Eletrofisiológicos da Testosterona e do FSH

A aplicação de T 30 segundos após a aplicação de FSH resultou em uma alteração da resposta de ambos hormônios (Figura 27).

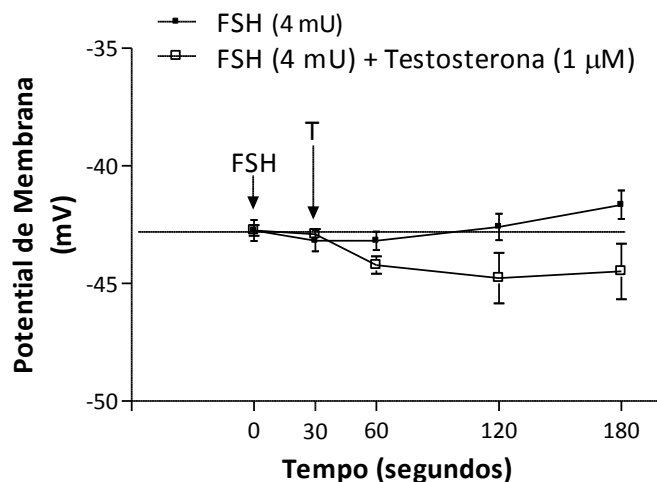


Figura 27 – Interação entre as respostas da testosterona (1µM) e do FSH (4 mU) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 14º dpn. ANOVA de medidas repetidas; n = 7

Na figura 28, podemos observar a redução na variação do potencial de membrana desencadeada pela aplicação de FSH seguida da T comparada com a variação gerada pelo FSH.

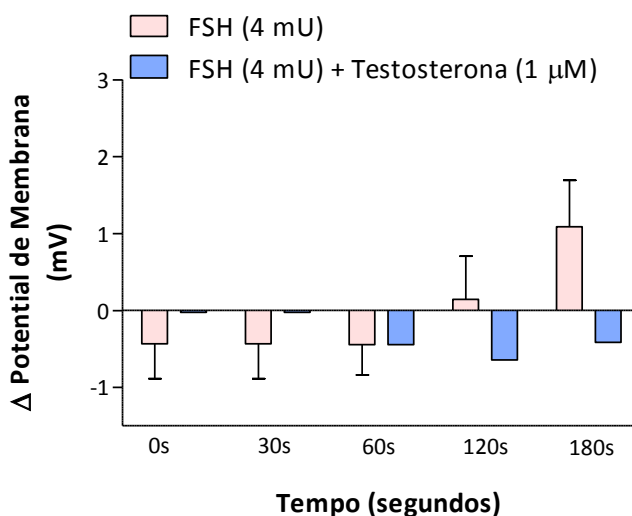


Figura 28 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da testosterona (1 µM).

Não houve diferença entre o efeito isolado do FSH e a interação entre os efeitos do FSH e T sobre a resistência da membrana das células de Sertoli aos 180 segundos (Figura 29).

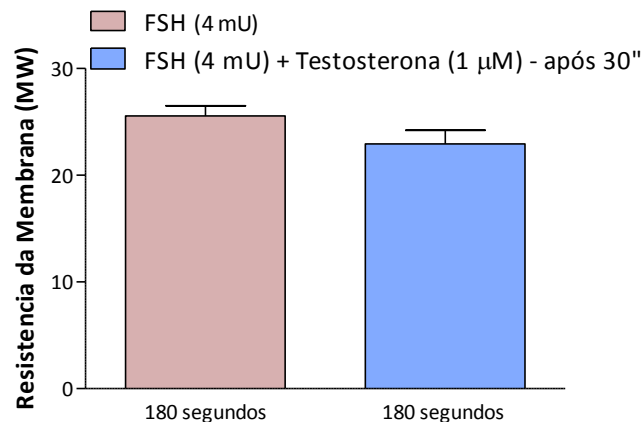


Figura 29– Comparação do efeito do FSH (4 mU) e FSH (4 mU) + testosterona (1µM) sobre a resistência membrana das células de Sertoli desencadeada, aos 180 segundos. Teste t de *Student*; n = 7

#### 7.4.2 Interação Entre os Efeitos Eletrofisiológicos da Epitestosterona e do FSH

A aplicação de EpiT 30 segundos após a aplicação de FSH resultou em uma redução da resposta de ambos hormônios (Figura 30).

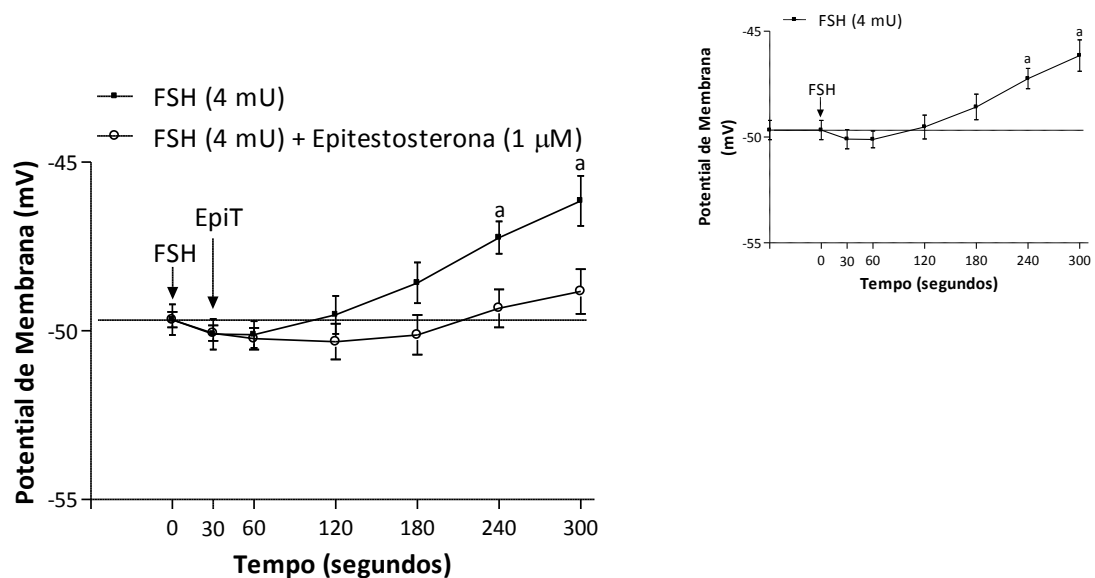


Figura 30- Interação entre as respostas da epitestosterona (1µM) e do FSH (4 mU) sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 14º dpn. ANOVA de medidas repetidas, <sup>a</sup>P<0,05; n = 6.

Na figura 31, podemos observar a redução na variação do potencial de membrana desencadeada pela aplicação de FSH seguida da EpiT comparada com a variação gerada pelo FSH.

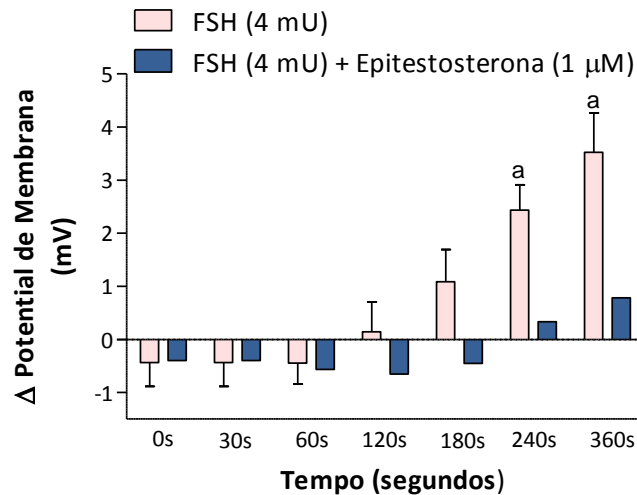


Figura 31 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da epitestosterona (1 μM). ANOVA de medidas repetidas, <sup>a</sup> $P < 0,05$ ;  $n = 6$

Não houve diferença entre o efeito isolado do FSH e o efeito da interação entre FSH e EpiT sobre a resistência da membrana das células de Sertoli aos 240 segundos (ponto em que a despolarização do FSH isolado é significativa) (Figura 32).

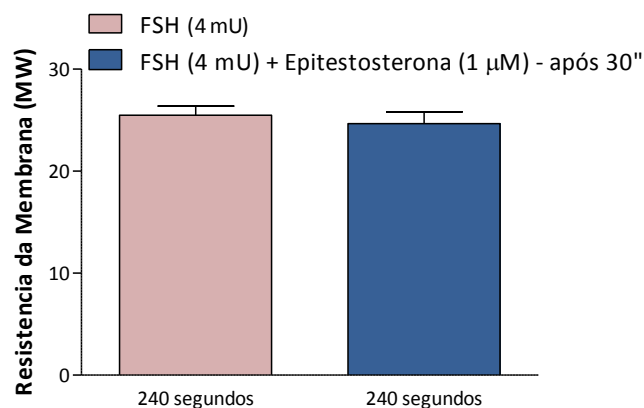


Figura 32 – Comparação do efeito do FSH (4 mU) e FSH (4 mU) + epitestosterona (1μM) sobre a resistência membrana das células de Sertoli desencadeada, aos 240 segundos. Teste t de *Student*:  $n = 6$

A aplicação de EpiT 5 minutos após a aplicação de FSH resultou em um retardo na resposta que passa a ser significativa somente aos 300 segundos, enquanto a resposta isolada da EpiT é significativa já aos 120 segundos (Figuras 33).

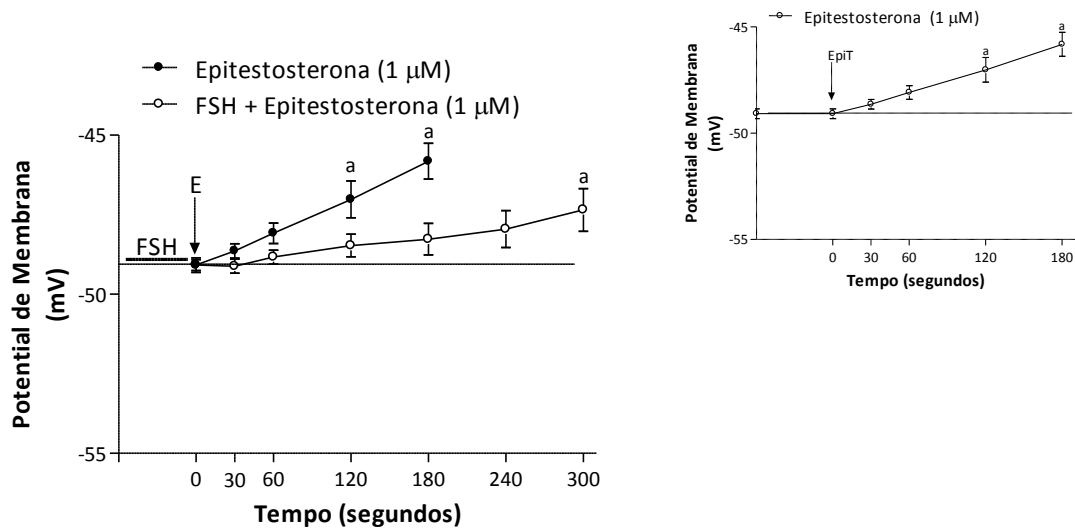


Figura 33 – Comparação da variação do potencial de membrana das células de Sertoli desencadeada pela interação entre as ações eletrofisiológicas do FSH (4 mU) e da epitestosterona (1 μM). ANOVA de medidas repetidas, seguida do pos-teste de Bonferroni <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; n = 6

Assim como o efeito da interação entre FSH e EpiT sobre o potencial de membrana das células de Sertoli o efeito sobre a resistência da membrana também foi reduzido, sendo significativo aos 180 segundos (Figura 34).

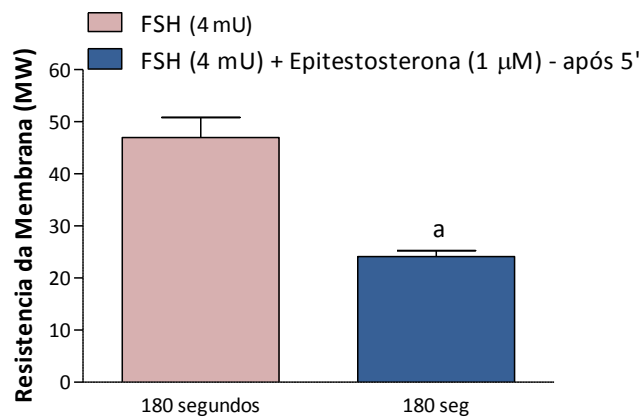


Figura 34– Comparação do efeito da epitestosterona 1μM e FSH (4 mU) + epitestosterona (1μM) aplicada 5 min após o FSH (4 mU), sobre a resistência membrana das células de Sertoli desencadeada, aos 180 segundos. Teste t de Student; <sup>a</sup> $P < 0,05$ , n = 6

## 8 DISCUSSÃO

No presente trabalho observamos que ratos da linhagem *Wistar* não expressam iAR nas células de Sertoli no 4º e 5º dpn. Nestes animais, tanto a T quanto a EpiT atuam por meio do mecanismo não clássico promovendo aumento da captação de cálcio no tecido testicular e despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli. Também foi observado que ocorre uma conversa cruzada entre os efeitos não clássicos dos andrógenos e do FSH sobre o potencial de membrana de células de Sertoli. Todas as técnicas desenvolvidas na realização deste trabalho foram adaptadas com o intuito de adequarem-se às particularidades dos animais neonatos.

Este estudo teve por finalidade comprovar que os efeitos não clássicos dos andrógenos em células de Sertoli são mediados por um receptor de membrana, distinto do iAR. Sendo assim, foram avaliados os efeitos não-clássicos da T e da EpiT em células de Sertoli de ratos *Wistar* neonatos que não apresentam iAR nestas células. É consenso entre os pesquisadores que a imunorreatividade ao iAR nas células de Sertoli tem início somente no período pós-natal. Os principais estudos acerca da ontogenia do iAR, realizados por Bremner (1994), You (1998), Al-Attar (1997) e seus colaboradores, mostram a imunorreatividade ao iAR em células de Sertoli iniciando no 5º dpn. Entretanto, esses trabalhos foram realizados em ratos da linhagem *Sprague Dawley* e camundongos. Os dados disponíveis sobre a ontogenia do iAR em células de Sertoli de ratos *Wistar* são bastante controversos. Majdic e seus colegas (1995) encontraram imunorreação para iAR no núcleo de células de Sertoli de ratos *Wistar* no 3ª e 5º dpn. Já em estudo mais recente, o iAR foi visualizado somente ao final da segunda semana pós-natal, nas células de Sertoli dos animais com 0, 3 e 8 dias sua expressão não foi identificada (WEBER et al., 2002). Considerando a importância da ontogenia da expressão do iAR e que animais da linhagem *Wistar* são amplamente utilizados para o estudo de aspectos reprodutivos, a avaliação da imunorreatividade ao iAR em ratos *Wistar* neonatos foi realizada neste estudo.

A imunorreatividade ao iAR, detectada pela visualização de um precipitado de coloração parda, foi observada nas células peritubulares e nas células de Leydig no 4º e 5º dpn, assim como nos animais adultos (Figuras 14-19). Este resultado está de acordo com os

dados disponíveis na literatura, que mostram a expressão de iAR em células peritubulares e células de Leydig iniciando ainda no período fetal (AL-ATTAR et al., 1997; BREMNER et al., 1994; MAJDIC; MILLAR; SAUNDERS, 1995; WEBER et al., 2002; YOU; SAR, 1998). Nos animais adultos, utilizados como controle-positivo da técnica, constatamos intensa marcação referente ao iAR nas células de Sertoli (Figuras 14 e 15). No 4º e 5º dpn não foi observada imunorreação ao iAR nas células de Sertoli de ratos *Wistar* (Figuras 16-19). Este resultado difere dos dados relativos à expressão de iAR em ratos da linhagem *Sprague Dawley*. Os dados disponíveis na literatura quanto às diferenças/semelhanças nos aspectos reprodutivos entre as referidas linhagens não são conclusivos. Estudo realizado por Wilkinson *et al* (2000) comparou parâmetros reprodutivos de animais adultos das duas linhagens de ratos. Ratos *Sprague Dawley* apresentaram maior peso corporal, maior peso da vesícula seminal e maior contagem de espermatozoides no epidídimo comparado aos *Wistar*. Em trabalho realizado com animais adultos das duas linhagens, observou-se que a quantidade de T produzida por grama de tecido foi maior nos animais *Wistar* comparados ao grupo *Sprague Dawley* (WILSON et al., 2007). Recente estudo que comparou indicativos de maturidade sexual, como histologia do tecido tecidual, número e mobilidade dos espermatozoides no epidídimo, concluiu que não há diferenças no término da maturidade sexual das referidas linhagens (CAMPION et al., 2013). Todavia, não foram encontrados trabalhos comparando os eventos fetais e neonatais destas linhagens.

A T e a EpiT promoveram um aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no tecido testicular de ratos no 4º dpn, após 5 minutos de incubação (Figuras 21 e 22). Esse aumento foi significativo em comparação com os respectivos controles basais e não apresentou diferença quando comparados os efeitos dos dois hormônios (Figura 23). Essa resposta foi semelhante à encontrada em testículos de ratos de 15 dias, onde a T e a EpiT estimularam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em 5 minutos (DE CASTRO et al., 2013; VON LEDEBUR et al., 2002). De forma similar, já foi observado que a T aumenta a concentração intracelular de cálcio em células de Sertoli isoladas de testículos de animais imaturos (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; LEITE et al., 1999; ROMMERTS et al., 2000). Após pré-incubação com EGTA, um quelante de cálcio extracelular (diminui o influxo de cálcio para o meio intracelular), as células de Sertoli isoladas apresentaram uma redução da concentração basal de cálcio no meio intracelular e a adição de T não é capaz de elevar a concentração intracelular do íon (GORCZYNSKA;

HANDELSMAN, 1995; ROMMERTS et al., 2000). A aplicação de T e EpiT, após pré-incubação com verapamil (bloqueador dos VDCC-L), não foi capaz de aumentar os níveis intracelulares de cálcio, tanto em testículos inteiros quanto em células de Sertoli isoladas (DE CASTRO et al., 2013; ROMMERTS et al., 2000; VON LEDEBUR et al., 2002). O bloqueio da ação dos andrógenos pelo EGTA e verapamil, observado em outros estudos, indica que a elevação da concentração do cálcio intracelular se dá em decorrência do fluxo de íons proveniente do meio extracelular. Este influxo de cálcio é mediado, principalmente, por VDCC-L.

O cálcio é um importante segundo mensageiro intracelular que está envolvido na regulação de inúmeros processos celulares, como proliferação celular, plasticidade neural e apoptose (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998). Na célula de Sertoli, o aumento da concentração intracelular de cálcio pode exercer diversos efeitos sobre o citoesqueleto, influenciando aspectos como mobilidade celular; adesão entre células de Sertoli e células germinativas; e transcrição gênica e a secreção de substâncias responsáveis pela comunicação entre as células testiculares e suporte nutricional das células germinativas (revisado em Loss et al. 2004). No período neonatal, o aumento da concentração intracelular de cálcio pode estar envolvido no movimento das células germinativas em direção à membrana basal dos cordões seminíferos, assim como no conseqüente movimento das células de Sertoli a fim de permitir a realocação das células germinativas junto à membrana. Estudos adicionais são necessários para que tenhamos a compreensão dos processos regulados pelo aumento intracelular de cálcio mediado pela ação não-clássica da T e EpiT. Pouco se sabe a respeito das ações da EpiT. Quando se liga ao iAR a EpiT apresenta ação antagônica em relação à T, sendo, inclusive, considerada um hormônio anti-androgênico (Starka, 2003). Entretanto, quando age sobre mAR a resposta despolarizante de ambos andrógenos é muito semelhante (DE CASTRO et al., 2013).

O estudo eletrofisiológico das células de Sertoli de ratos neonatos no 4º e 5º dpn apontou um potencial de membrana basal médio de  $-32,62 \pm 2,32$  mV (n= 8) e resistência média de  $16,25 \pm 0,71$  M $\Omega$  (n= 8) (Figura 24). Um dos principais desafios deste trabalho foi atingir a estabilização do potencial de membrana das células de Sertoli de ratos no 4º e 5º dpn. Para realizar o empalamento, a ponta é encostada na membrana da célula e uma corrente é aplicada, com isso a membrana da célula envolve a ponta, selando o sistema, e estabilizando o potencial de membrana da célula. Entretanto, nos animais neonatos, logo

após o empalamento, o potencial de membrana variava rapidamente aproximando-se do zero. De forma que a habilidade da membrana de envolver a ponta parece estar diminuída. De fato, a estrutura do tecido nesta idade é muito diferente naquela observada nos animais de 12-15 dias, para os quais a técnica de eletrofisiologia foi inicialmente padronizada. Nos neonatos as células de Sertoli estão em contato com a membrana basal dos finos cordões seminíferos, conforme pode ser observado nas imagens da imunoistoquímica (Figuras 16-19). Além disso, a membrana das células de Sertoli, bem como a membrana basal dos túbulos seminíferos apresentam alterações na sua composição durante o desenvolvimento pós-natal (DYM, 1994).

A aplicação tópica de T provocou a rápida despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli de ratos neonatos no 5º dpn, significativa aos 180 e 240 segundos (Figura 25 e 26). Em estudos anteriores do grupo (DE CASTRO et al., 2013; LEITE et al., 1999; VON LEDEBUR et al., 2002) foi demonstrado que tanto a T quanto a EpiT atuam através da via de ação não-clássica, promovendo respostas rápidas como a despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli e o influxo de cálcio no tecido testicular de ratos imaturos (15 dias), similares as encontradas no presente trabalho. Ao mesmo tempo, inúmeros trabalhos revelam a persistência dos efeitos não clássicos dos andrógenos mesmo na presença de antagonistas do iAR, como a flutamida (DE CASTRO et al., 2013; GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; ROMMERTS et al., 2000). Assim, sugerindo que a via de ação não-clássica ocorre por intermédio de um receptor de andrógenos localizado na membrana da célula de Sertoli, estruturalmente distinto do iAR. Essa hipótese foi confirmada pelos resultados obtidos no presente trabalho. Os andrógenos foram capazes de, através do mecanismo de ação não clássico, promover o aumento da captação de cálcio no tecido testicular e a despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn, que não expressam iAR. Assim, comprovamos que os efeitos não-clássicos desencadeados pelos andrógenos são mediados por um receptor estruturalmente distinto do iAR, ainda não identificado, localizado na membrana da célula de Sertoli ou próximo a ela.

A ligação dos andrógenos ao mAR promove a ativação da enzima PLC que promove a hidrólise do fosfolípido de membrana PIP<sub>2</sub>, em IP<sub>3</sub> e DAG. Com a redução dos níveis de PIP<sub>2</sub> junto à membrana os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> fecham-se, provocando a despolarização da célula, a



abertura de VDCC-L e influxo do íon cálcio elevando sua concentração intracelular (DE CASTRO et al., 2013; LOSS et al., 2004; SMITH; WALKER, 2014; VON LEDEBUR et al., 2002).

A presença de um mAR na célula de Sertoli poderia justificar a elevada concentração intratesticular de andrógenos no período fetal e neonatal, quando não há expressão de iAR nesta célula. Neste caso, a célula de Sertoli não passaria por um período de insensibilidade aos andrógenos como se pensava, mas sim por um período em que responde exclusivamente através da via não-clássica.

Mais estudos são necessários para a compreensão dos efeitos celulares promovidos pela ação não-clássica dos andrógenos na célula de Sertoli. Ao menos no período neonatal, é possível que estejam envolvidos na manutenção da imaturidade sexual, processo complexo, possivelmente promovido por um conjunto de fatores.

A escolha pela realização de experimentos com túbulos seminíferos inteiros, e não de células de Sertoli isoladas, deve-se à complexidade estrutural do tecido testicular. Assim, foi priorizada a preservação da integridade funcional das células testiculares, mantendo o ambiente tubular tão próximo quanto possível das suas condições fisiológicas (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011). O conhecimento da média do potencial de repouso das células de Sertoli ( $-44 \text{ mV} \pm 0,5$  com uma variação de  $-35 \text{ mV}$  a  $-60 \text{ mV}$ ;  $n = 48$ ; ratos de 12 a 15 dias) e a utilização de pontas com resistência entre 15-25  $\text{M}\Omega$ , adequadas ao empalamento de células de Sertoli nos assegura o seu empalamento em detrimento dos demais tipos celulares presentes no tecido. Contudo, a interação observada entre as ações dos andrógenos e do FSH comprova que a resposta não-clássica gerada pelos andrógenos é o resultado de que está sendo realizado o registro de uma célula de Sertoli, visto que, são as únicas células testiculares que expressam FSHR.

O FSH produz um efeito bifásico sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli: uma hiperpolarização imediata (em segundos) seguida de despolarização mais prolongada (aproximadamente 6 minutos) (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011; WASSERMANN et al., 1992) A aplicação tópica de T, 30 segundos após a aplicação do FSH, resultou em uma alteração da resposta eletrofisiológica desencadeada pelos hormônios (Figura 27). A aplicação ocorreu durante a fase hiperpolarizante do FSH e a aplicação da T, além de impedir a despolarização geralmente desencadeada pelo FSH, resultou em um

aumento da fase hiperpolarizante. Entretanto, não houve alteração da resistência gerada pela interação entre as respostas do FSH e T, comparada com a gerada pelo efeito isolado do FSH, aos 180 segundos (Figuras 27-29). Trabalhos mostram que o FSH é capaz de inibir a fosforilação ERK desencadeada pelo efeito não clássico da T (CRÉPIEUX et al., 2001; SHUPE et al., 2011).

Como o efeito despolarizante do FSH e da T foi reduzido resolvemos observar a interação entre FSH e EpiT por um tempo maior. A aplicação de FSH seguida da aplicação de EpiT (30 segundos após) resultou em uma redução na resposta dos hormônios. A resistência não foi diferente da resistência gerada pela ação isolada do FSH, aos 240 segundos (ponto em que despolarização do FSH é significativa) (Figura 30-32). A interação entre os efeitos da T e EpiT com o FSH são semelhantes e provavelmente atuam através da mesma via. Os andrógenos e o FSH apresentam efeitos opostos sobre o  $K^+_{ATP}$ . Enquanto o FSH promove a abertura dos  $K^+_{ATP}$  (via AMPc), os andrógenos provocam seu fechamento (JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010; VON LEDEBUR et al., 2002).

No estudo realizado por Shupe et al. (2011) em células de Sertoli isoladas, a pré-incubação com FSH bloqueou a fosforilação ERK mediada pela T em 5 minutos e a manteve reduzida por 60 minutos. A aplicação de EpiT após 5 minutos da aplicação do FSH em células de Sertoli de túbulos semíferos resultou em um retardo na despolarização provocada pelos dois hormônios, sendo significativa somente aos 300 segundos, enquanto sua resposta à EpiT isolada ocorre já aos 120 segundos (Figura 33). A resistência da membrana da célula de Sertoli foi reduzida pela interação dos efeitos do FSH e da EpiT (Figura 34), aos 180 segundos (momento em que a despolarização da EpiT é significativa). A redução na resistência da membrana indica menor resistência ao fluxo de íons através da membrana em consequência da abertura de canais iônicos.

Em seus trabalhos, Shupe (2011) e Crépieux (2001) avaliaram a interação entre a ação não clássica da T, via fosforilação da ERK, e o FSH. No presente estudo foi avaliado a interação entre a ação não-clássica dos andrógenos, resultando no influxo de cálcio, com o FSH. As duas vias de sinalização não clássica dos andrógenos parecem ser mediadas por diferentes receptores. Enquanto a via que resulta na fosforilação da ERK parece ser mediada pelo iAR, o influxo de cálcio é decorrente da ligação dos andrógenos ao mAR, conforme discutido anteriormente (CRÉPIEUX et al., 2001; SHUPE et al., 2011). Isso explica o fato de

termos encontrado uma redução na resposta da T e EpiT - FSH, quando os trabalhos citados observaram o bloqueio da resposta. Pesquisas adicionais são necessários para o entendimento da interação entre os efeitos dos andrógenos e FSH, assim como de seus efeitos na célula.

## 9 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- As células de Sertoli de ratos *Wistar* no 4º e 5º dpn não expressam iAR.
- T e EpiT estimulam a captação de cálcio em testículos de ratos no 4º dpn e a T produz um efeito rápido despolarizante sobre a membrana de células de Sertoli no 5º dpn. Esse efeito não clássico produzido pelos andrógenos poderia ser mediado por um receptor estruturalmente distinto do iAR, localizado na membrana celular ou próximo a ela.
- A interação entre os efeitos do FSH e andrógenos sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 14º dpn: resulta na redução da resposta despolarizante desencadeada pelos hormônios; e confirma que as respostas eletrofisiológicas observadas são resultado do empalamento de uma célula de Sertoli.

## 10 REFERÊNCIAS

AL-ATTAR, L. et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 6, p. 1335–43, 15 set. 1997.

ALLARD, S. et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 15, p. 3349–60, ago. 2000.

BAARENDS, W. M. et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5614–22, 1 dez. 1995.

BELLEMARE, V. et al. Characterization of 17alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity (17alpha-HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone. **BMC biochemistry**, v. 6, p. 12, jan. 2005.

BENTEN, W. P. et al. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 1, p. 123–33, jan. 1999.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium--a life and death signal. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 645–8, 15 out. 1998.

BICÍKOVÁ, M.; HAMPL, R.; STÁRKA, L. Epitestosterone--a potent competitive inhibitor of C21-steroid side chain cleavage in the testis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 7, p. 721–4, dez. 1992.

BLAQUIER, J.; DORFMAN, R. I.; FORCHIELLI, E. Formation of epitestosterone by human blood and adrenal tissue. **Acta endocrinologica**, v. 54, n. 2, p. 208–14, fev. 1967.

BREMNER, W. J. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 1227–34, set. 1994.

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3722–31, set. 2003.

CAMPION, S. N. et al. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 38, p. 16–24, jul. 2013.

CAVALARI, F. C. et al. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: effects of nandrolone decanoate and catechin. **Steroids**, v. 77, n. 1-2, p. 118–25, jan. 2012.

CHEMES, H. E. et al. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 11, p. 4408–12, nov. 2008.

COUNIS, R. et al. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. **Reproduction, nutrition, development**, v. 45, n. 3, p. 243–54, 2005.

CRÉPIEUX, P. et al. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. **Oncogene**, v. 20, n. 34, p. 4696–709, 2 ago. 2001.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2005. p. 43–70.

DE CASTRO, A. L. et al. Epitestosterone and Testosterone have Similar Nonclassical Actions on Membrane of Sertoli Cells in Whole Seminiferous Tubules. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 45, n. 01, p. 15–21, 6 set. 2013.

DONOVAN, P. J.; DEMIGUEL, M. P. Gonocyte Development and Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2005. p. 417–435.

DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 1, p. 102–15, 1 fev. 1994.

FIX, C. et al. 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 of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 10919–24, 27 jul. 2004.

GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D. J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2052–9, 1 maio 1995.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 4, p. 411–6, ago. 1998.

GRISWOLD, M. D.; MCLEAN, D. The Sertoli Cell. In: NEILL, J. D. et al. (Eds.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 949–975.

HAVLÍKOVÁ, H. et al. Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 5, p. 2225–31, maio 2002.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 10, p. 2181–7, out. 2002.

HILL, M. et al. Analysis of relations between serum levels of epitestosterone, estradiol, testosterone, IGF-1 and prostatic specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia

and carcinoma of the prostate. **Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 49 Suppl 1, p. S113–8, jan. 2000.

JACOBUS, A. P.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G. F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of Ca entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. **Frontiers in physiology**, v. 1, p. 138, 21 jan. 2010.

LAPCIK, O. et al. The effect of epitestosterone on gonadotrophin synthesis and secretion. **The Journal of endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 353–8, nov. 1994.

LEE, V. W. et al. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of reproduction and fertility**, v. 42, n. 1, p. 121–6, jan. 1975.

LEITE, L. et al. 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.

LIAO, R. S. et al. **Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation** *Translational Andrology and Urology*, 10 out. 2013. Disponível em: <<http://www.amepc.org/tau/article/view/2759/3631>>. Acesso em: 4 mar. 2014

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, 11 mar. 1994.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 46–56, jan. 2003.

LOSS, E. S. et al. Testosterone modulates  $\text{K}^{+}$ ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP<sub>2</sub> pathway. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 36, n. 8, p. 519–25, ago. 2004.

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 sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 577–83, 10 out. 2011.

MAJDIC, G.; MILLAR, M. R.; SAUNDERS, P. T. K. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. **Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 285–293, 1 nov. 1995.

MATSUMOTO, T. et al. Androgen receptor functions in male and female physiology. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 3-5, p. 236–41, abr. 2008.

MCGUINNESS, M. P.; ORTH, J. M. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. **The Anatomical record**, v. 233, n. 4, p. 527–37, ago. 1992.

MCLACHLAN, R. I. et al. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **The Journal of endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 1–9, jan. 1996.

MEANS, A. R. et al. Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone. **Annual review of physiology**, v. 42, p. 59–70, jan. 1980.

MONSALVE, A.; BLAQUIER, J. A. Partial characterization of epididymal 5 alpha reductase in the rat. **Steroids**, v. 30, n. 1, p. 41–51, jul. 1977.

NEF, S. Hormones in male sexual development. **Genes & Development**, v. 14, n. 24, p. 3075–3086, 15 dez. 2000.

NOVI, A. M.; SABA, P. An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)**, v. 86, n. 3, p. 313–26, jan. 1968.

NUCK, B. A.; LUCKY, A. W. Epitestosterone: a potential new antiandrogen. **The Journal of investigative dermatology**, v. 89, n. 2, p. 209–11, ago. 1987.

O'DONNELL, L. et al. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 1017–1069.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; MONTEIRO, A.; ABEL, M. Testicular development in mice lacking receptors for follicle stimulating hormone and androgen. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35136, jan. 2012.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the Rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Academic Press, 2006.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, n. 8, p. 934–45, nov. 2009.

RAMOS, A. S.; DYM, M. Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. **Biology of reproduction**, v. 21, n. 4, p. 909–22, nov. 1979.

REY, R. The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? **Histology and histopathology**, v. 9, n. 1999, p. 991–1000, 1999.

REY, R. A. et al. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 72, n. 11, p. 787–95, nov. 2009.

RHODEN, E. L. R. AND C. R. Eutanásia em animais de laboratório. In: **Princípios e técnicas na experimentação animal**. Editora da ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 55–58.

ROMMERTS, F. F. et al. Calcium confusion--is the variability in calcium response by Sertoli cells to specific hormones meaningful or simply redundant? **The Journal of endocrinology**, v. 167, n. 1, p. 1–5, out. 2000.



SANDERS, B. K. Sex, drugs and sports: prostaglandins, epitestosterone and sexual development. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 4, p. 829–35, jan. 2007.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 125, n. 6, p. 769–84, jun. 2003.

SHARPE, R. M. Sertoli Cell Endocrinology and Signal Transduction: Androgen Regulation. In: SKINNER, M. K. et al. (Eds.). **Sertoli Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 171–197.

SHUPE, J. et al. Regulation of Sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 25, n. 2, p. 238–52, fev. 2011.

SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 147, n. 3, p. 425–33, set. 2002.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 6, p. 739–73, dez. 1997.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. **Seminars in cell & developmental biology**, 2 mar. 2014.

STÁRKA, L. Epitestosterone--a hormone or not. **Endocrine regulations**, v. 27, n. 2, p. 43–8, jun. 1993.

STÁRKA, L. et al. [Epitestosterone as an endogenous antiandrogen in men]. **Vnitřní lékařství**, v. 42, n. 9, p. 620–3, set. 1996.

STÁRKA, L. et al. Epitestosterone in human blood and prostatic tissue. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies**, v. 35, n. 6, p. 469–73, jun. 1997.

STÁRKA, L. Epitestosterone. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 87, n. 1, p. 27–34, out. 2003.

SUMMERVILLE, J. W.; SCHWARTZ, N. B. Suppression of serum gonadotropin levels by testosterone and porcine follicular fluid in castrate male rats. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1442–7, 1 nov. 1981.

TAPANAINEN, J. et al. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 5, p. 1027–35, dez. 1984.

THOMAS, P. et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–32, fev. 2005.

- TSAI, M.-Y. et al. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 18975–80, 12 dez. 2006.
- VICENCIO, J. M. et al. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1386–95, mar. 2006.
- VON LEDEBUR, E. I. C. F. et al. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP channels. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 34, n. 10, p. 550–5, out. 2002.
- WALKER, W. H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids**, v. 74, n. 7, p. 602–7, jul. 2009.
- WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1557–69, 27 maio 2010.
- WASSERMANN, G. F. et al. FSH-induced rapid hyperpolarisation followed by a Ca<sup>2+</sup> channel-mediated depolarisation in rat Sertoli cells. **Med. Sci. Res**, v. 18, p. 175–176, 1990.
- WASSERMANN, G. F. et al. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 24, n. 6, p. 276–9, jun. 1992.
- WASSERMANN, G. F. et al. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 24, n. 7, p. 326–8, jul. 1992.
- WEBER, M. A. et al. Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. **Andrologia**, v. 34, n. 1, p. 41–54, fev. 2002.
- WILKINSON, J. M.; HALLEY, S.; TOWERS, P. A. Comparison of male reproductive parameters in three rat strains: Dark Agouti, Sprague-Dawley and Wistar. **Laboratory animals**, v. 34, n. 1, p. 70–5, jan. 2000.
- WILLEMS, A. et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. **PLoS one**, v. 5, n. 11, p. e14168, jan. 2010.
- WILSON, J.; GEORGE, F.; GRIFFIN, J. The hormonal control of sexual development. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1278–1284, 20 mar. 1981.
- WILSON, V. S. et al. Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague-Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. **Toxicology letters**, v. 170, n. 3, p. 177–84, 15 maio 2007.

YOU, L.; SAR, M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. **Endocrine**, v. 9, n. 3, p. 253–61, dez. 1998.