

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

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

**AÇÃO DE ANDRÓGENOS E CATEQUINA SOBRE O POTENCIAL  
DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR  
IMATUROS.**

**FERNANDA CARVALHO CAVALARI**

ORIENTADORA

PROFa. DRa. ELOÍSA DA SILVEIRA LOSS

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

Dedico este trabalho ao meu filho Arthur Cavalari Appel e ao meu marido Leonardo Arthur Huppel Appel com todo amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, força energizante que me faz continuar todos os dias.

À minha orientadora Eloisa Loss pela oportunidade, dedicação e por ter sempre me ajudado e me tranquilizado durante esta jornada.

À professora Ana Paula Jacobus por todo incentivo e ajuda.

Ao Professor Wassermann por fornecer a estrutura física e profissional que possibilitou com que este trabalho fosse realizado.

Ao Professor Marcelo Grillo, que me ensinou muito e ajudou em todos os momentos.

À Dona Elsa e Alice pelos momentos agradáveis.

Ao colega e amigo Alexandre pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos colegas e amigos de laboratório Chris, Bianca, Gustavo, Marcelli e Laura que proporcionaram momentos de alegria, companheirismo e ajuda nos experimentos.

À amiga Lauren, Márcia e ao amigo Jéferson pela amizade e excelente convívio diário de trabalho.

Aos meus pais e minhas irmãs por tudo.

## SUMÁRIO

<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS:</u></b> .....	7
<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b> .....	9
<b><u>LISTA DE TABELAS</u></b> .....	11
<b><u>RESUMO</u></b> .....	12
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	13
<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	14
1.1. <u>GONADAS MASCULINAS</u> .....	16
1.2. <u>ESPERMATOGÊNESE</u> .....	16
1.2.1 <u>CONTROLE HORMONAL DA ESPERMATOGÊNESE</u> .....	18
<b><u>1.3. CÉLULAS DE SERTOLI</u></b> .....	19
1.3.1. <u>MORFOLOGIA</u> .....	19
1.3.2. <u>CONTROLE HORMONAL DA CÉLULA DE SERTOLI</u> .....	20
1.3.3. <u>SÍNTESE DE HORMÔNIOS GONADOTRÓFICOS</u> .....	21
<b><u>1.4. TESTOSTERONA</u></b> .....	22
<b><u>1.5. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA</u></b> .....	23
1.5.1. <u>AÇÃO CLÁSSICA DA TESTOSTERONA NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	23
1.5.2. <u>AÇÃO NÃO- CLÁSSICA DA TESTOSTERONA</u> .....	25
1.5.3. <u>AÇÃO NÃO- CLÁSSICA DA TESTOSTERONA NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	27
<b><u>1.6. NANDROLONA</u></b> .....	30
1.6.1. <u>USO TERAPEUTICO DA NANDROLONA</u> .....	30
1.6.2. <u>MECANISMO DE AÇÃO DA NANDROLONA</u> .....	31
<b><u>1.7. CATEQUINA</u></b> .....	33
<b><u>1.8. CANAL DE K<sup>+</sup> SENSÍVEL A ATP</u></b> .....	35
<b><u>1.9. OBJETIVOS</u></b> .....	39
1.9.1. <u>OBJETIVO GERAL</u> .....	39
1.9.2. <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u> .....	39
<b><u>2. MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	40
2.1. <u>MATERIAIS</u> .....	40

2.1.1.	<u>ANIMAIS</u> .....	40
2.1.2.	<u>SOLUÇÕES</u> .....	40
2.1.3.	<u>SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS</u> .....	42
<b>2.2.</b>	<b><u>MÉTODOS</u></b> .....	<b>46</b>
2.2.1.	<u>ELETROFISIOLOGIA</u> .....	46
2.2.2.	<u>PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS</u> .....	46
2.2.3.	<u>REGISTRO INTRACELULAR</u> .....	46
2.3.	<u>CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA</u> .....	47
2.4.	<u>CAPTAÇÃO DE <math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math></u> .....	48
2.5.	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u> .....	49
<b>2.6.</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>51</b>
2.7.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA TESTOSTERONA (1<math>\mu\text{M}</math>) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI E APÓS PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1<math>\mu\text{M}</math>)</u> .....	<b>51</b>
2.8.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA NANDROLONA EM DIFERENTES DOSES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	<b>52</b>
2.9.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA CATEQUINA EM DIFERENTES DOSES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	<b>53</b>
2.10.	<u>COMPARAÇÃO DA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DOS HORMÔNIOS NANDROLONA, TESTOSTERO E DO FALVONÓIDE CATEQUINA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	<b>54</b>
3.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA NANDROLONA (1<math>\mu\text{M}</math>) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI E APÓS PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1<math>\mu\text{M}</math>)</u> .....	<b>55</b>
3.1.	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA CATEQUINA (1<math>\mu\text{M}</math>) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI E APÓS PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1<math>\mu\text{M}</math>)</u> .....	<b>56</b>
3.2.	<u>COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI ENTRE REPOUSO E APÓS APLICAÇÃO DE TESTOSTERONA (1<math>\mu\text{M}</math>) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1<math>\mu\text{M}</math>) AOS 180 SEGUNDOS</u> .....	<b>57</b>
3.3.	<u>COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI ENTRE REPOUSO E APÓS APLICAÇÃO DE NANDROLOONA (1<math>\mu\text{M}</math>) AOS 180 SEGUNDOS</u> .....	<b>58</b>
3.4.	<u>COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI ENTRE REPOUSO E APÓS APLICAÇÃO DE CATEQUINA (1<math>\mu\text{M}</math>) AOS 180 SEGUNDOS</u> .....	<b>59</b>
3.5.	<u>COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI ENTRE REPOUSO E APÓS APLICAÇÃO DE NANDROLONA (1<math>\mu\text{M}</math>) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1<math>\mu\text{M}</math>) AOS 180 SEGUNDOS</u> .....	<b>60</b>

<u>3.6.</u>	<u>COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI ENTRE REPOUSO E APÓS APLICAÇÃO DE CATEQUINA (1µM) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA (1µM) AOS 180 SEGUNDOS</u> .....	<b>61</b>
<u>3.7.</u>	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA CATEQUINA (1µM) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI E APÓS PERFUSÃO DE DIAZOXIDA(100µM)</u> .....	<b>62</b>
<u>3.8.</u>	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA NANDROLONA (1µM) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI COM PERFUSÃO DE DIAZOXIDA (100µM)</u> .....	<b>63</b>
<u>3.9.</u>	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA CATEQUINA (1µM) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI COM PERFUSÃO DE U73122 (2µM)</u> .....	<b>64</b>
<u>3.10.</u>	<u>AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA NANDROLONA (1µM) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA NAS CÉLULAS DE SERTOLI COM PERFUSÃO DE U73122 (2µM)</u> .....	<b>65</b>
<u>4.</u>	<u>ESTÍMULO DA NANDROLONA NA CAPTAÇÃO DE <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> .....	<b>66</b>
<u>4.1.</u>	<u>ESTÍMULO DA CATEQUINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> NAS CÉLULAS DE SERTOLI</u> ..	<b>67</b>
<u>4.2.</u>	<u><b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b></u> .....	<b>68</b>
<u>4.3.</u>	<u><b>CONCLUSÕES</b></u> .....	<b>79</b>
<u>4.4.</u>	<u><b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b></u> .....	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS:

$\alpha$ : alfa  
 $\beta$ : beta  
 $\Omega$ : Ohm  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar  
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio marcado radiotivamente  
ABC: Proteínas cassete  
ADP: Adenosina Difosfato  
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica  
ATP: Adenosina Trifosfato  
 $\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio  
CCDV: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem  
CRH: Hormônio liberador de corticotrofina  
C-terminal: Terminal Carboxila  
DAG: Diacilglicerol  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EGF : fator de crescimento epidermal  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
GPCR: Receptor acoplado à proteína G  
Hz: Hertz  
I: Corrente  
IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I  
 $\text{IP}_3$ : Inositol-3,4,5-Trifosfato  
 $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ : Canais de Potássio Sensíveis a ATP  
KCl: Cloreto de Potássio  
KRb: Solução de Krebs  
LH: Hormônio Luteinizante  
LHRH: Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante  
 $\text{M}\Omega$ : Megaohms  
M: Molar  
 $\text{M}_1$ : Região Transmembrana 1  
 $\text{M}_2$ : Região Transmembrana 2  
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno  
MgADP: Magnésio ligado à Adenosina Difosfato  
mL: Mililitros  
mM: Milimolar  
ms: Milissegundos  
mV: Milivolts  
nA: Nanoampére  
ng/mL: nanogramas por mililitro  
N-terminal: Terminal Amino  
pH: Potencial de Hidrogênios  
PI: Fosfatidil Inositol  
 $\text{PI}_3\text{K}$ : Fosfatidil Inositol-3-quinase  
PIP: Fosfatidil Inositol-4-Fosfato  
 $\text{PIP}_2$ : Fosfatidil Inositol-4,5-Bisfosfato  
 $\text{PIP}_3$ : Fosfatidil Inositol-3,4,5-Trifosfato  
PKC: Proteína cinase C

PLC: Fosfolipase C  
SRC: cinase de SRC  
TRH : Hormônio liberador de tireotrofina  
V: Volts

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DA LOCALIZAÇÃO DO TÚBULOS SEMINÍFEROS NO TESTÍCULO E DAS CÉLULAS DE SERTOLI NOS TÚBULOS

**FIGURA 1.1:** REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DO PROCESSO DE ESPERMATOGÊNESE.

**FIGURA 1.2:** REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DA VIA CLÁSSICA DE SINALIZAÇÃO DA TESTOSTERONA

**FIGURA 1.3:** REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO CANAL DE  $K^+_{ATP}$ .

**FIGURA 1.4:** IMUNO-HISTOQUÍMICA MOSTRANDO SUBUNIDADES DO CANAL DE  $K^+_{ATP}$  EM TESTÍCULOS DE RATOS.

**FIGURA 1.5:** ESTRUTURA MOLECULAR DA TESTOSTERONA

**FIGURA 1.6:** ESTRUTURA MOLECULAR DA NANDROLONA

**FIGURA 1.7:** ESTRUTURA MOLECULAR DA CATEQUINA

**FIGURA 1.8:** ESTRUTURA MOLECULAR DA FLUTAMIDA

**FIGURA 1.9:** ESTRUTURA MOLECULAR DE U73122

**FIGURA 1.10:** ESTRUTURA MOLECULAR DA DIAZOXIDA

**FIGURA 2:** A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE ELETROFISIOLOGIA NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS. B) REPRESENTAÇÃO DE UM REGISTRO DE CONTROLE EM CÉLULA DE SERTOLI.

**FIGURA 2.1:** AÇÃO DA TESTOSTERONA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA.

**FIGURA 2.2:** AÇÃO DA NANDROLONA EM DIFERENTES DOSES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.3:** AÇÃO DA CATEQUINA EM DIFERENTES DOSES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.4:** AÇÃO DA TESTOSTERONA ( $1\mu\text{M}$ ), CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) E NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.5:** AÇÃO DA NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.6:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.7:** AÇÃO DA TESTOSTERONA COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.8:** AÇÃO DA NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.9:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 2.10:** AÇÃO DA NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE FLUTAMIDA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.1:** AÇÃO DA NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE DIAZOXIDA ( $100\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.2:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE DIAZOXIDA ( $100\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.3:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE U73122 ( $2\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.4:** AÇÃO DA NANDROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) COM PERFUSÃO DE U73122 ( $2\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.5:** AÇÃO DA CATEQUINA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.6:** AÇÃO DA NADROLONA ( $1\mu\text{M}$ ) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.

**FIGURA 3.7:** EFEITO DE PIP2 EM CANAIS DE  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ .

**FIGURA 3.8:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DA TESTOSTERONA NA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI.

## **LISTA DE TABELAS**

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

## RESUMO

A testosterona é um hormônio esteróide androgênico responsável pelas características masculinas, com importante função na fisiologia testicular. A nandrolona é um esteróide sintético derivado da testosterona, com ação anabólica e androgênica. A catequina é um flavonóide encontrado em frutas e chás, que possui efeito antioxidante, anticarcinogênico e antienvhecimento no organismo. Estudos mostram um possível mecanismo de ação destes esteróides e do flavonóide como agonistas do receptor androgênico de membrana.

**Objetivo:** Verificar a ação não-clássica de andrógenos (testosterona, nandrolona) e catequina nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos.

**Materiais e Métodos:** Eletrofisiologia: O potencial de membrana foi registrado utilizando túbulos seminíferos isolados de testículos de ratos Wistar machos de 15 dias de idade. O registro intracelular da célula de Sertoli foi realizado utilizando microcapilares preenchidos com KCl 3mmol/L acoplados a um eletrômetro. Foi realizada a aplicação tópica do esteróide testosterona (1 $\mu$ M), nandrolona (0.1, 0.5 e 1  $\mu$ M) e do flavonóide catequina (0.1, 0.5 e 1,  $\mu$ M) isoladamente e também após a perfusão com a flutamida (1 $\mu$ M), diazoxida (100  $\mu$ M) e U73122 (1  $\mu$ M). Captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ : Os testículos (n=5) foram pré incubados em KRb com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por 60 minutos para equilibrar o meio intra e extra-celular de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  após o equilíbrio, as gônadas foram incubadas por 5 minutos em KRb com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com ou sem nandrolona (1 $\mu$ M) ou catequina. Os resultados foram dados como média  $\pm$  SEM. Os dados da variação do potencial de membrana foram analisados pelo teste T *student* e ANOVA para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

**Resultados:** A testosterona (1 $\mu$ M) produziu uma resposta despolarizante sobre o potencial de membrana (PM) alterando de  $-44,62 \pm 0,53\text{mV}$  para  $-41,41 \pm 0,81^* \text{mV}$ , aos 120 segundos após a sua aplicação (\* $p < 0,05$ ) (n=9 células de Sertoli). Esta resposta despolarizante foi observada mesmo após a perfusão com flutamida (1 $\mu$ M). A catequina (1 $\mu$ M) causou uma resposta de despolarização semelhante à da testosterona, alterando o PM de  $-40,20 \pm 0,51 \text{mV}$  para  $-35,62 \pm 1,07\text{mV}$ , aos 120 segundos após a sua aplicação (\* $p < 0,001$ ) (n=9 células de Sertoli). A nandrolona (1 $\mu$ M) provocou uma despolarização alterando o PM de  $-38,20 \pm 0,71$  para  $-33,42 \pm 0,63$  \* $p < 0,05$ . A resposta da catequina e de nandrolona foi observada em diferentes doses e mesmo após a perfusão com flutamida (1 $\mu$ M), diazoxida (100 $\mu$ M) e U73122 (2 $\mu$ M) anularam o efeito de nandrolona (1 $\mu$ M) e catequina (1 $\mu$ M). A nandrolona e catequina produziram aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em 5 minutos de incubação em testículos de ratos imaturos.

**Conclusão:** Os andrógenos testosterona, nandrolona e o flavonóide catequina apresentam uma ação despolarizante sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos Wistar, observada mesmo após o bloqueio do receptor de andrógenos intracelular (flutamida). A perfusão com U73122(bloqueador de PLC) e a perfusão com diazoxida (agonista do canal de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ) anulou o efeito de nandrolona e catequina, indicando a participação da PLC e de canais de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  na resposta despolarizante observada. Estes resultados indicam que nandrolona e catequina atuam em um receptor de andrógenos de membrana, assim como a testosterona, agindo através de uma via não-clássica sobre as células de Sertoli de testículos de ratos.

## ABSTRACT

Testosterone is an androgenic steroid hormone responsible for male characteristics, with an important role in testicular physiology. The synthetic steroid nandrolone is an anabolic and androgenic derivative of testosterone, Catechin is a flavonoid found in fruits and teas, which have antioxidant, anticarcinogenic and anti-aging effects in the body. Studies show a possible mechanism of action of these steroids and flavonoid as agonists of the androgen receptor membrane.

**Objective:** The aim of this work is to investigate the non-classical effect of androgens (testosterone, nandrolone) and catechin in Sertoli cells from immature rats.

**Materials and Methods:** Electrophysiological experiments: The membrane potential was recorded using isolated seminiferous tubules of testes of rats 15 days old. The intracellular recording of Sertoli cell was performed using microcapillary filled with KCl 3mmol/L coupled to an electrometer. We performed a topical application of testosterone (1 $\mu$ M), nandrolone (0.1, 0.5 and 1 $\mu$ M) and the flavonoid catechin (0.1, 0.5 and 1 $\mu$ M) alone and also after infusion with flutamide (1 $\mu$ M), diazoxide (100 $\mu$ M) or U73122 (1 $\mu$ M). <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake : The testes (n=5 in each group) are pre-incubated in KRb with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (2.7kBq/sample) for 60 min in a Dubnoff metabolic incubator to equilibrate intra- and extracellular <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> levels until they reached a plateau. Following equilibration, the gonads were incubated for 5 min in KRb with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, with or without nandrolone (1  $\mu$ M) or catechin. The results were given as mean  $\pm$  SEM. The data of the change in membrane potential were analyzed by ANOVA for repeated measures with Bonferroni post-test.

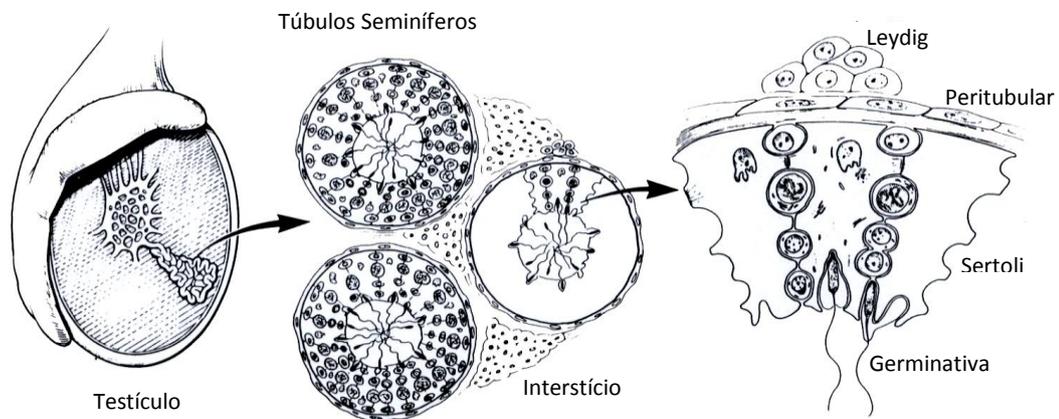
**Results:** Testosterone (1 $\mu$ M) produced a depolarizing response in the membrane potential (MP) by changing from  $-44.62 \pm 0.53$  mV to  $-41.41 \pm 0.81$  mV \*, at 120 seconds after application (\* p <0.05) (n = 9 Sertoli cells.) This depolarizing response was observed even after perfusion with flutamide (1 $\mu$ M). Catechin (1  $\mu$  M) showed a similar response to depolarization of testosterone, changing the PM of  $-40.20 \pm 0.51$  mV to  $-35.62 \pm 1.07$  mV at 120 seconds after application (\* p <0.001) (n = 9 Sertoli cells) after its application. The nandrolone (1 $\mu$ M) showed a depolarization of the PM changing  $-38.20 \pm 0.71$  to  $-33.42 \pm 0.63$  \* p <0.05. The response of catechin and nandrolone was observed at different doses and even after perfusion with flutamide (1 $\mu$ M). diazoxide (100 $\mu$ M) and U73122 (2 $\mu$ M) nullified the effect of nandrolone (1 $\mu$ M) and catechin (1 $\mu$ M). Nandrolone and catechin increase <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake within 5 minutes of incubation with immature testes.

**Conclusion:** The androgen testosterone, nandrolone and flavonoid catechin have a depolarizing action on the membrane potential of Sertoli cells from immature rats, observed even after the blockade of intracellular androgen receptor. The U73122 infusion and perfusion with diazoxide nullified the effect of nandrolone and catechin, indicating the involvement of PLC and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels in depolarizing response observed. These results indicate that nandrolone and catechin act on an androgen membrane receptor, as well as testosterone through a non-classical pathway on Sertoli cells from rat testes.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. GÔNADAS MASCULINAS**

Os testículos são órgãos compostos por um enovelado de túbulos seminíferos que estão envoltos por uma membrana chamada de túnica albugínea, e estas estruturas estão localizadas no saco escrotal. Os testículos são responsáveis pela síntese dos hormônios sexuais masculinos e pela espermatogênese, a qual se refere ao desenvolvimento dos espermatozóides. Os espermatozóides formados a partir das células germinativas indiferenciadas dentro dos túbulos seminíferos iniciam sua diferenciação da membrana basal até o lúmen dos túbulos seminíferos e depois de formados são conduzidos para o epidídimo, local de maturação do gameta masculino. Formando a parede dos túbulos seminíferos encontram-se células de Sertoli que fornecem um suporte estrutural e nutricional para o desenvolvimento das células germinativas. Nos túbulos, encontram-se também as células mióides peritubulares que estão em contato com a lâmina basal, próximo das espermatogônias e das células de Sertoli. As células mióides possuem atividade contrátil que facilita o movimento das células germinativas diferenciadas e auxiliam na sinalização parácrina dos túbulos seminíferos. No espaço intersticial que envolve estes túbulos encontram-se vasos sanguíneos, tecido linfático, grânulos lipídicos, macrófagos e células intersticiais de Leydig. As células de Leydig secretam andrógenos, os quais participam do controle da espermatogênese (Fig.1) (CHENG & MRUK, 2002; SKINNER, 1991; JOHNSON, 2008).



**FIGURA 1.:** Representação artística da localização dos túbulos seminíferos no testículo e das células de Sertoli nos túbulos (Adaptado de Skinner,1991)

A interação entre as células testiculares pode ser mediada por substâncias parácrinas, autócrinas e por contato intercelular direto mediado por junções comunicantes (*GAP junction*) onde a conexina é a proteína que possibilita este processo, pois forma um canal de abertura que sincroniza funcionalmente as células de Sertoli e as células germinativas (VERHOEVEN, 2010; POINTIS *et. al*, 2010). Outros tipos de junções são encontrados nas células de Sertoli, tais como: junções de ancoramento e as junções ocludentes, responsáveis pela formação da barreira hematotesticular. Também encontramos desmossomos e hemidesmossomos, que participam na comunicação entre as células de Sertoli e as células germinativas. (LUI *et al*. 2003). As junções ocludentes (*tight junctions*), muito importantes para o sucesso da espermatogênese, estão presentes

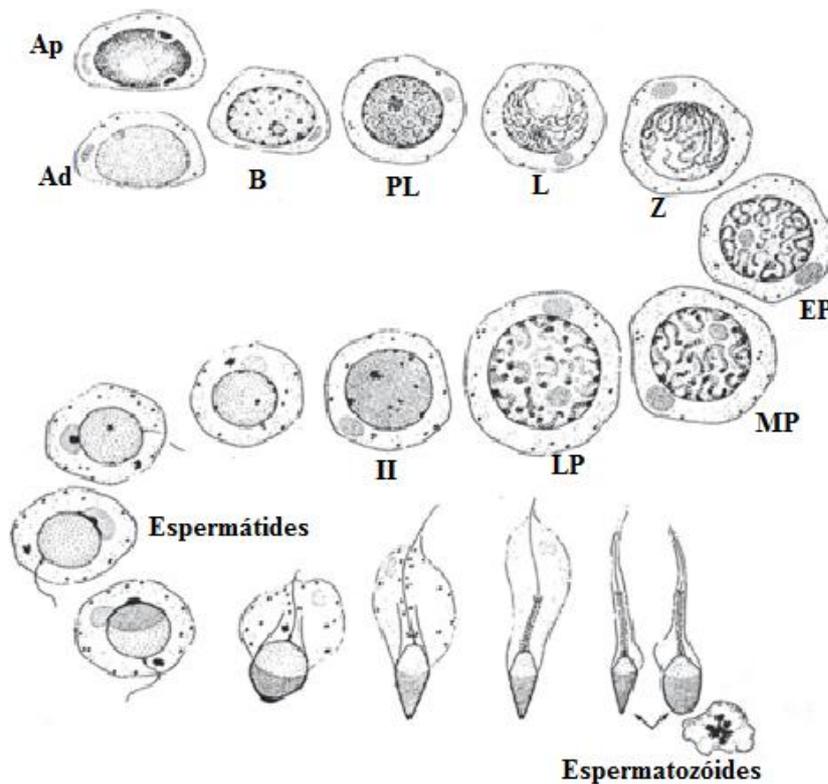
em todos os tipos de epitélio e endotélio dos mamíferos. Estas são encontradas geralmente na porção mais apical das células, porém, nas células de Sertoli elas se encontram adjacentes à membrana basal, ao lado de junções aderentes e desmossomos. As junções ocludentes formam a barreira hematotesticular entre o exterior e o interior do túbulo, o que garante um ambiente imunologicamente protegido para a progressão espermatogênica, por formarem uma barreira de seletividade ao fluxo transepitelial de moléculas e íons (POINTIS *et. al.*, 2010; CHENG & MRUK, 2002; LUI *et al.* 2003).

## **1.2. ESPERMATOGÊNESE**

A espermatogênese refere-se a um processo de várias etapas que ocorre nos túbulos seminíferos no qual as células germinativas sofrem maturação até se transformarem em espermatozóides (POINTIS *et. al.*, 2010). O desenvolvimento das células germinativas ocorre primeiramente na infância, período no qual as células se dividem até darem origem às espermatogônias. Durante a puberdade darão origem a espermatócitos que se dividem por meiose resultando em espermátides, as quais serão os futuros espermatozóides. A espermatogênese ocorre em ciclos repetidos no epitélio seminífero (ciclo espermiogênico) e se divide em três fases: renovação das células-tronco e proliferação das células germinativas, meiose e diferenciação, e espermiogênese (POINTIS *et. al.*, 2010; AMANN, 2008).

Na primeira fase, as células-tronco localizadas na membrana basal dos túbulos seminíferos se dividem formando as espermatogônias. Na segunda fase, as espermatogônias sofrem vários processos de divisão meiótica resultando em espermatogônias do tipo B, que se dividem para formar espermatócitos pré-leptotenos que se destacam da membrana basal, e por meiose geram as espermátides arredondadas

(Fig.1.1). A etapa final chamada de espermiogênese consiste na maturação dessas espermatídes, que por uma extensa diferenciação resultam nos espermatozóides, seguida do processo de espermição, que consiste na liberação dos espermatozóides para o lúmen tubular (WALKER, 2010; POINTIS *et. al.*, 2010).



**Figura 1.1:** Representação artística do processo de espermatogênese. A espermatogônia do tipo A sofre divisões meióticas para se tornar espermatogônia do tipo B, que então se divide e se diferencia em espermatócitos pré-lepotenos (PL), que logo se tornam leptotênicos (L), zigóteno (Z) e então em espermatócitos paquítenos (EP, MP, LP). Após a primeira divisão meiótica são formados os espermatócitos secundários (II) que, em seguida, dividem-se novamente, resultando em espermatídes haplóides. As espermatídes perdem seu citoplasma até se diferenciarem em espermatozóides maduros (Walker, 2010).

Em ratos, as primeiras divisões meióticas das espermatogônias encontradas nos túbulo seminíferos ocorrem a cada 12,9 dias e são divididas em 4 ciclos e meio necessários para a produção completa dos espermatozóides. As células germinativas em desenvolvimento estão cercadas por células somáticas de Sertoli, a qual se estende desde a membrana basal até o lúmen do túbulo. A barreira hematotesticular formada pelas junções ocludentes entre as células de Sertoli é muito importante para a espermatogênese pois cria uma barreira de seletividade a íons e a moléculas grandes entre o meio extratubular e o intratubular, tornando as células germinativas dependentes do aporte nutricional e de fatores de crescimento fornecidos pelas células de Sertoli. As células de Sertoli apoiam estruturalmente o desenvolvimento das células germinativas e este desenvolvimento depende da interação parácrina e endócrina que existe entre estas células (RUSSEL, 1993; JEGOU, 1993; WALKER & CHENG, 2005).

### **1.2.1 Controle hormonal da espermatogênese**

A espermatogênese é controlada por uma rede hierarquizada de sistemas de regulação, na qual os dois maiores sinais endócrinos que regulam a espermatogênese são o FSH e a testosterona (MCLACHLAN, 1996). O FSH se liga em seus receptores presentes na membrana das células de Sertoli, os quais são acoplados a uma proteína G. A ligação do hormônio FSH ao receptor ativa inúmeras vias de sinalização. (WALKER & CHENG, 2005). O FSH regula a função das células de Sertoli na manutenção da espermatogênese, porém ratos *knockout* para o receptor de FSH não são inférteis, mas apresentam um número reduzido de células germinativas (JOHNSON *et al.* 2008). O FSH age de modo sinérgico com a testosterona para que a espermatogênese e a

fertilização sejam mais eficientes, agindo na manutenção da maturação e sobrevivência dos espermatozóides (SHUPE, 2010). A testosterona é essencial para a espermatogênese, pois sem a presença de testosterona ou do receptor de andrógenos (AR) nas células de Sertoli a formação da barreira hematotesticular fica comprometida, e as células germinativas não se desenvolvem além da meiose. As células germinativas imaturas são deslocadas prematuramente a partir das células de Sertoli e o processo de espermição fica comprometido causando infertilidade (WALKER, 2003, MCLACHLAN, 1996).

### **1.3. CÉLULAS DE SERTOLI**

#### **1.3.1. Morfologia**

As células de Sertoli são células somáticas com estrutura colunar presentes nos túbulos seminíferos dos testículos, as quais se estendem da membrana basal até o lúmen tubular e interagem diretamente com as células germinativas (MRUK & CHENG, 2004; RUSSELL *et al*, 1990). A proliferação das células de Sertoli acontece em dois períodos, no período neonatal e no período pré-púbere (SHARPE *et al*, 2003). Em roedores, a proliferação das células de Sertoli só acontece entre os 15 e 20 dias após o nascimento, porém, sua maturação e diferenciação ocorrem durante a puberdade e essas células só param de se diferenciar na idade adulta (BAKER E O'SHAUGHNESSY, 2001; VERGOUWEN *et al*, 1993; JOHNSTON, 2004). A célula de Sertoli possui dois papéis fundamentais: na diferenciação sexual e na espermatogênese. As funções expressas por essa célula na vida adulta, após a maturação, são totalmente ausentes durante a vida

fetal. A maturação é caracterizada pela perda da capacidade proliferativa e pela formação da barreira hematotesticular (JEGOU, 1992; SHARPE *et al*, 2003; MCLAREN, 1998). Durante o desenvolvimento embrionário as células de Sertoli desempenham um papel fundamental na formação dos testículos. A testosterona, produzida pelas células de Leydig, também possui um papel importante, assim como o hormônio anti- Mülleriano, produzido por essas células, o qual promove a regressão dos ductos müllerianos e o desenvolvimento dos ductos de Wolf, responsáveis pelo desenvolvimento das gônadas masculinas. Na idade adulta, as células de Sertoli são totalmente comprometidas em sustentar a espermatogênese (BRENNAN E CAPEL, 2004; SHARPE *et al*, 2003). As células de Sertoli podem suportar apenas um número finito de células germinativas. Portanto, a produção de espermatozóides e o tamanho dos testículos no adulto são diretamente proporcionais ao número de células de Sertoli existentes nos testículos e dependem também da integridade funcional dessas células (ORTH *et al.*, 1988; PAPAIOANNOU M *et al.*, 2009).

### **1.3.2. Controle hormonal da célula de Sertoli**

A fertilidade e a espermatogênese dependem das células somáticas de Sertoli, pois o número dessas células determina a quantidade de espermatozóides produzidos em um dia. Portanto, é importante que o número correto de células de Sertoli seja originado e, para isso, vários hormônios são importantes nesta regulação, como o LH (hormônio luteinizante), o FSH (hormônio folículo estimulante), a testosterona, os hormônios da tireóide, o hormônio do crescimento e vários fatores de crescimento parácrinos (WALKER & CHENG 2005; ORTH *et al* ; SHARPE *et al*, 2003). Estudos em ratos mostram que os hormônios da tireóide podem ter efeito sobre o tamanho das células de

Sertoli, influenciando, portanto, na densidade do epitélio. Os hormônios da tireóide também podem alterar o período de proliferação através da regulação da maturação das células. Porém, ainda é uma incógnita como esse processo acontece (SHARPE *et al*, 2003). As células de Sertoli são fundamentalmente reguladas pelo FSH e pela testosterona, que agem em seus receptores nessas células mantendo a integridade e o tropismo do epitélio seminífero (VON LEDEBUR *et al.*, 2002; WALKER, 2003). O FSH vai atuar regulando a manutenção da espermatogênese pelas células de Sertoli (MCLACHLAN, 1996).

### **1.3.3. Síntese dos hormônios gonadotróficos**

Os hormônios importantes para a função testicular que controlam a síntese de andrógenos e a espermatogênese são o LH e o FSH. Esses hormônios são produzidos pela hipófise e estão sob controle do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado por células da área pré-óptica e do núcleo arqueado do hipotálamo. Esse hormônio é lançado na circulação porta-hipotalâmica-hipofisária, atinge a adeno-hipófise e então se liga em receptores nos gonadotrofos promovendo a síntese dos hormônios hipofisários LH e FSH. Os hormônios hipofisários são secretados na circulação e têm como alvo as gônadas. O LH atua nas células de Leydig promovendo a síntese de testosterona e o FSH atua nas células de Sertoli, aumentando a proliferação e auxiliando a espermatogênese (COUNIS *et al* , 2005). A liberação de GnRH acontece de forma pulsátil e este padrão pulsátil é regulado por variações que ocorrem durante a vida reprodutiva e pela retroalimentação de sinais provenientes das gônadas. Esta regulação do eixo reprodutivo ocorre através da modulação da amplitude e frequência dos pulsos de GnRH e é importante para evitar a dessensibilização dos receptores de LH

e FSH nas suas células-alvo. (MARSHALL *et al*, 1993; LEVINE *et al*, 2003). A retroalimentação acontece por hormônios como testosterona, inibina e ativina. A testosterona e a inibina formam uma alça de retroalimentação negativa, enquanto a ativina possui um efeito de retroalimentação positiva sobre os hormônios hipotalâmicos e hipofisários (PHILLIPS e DE KRETZER, 1998; OJEDA *et al*, 2006).

#### **1.4. TESTOSTERONA**

A testosterona é um hormônio esteróide produzido pelas células de Leydig, por estímulo do LH, e é lançado no espaço intersticial entre os túbulos seminíferos. Em seguida, se difunde para dentro dos túbulos onde vai ter uma ação parácrina. A concentração de testosterona nos testículos de humanos é de 340-2000 nM, ou seja, cerca de 25 a 125 vezes maior que a concentração encontrada no plasma que é de 8,7-35 nM (WALKER W, 2008; JAROW *et al.*, 2001). As células de Leydig são responsáveis pela produção principalmente de testosterona, androstenediona, 5-androstenodiol, diidrotestosterona e estradiol, em menores quantidades. A testosterona também pode ser obtida pela conversão nos tecidos periféricos da androstenediona sintetizada pelas gônadas e pela glândula adrenal. Nas mulheres, toda a testosterona circulante é derivada da conversão nos tecidos periféricos da androstenediona secretada pelo ovário e glândula adrenal. A testosterona é convertida em estradiol pela aromatase presente principalmente nas células de Leydig. A testosterona também é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5  $\alpha$ -redutase presente em tecidos que expressam esta enzima, como próstata e folículo pilo-sebáceo. A DHT é mais potente que a testosterona para a diferenciação sexual masculina (KRONENBERG *et al.*, 2008). Dois

terços da testosterona biodisponível se encontra dentro dos testículos, o restante é encontrado livre no plasma, ligado à albumina ou ligado à proteína de ligação de hormônio esteróide androgênico. Os altos níveis de testosterona intratesticular são maiores do que o necessário para que a espermatogênese ocorra com sucesso, pela regulação da expressão gênica via receptor intracelular de andrógeno (iAR), indicando que existem mecanismos alternativos da ação da testosterona (JAROW *et al* 2005; ZIRKIN *et al.* , 1989; TSAI & O'MALLEY, 1994). Nos testículos, a testosterona é o principal andrógeno encontrado e as células de Leydig, as células mióides peritubulares, as células germinativas do testículo maduro e as células de Sertoli apresentam o receptor de andrógeno (AR). Porém, acredita-se que as células germinativas não sejam o alvo direto da testosterona, mas sim as células de Sertoli que envolvem e nutrem as células germinativas (WALKER, 2010). A testosterona é necessária para vários fatores que contribuem para a espermatogênese, como na formação de conexões entre as células de Sertoli, na manutenção das conexões entre as células de Sertoli e as células germinativas e para a liberação dos espermatozóides a partir das células de Sertoli (LUI *et al.*, 2003; MRUK & CHENG 2004; WONG & CHENG 2005).

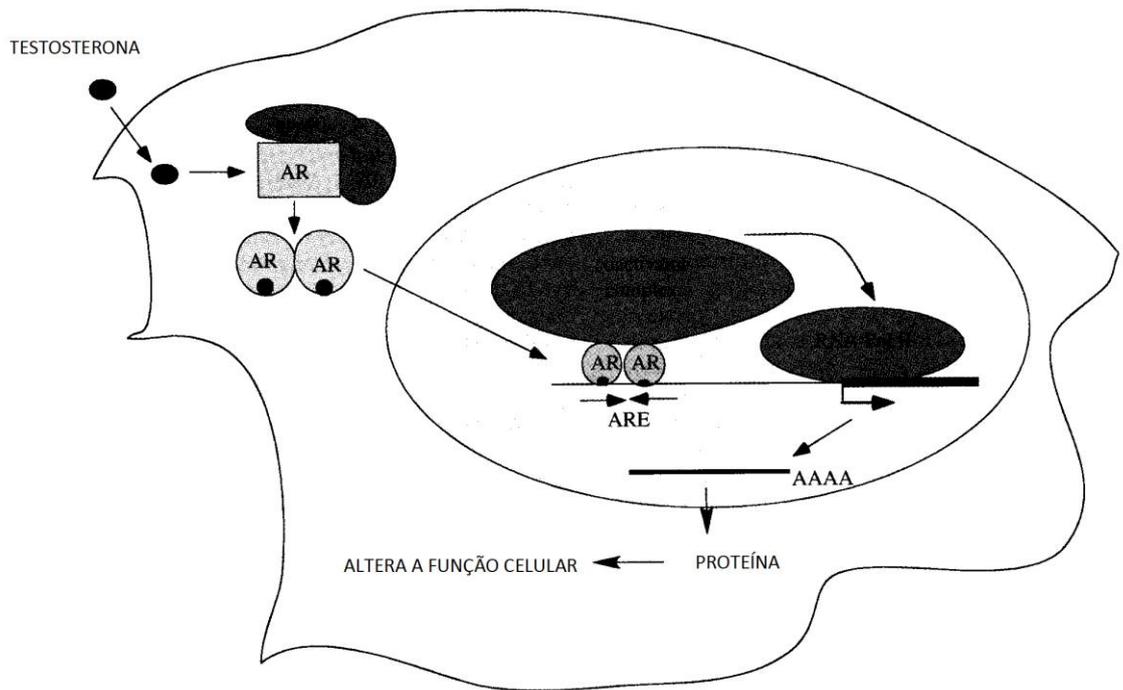
## **1.5. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA**

### **1.5.1. Ação clássica da testosterona**

O modelo clássico de mecanismo de ação genômico dos hormônios esteróides parte do pressuposto de que estes hormônios se difundem livremente pela membrana plasmática e se ligam em receptores presentes no interior da célula. A ligação do

hormônio com o receptor promove uma modificação que permite que o receptor seja liberado das proteínas de choque térmico. O complexo hormônio-receptor formado, um homodímero ou heterodímero, é translocado para o núcleo e se liga em regiões específicas no DNA chamados de elementos responsivos a andrógenos (ARE), causando ativação ou repressão da expressão gênica e posteriormente a síntese de proteínas (fig. 1.2). Esta via clássica demora cerca de 45 minutos para alterar a expressão de genes, podendo levar horas para ocorrer a síntese protéica (FORADORI *et al.* 2009; WALKER, 2008; WALKER, 2010).

A atuação da testosterona nas células de Sertoli através da via clássica é importante na manutenção da espermatogênese, pois, tanto a ausência de testosterona quanto do receptor intracelular de andrógenos (iAR) pode causar deficiência na produção de espermatozoides, causando infertilidade (WALKER 2008; SHUPE *et al.*, 2011). Várias etapas da espermatogênese dependem da ação da testosterona através do receptor intracelular de andrógeno. Estudos mostraram que a perda da expressão de iAR, ocasiona redução no número de espermátides, devido à perda do desenvolvimento e à diminuição da aderência das espermátides pelas células de Sertoli (HOLDCRAFT RW & BRAUN RE 2004; DE GENDT K *et al.* 2004). A depleção de testosterona causa falha na espermição, tanto em ratos como em humanos (CHANG *et al.* 2004; HAYWOOD M *et al.* 2003).



**Figura 1.2:** Representação artística da via clássica de sinalização da testosterona. A testosterona se difunde através da membrana plasmática e se liga ao receptor intracelular de andrógeno (AR). AR sofre uma alteração na conformação permitindo que ele seja liberado de proteínas de choque térmico no citoplasma. AR é então capaz de ser translocado para o núcleo onde se liga ao elemento responsivo a andrógenos (ARE) no DNA, permitindo o recrutamento de coativadores ou corepressores que alteram a função de genes para alterar a função celular (WALKER, 2010).

### 1.5.2. Ação Não-Clássica da testosterona

Várias evidências sugerem que a testosterona possa agir através de outros mecanismos, além da via clássica, em diversos tecidos, pois a testosterona é capaz de produzir respostas rápidas, em questão de segundos. A ação dos androgênios sobre o iAR, ou resposta clássica dos esteróides, não permite a compreensão de efeitos rápidos que os mesmos exercem em nível celular e que são incompatíveis com o tempo

necessário para a síntese protéica (WALKER 2003; KOENIG *et al.*, 1982; KUNZ, 2006). As hipóteses para explicar esta resposta não clássica da testosterona se referem a uma ação hormonal via um receptor de androgênios localizados na membrana celular. Estas respostas ativam vias de sinalização que também podem levar à transcrição gênica de forma independente da ligação ao receptor intracelular de andrógenos (WALKER, 2003; RAHMAN & CHRISTIAN, 2007).

O primeiro efeito não-clássico da testosterona foi descrito em 1979, em um estudo realizado em neurônios hipotalâmicos de ratos adultos, no qual a aplicação do hormônio provocou disparos destes neurônios em poucos segundos (YAMADA, 1979). Outros estudos realizados na hipófise de ratos mostraram que a testosterona provoca a liberação de prolactina em cinco minutos (CHRISTIAN, 2000).

A presença de um receptor de andrógenos na membrana plasmática (mAR) foi descrita por vários autores, através da identificação de sítios de ligação para andrógenos na superfície das células (HEINLEIN & CHANG 2002; BENTEN *et al.* 1999). Sítios de ligação para a testosterona foram observados na superfície de células T esplênicas através da técnica de fluorescência FITC a qual os situava na membrana plasmática (BENTEN *et al.* 1999).

Em osteoblastos, a testosterona aumenta rapidamente a concentração de  $[Ca^{2+}]_i$  tanto via canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, como via liberação de estoques intracelulares (LIEBERHERR & GROSSE, 1994).

Na linhagem de células de câncer de próstata LNCaP foi encontrado efeito semelhante de andrógenos sobre o  $[Ca^{2+}]_i$ , sendo este através de um receptor acoplado à proteína G (SUN *et al.*, 2006). Nestas células, foi demonstrada a existência de receptores de membrana para a testosterona não-internalizáveis. Este receptor não foi reconhecido por anticorpos do receptor clássico intracelular (KAMPA *et al.*, 2002). A

ativação destes receptores resulta na reorganização do citoesqueleto de actina e no aumento de antígeno específico de próstata. Além disso, também foi observado que a testosterona produz a fosforilação e a ativação da cinase de adesão focal (FAK) através dos receptores de membrana (PAPAKONSTANSTI *et al.*, 2003).

Em cardiomiócitos, a aplicação de testosterona aumenta o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mesmo que eles estejam isolados. Este aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é inibido pelo bloqueador da PLC (fosfolipase C) U73122, e PTX (toxina Pertussis) um bloqueador de Proteína G, indicando que este aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  está relacionado com a ativação de um receptor acoplado à proteína G (GPCR) que utiliza a via da PLC (MICHELS, *et al.*, 2006).

### **1.5.3. Ação não-clássica da testosterona nas células de Sertoli**

Numerosas evidências levantam a possibilidade de que a testosterona possa agir nas células de Sertoli através de mecanismos não-clássicos. Uma dessas evidências é que os níveis de testosterona intratesticular em ratos é de aproximadamente 70 nM, valores muito mais altos do que o necessário para as respostas clássicas de ligação no receptor intracelular de andrógeno (iAR), visto que as respostas associadas ao receptor intracelular saturam-se com uma concentração de cerca de 1nM de testosterona (ZIRKIN *et al.*, 1989; FORADORI *et al.*, 2008; WALKER, 2003). A testosterona é capaz de agir em receptores na membrana plasmática (mAR) das células de Sertoli, atuando através de vias de sinalização por ativação de cinases, levando a uma regulação na expressão gênica independente da presença do receptor de andrógeno intracelular

(AR) (WALKER, 2003; RAHMAN & CHRISTIAN, 2007; SHARPE, 1994; ZIRKIN *et al.*, 1989).

A testosterona é capaz de alterar a troca de íons e moléculas pelas junções GAP das células de Sertoli de ratos jovens, pois o tratamento com testosterona provocou um comprometimento no acoplamento intercelular destas células e esta interrupção foi sendo revertida à medida que foi retirado o tratamento com testosterona. O bloqueio com ciproterona (inibidor do receptor de andrógenos intracelular) não modificou o padrão de desacoplamento causado pela testosterona, indicando que a testosterona possui uma ação rápida e direta na modulação de canais na membrana e nas junções comunicantes, podendo mudar assim o estado funcional da célula (PLUCIENNIK *et al.*, 1996).

Experimentos realizados por FIX *et al.* (2004) com células de Sertoli isoladas de ratos, mostraram que a aplicação de concentrações fisiológicas de testosterona provocou um aumento na fosforilação de proteínas cinases e provocou um aumento de AMPc ativando o fator de transcrição CREB, além de um aumento na ativação da cascata ERK-MAPK. Essas ações não são explicadas pela ação genômica da testosterona, pois ocorreram de forma rápida, após cerca de 1 minuto, e foram sustentadas por 12 horas. Estes dados são relevantes, pois a fosforilação do CREB é essencial para que as células de Sertoli exerçam suas funções de suporte na espermatogênese. O bloqueio da fosforilação do CREB provocou apoptose das células germinativas impedindo a formação de espermatozóides (FIX *et al.*, 2004). Verificou-se que existe uma associação entre os receptores de andrógenos localizados na membrana e a ativação de Src cinase por estímulo da testosterona (FIX *et al.*, 2004). A ativação de Src cinase é necessária para a estimulação de ERK e MAPK. Para a ativação de ERK e MPAK, a Src ativa primeiramente o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) que então inicia a

cascata da MAPK (FIX *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2002; RAZANDI *et al.*, 2003).

Segundo Walker (2010), a adição de testosterona nas células de Sertoli, juntamente com o inibidor da cinase Src (PP2) e o inibidor da cinase ERK (PD98059), mostrou que a quantidade de células germinativas caíam abaixo dos valores basais, indicando que a testosterona aumenta a eficiência da fixação das células germinativas nas células de Sertoli, e que ambas as cinases Src e ERK, que são ativadas pela via não-clássica, são necessárias para facilitar a fixação das células germinativas (WALKER, 2010).

A aplicação de testosterona nas células de Sertoli é capaz de aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e este efeito ocorre em segundos após a aplicação do andrógeno, portanto não pode ser dependente da ativação genômica por ligação através do AR intracelular (LOSS *et al.*, 2004; LYNG *et al.*, 2000). A indução no aumento do influxo de cálcio é dependente da dose, pois, doses mais altas de testosterona sustentam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por um período maior de tempo. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi inibido por EGTA (quelante de Cálcio), e por verapamil, indicando que o tipo de canal de cálcio envolvido é o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L (GORCZYNSKA & HANDELSMAN, 1995; LEITE *et al.* 1999; LYNG *et al.*, 2000).

Experimentos em eletrofisiologia mostraram que a aplicação de testosterona em concentrações fisiológicas (0,1 a 0,25  $\mu\text{M}$ ) provoca uma despolarização da célula de Sertoli em segundos, sendo caracterizado por um efeito não-clássico (VON LEDEBUR *et al.*, 2002). Outros estudos verificaram que a ação da testosterona sobre as células de Sertoli é inibida pelo bloqueador da PLC (U73122) e pela PTX (toxina pertussis), um bloqueador de proteína G (LOSS *et al.*, 2004). Com estes dados acredita-se que a ação não-clássica da testosterona acontece pela ligação do hormônio a um suposto GPCR

(receptor acoplado à Proteína G) na membrana (WASSERMANN *et al.*, 2004; HEILEN *et al.*, 2002).

## **1.6. NANDROLONA**

A nandrolona ou decanoato de nandrolona (17,13-hydroxiestr- $\Delta$ -4 e -3-1) é um esteróide anabólico sintético derivado do hormônio natural testosterona, desenvolvido com o objetivo de minimizar os efeitos masculinizantes e melhorar os efeitos anabólicos de síntese protéica. A nandrolona é formada a partir da esterificação da posição  $\beta$ -C17 a partir da testosterona. Esta esterificação diminui seu efeito no metabolismo lipídico causando uma menor toxicidade ao fígado. A nandrolona é um esteróide administrado por injeção intramuscular e possui uma ação duradoura no organismo que permanece ativa por dias ou semanas (ISHAK & ZIMMERMAN, 1987; WISLON & GRIFFIN, 1980; WU, 1997)

### **1.6.1. Uso terapêutico da Nandrolona**

O tratamento com nandrolona apresenta uma ampla utilização para várias doenças crônicas, como câncer de mama, fraturas, recuperação pós-operatória, anemias por alterações da medula óssea, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), problemas hepáticos ou renais e queimaduras (BASARIA *et al.*, 2001; KICMAN, 2008; HOFFMAN & RATAMESS, 2006; EVA *et al.*, 2003; CONWAY *et al.*, 2000)

A nandrolona tem sido eficaz no tratamento do estado catabólico de pacientes com HIV (BUCHER *et al.*, 1996; GOLD *et al.*,1996). Estudos randomizados, em humanos adultos do sexo masculino com AIDS, mostraram que a nandrolona provocou um aumento médio no peso e qualidade de vida dos pacientes em relação ao grupo tratado com placebo e nos tratados com testosterona. Este estudo verificou que os efeitos da nandrolona são superiores ao da testosterona e ao placebo. Portanto, os efeitos anabólicos da nandrolona são bastante eficazes e superiores ao tratamento convencional feito pela utilização de testosterona (SARDAR *et al.*, 2010; GOLD *et al.*,2006).

Em doses baixas a nandrolona é uma boa opção de tratamento para osteoporose, pois a nandrolona inibe a reabsorção óssea e diminui a supressão da formação óssea resultando no aumento do conteúdo mineral ósseo. Também, aumenta a massa muscular principalmente nos membros inferiores, diminuindo a dor e aumenta a mobilidade da coluna vertebral (HAMDY *et al.*, 1998; GENNARI *et al.*, 1989; GEUSENS, 1995). Há também uma melhora nos níveis de hemoglobina e redução no índice de fraturas em pacientes tratados com nandrolona (FRISOLI *et al.*, 2005).

### **1.6.2. Mecanismo de ação da nandrolona**

Como a Nandrolona é derivada da testosterona, ela apresenta várias ações semelhantes à da testosterona, se ligando em receptor intracelular de andrógenos pelo qual a nandrolona possui alta afinidade, exercendo assim seus efeitos androgênicos, aumentando a síntese de proteínas. Como a testosterona, a nandrolona sofre ação da  $\alpha$ -redutase, presente nos tecidos que expressam esta enzima, como a próstata e folículo pilo-sebáceo, que converte a testosterona em diidrotestosterona (DHT), que também vai

atuar no receptor de andrógeno de uma forma mais potente que a testosterona. A nandrolona também pode ser aromatizada em estrógeno, atuando nos receptores para estrógeno e apresentando efeitos de feminilização (SHAHIDI, 2001; WILSON 1996; KUHN *et al.*, 2002). O uso indiscriminado da nandrolona ocorre principalmente pelos atletas, adultos e adolescentes que visam ter um aumento na força e na massa muscular (PERRY *et al.*, 2005; KADI, 2008). Problemas cardiovasculares são bastante comuns após a administração de nandrolona, principalmente hipertrofia do ventrículo esquerdo (humanos e ratos) e hipertensão arterial pulmonar (ANDRADE *et al.*, 2008; BEUTEL *et al.*, 2005; FARBER & LOSCALZO, 2005). Em consequência das altas doses, a nandrolona passa a agir em outros receptores de esteróides, como receptores mineralocorticóides, receptores de glicocorticóides e receptores de progesterona, podendo modificar o equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (JÄNNE, 1990). Há relatos de inibição dos níveis plasmáticos de corticosterona, pois o tratamento crônico com nandrolona inibe a transcrição de genes de enzimas envolvidas na síntese de corticosterona (11b-OHase) (SCHLUSSMAN *et al.*, 2000).

Os efeitos colaterais do abuso de nandrolona são acompanhados de efeitos psicológicos adversos, câncer de próstata, hipertrofia cardíaca, esterilidade, atrofia testicular, acne, toxicidade hepática, icterícia, impotência, hirsutismo e engrossamento da voz (HARTGENS & KUIPERS, 2004; WU, 1997; EVANS, 2004; DICKERMAN, 1997; HOFFMAN, 2006). Mulheres que abusam de nandrolona apresentam masculinização, crescimento clitoriano, irregularidades menstruais, engrossamento da voz, atrofia uterina e supressão da esteroidegênese gonadal (HARTGENS & KUIPERS, 2004; BAHRKE, 2004; KICMAN, 2008; MARAVELIAS *et al.*, 2005). O tratamento com testosterona e nandrolona em ratas sexualmente maduras, mostrou que ambas alteram a estrutura do útero e diminuem a fertilidade em ratas (CAMARGO *et al.*,

2005). Os andrógenos anabolizantes, principalmente a nandrolona, na circulação são capazes de reduzir a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas por retroalimentação negativa. Este efeito adverso é um dos mais comuns relatados pelo abuso de andrógenos. Sua ação reduz drasticamente os níveis de LH e FSH nos homens, conseqüentemente de testosterona. Ocorre inibição na produção do gene responsável pela expressão de LH e FSH, causando infertilidade. Há também um aumento na produção de prolactina, provavelmente relacionada com a aromatização da nandrolona em estrógeno (ALEN *et al.*, 1985; BONETTI *et al.*, 2008).

## 1.7. CATEQUINA

As catequinas são flavonóides membros da subclasse dos polifenóis e são encontradas no chá verde produzido a partir da folha da *Camellia sinensis*, em frutas e bebidas como café e vinho e verduras. As catequinas apresentam um ou mais grupos de hidroxilas fenólicas ligados a pelo menos um anel aromático. Catequina e epicatequina formam os dois principais monômeros e os oligômeros formam os taninos condensados (FINE, 2000). As catequinas e seus extratos possuem componentes biológicos que são benéficos para a saúde, e devido a este efeito benéfico é recomendado o uso regular de chá verde e de vinho tinto, além de consumo de frutas e verduras que contêm grandes quantidades de catequinas (HOLLMAN, 2005). A catequinas possuem ação anti-inflamatória e são inibidoras da proliferação de células cancerígenas (KAMP *et al.*, 2002). As catequinas também possuem agentes hipotensores e sedativos e a galato-epigallocatequina (EGCG), um dos principais componentes das catequinas do chá verde, possui atividade neuroprotetora contra danos causados por isquemia (LEE *et al.*, 2000).

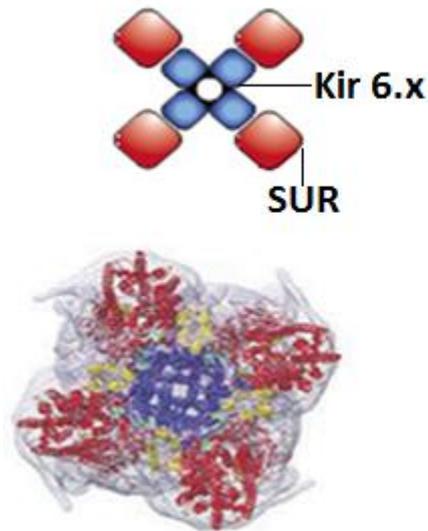
As catequinas também possuem componentes que são antiobesidade e antiarteroscleróticos (KAO *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 2001)

Alguns estudos *in vitro* utilizando células endoteliais periféricas e células de câncer de mama, sugerem que os efeitos de resveratrol (polifenol) e catequinas do chá no controle do câncer podem ser atribuídos à interação destes compostos com a enzima ciclooxigenase-2 e hemeoxigenase (MURIAS *et al.* 2004; DORE, 2005). Também acredita-se que as catequinas e o resveratrol se liguem a receptores de andrógenos, estrógenos, receptores de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), receptores de crescimento epidérmico (EGF), promovendo uma resposta direcionada a exercer os seus efeitos contra a proliferação celular de células cancerígenas (BOWERS *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2004; HOU *et al.*, 2005; TACHIBANA *et al.*, 2004). As catequinas podem modular canais de  $K^+_{ATP}$ , o que foi verificado em um estudo com a técnica de “patch-clamp” em células  $\beta$ -pancreáticas, no qual as catequinas prejudicaram o padrão de resposta das células  $\beta$  devido à dessensibilização dos canais de  $K^+$  ao ATP (JIN *et al.*, 2007). Há relatos de que as catequinas possam atuar em receptores de andrógenos presentes na membrana, pois deslocam parcialmente ou completamente a testosterona-BSA (testosterona ligada a albumina sérica) aparente quando aplicadas juntas nas células de câncer de mama T47D. Além disso, as catequinas fosforilam as mesmas moléculas de sinalização que a testosterona-BSA, como FAK e PI3K, as quais levam a uma redistribuição no citoesqueleto de actina. O bloqueio de PI3K com wortmannin anula o movimento do citoesqueleto tanto produzido pela testosterona-BSA como pelas catequinas (NIFLI *et al.*, 2005). Esses dados serviram como base para o presente estudo na investigação da ação das catequinas nas células de Sertoli.

## 1.8. CANAIS DE $K^+_{ATP}$

Os canais de  $K^+_{ATP}$  são importantes nas células  $\beta$ -pancreáticas, na secreção de insulina. A glicose prove um aumento do metabolismo, ou seja, um aumento intracelular de ATP, que promove o fechamento dos canais  $K^+_{ATP}$ , que ativam canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes, e assim o cálcio atua promovendo a secreção de insulina. Sulfoniluréias como a tobutamida e a glibenclamida que promovem o fechamento do canal pela ligação nas subunidades SUR estimulam a secreção de insulina, enquanto Diazoxida que mantém o canal de  $K^+_{ATP}$  aberto inibe a secreção de insulina (TRUBE *et al.*, 1986; EDWARDS & WESTON, 1993)

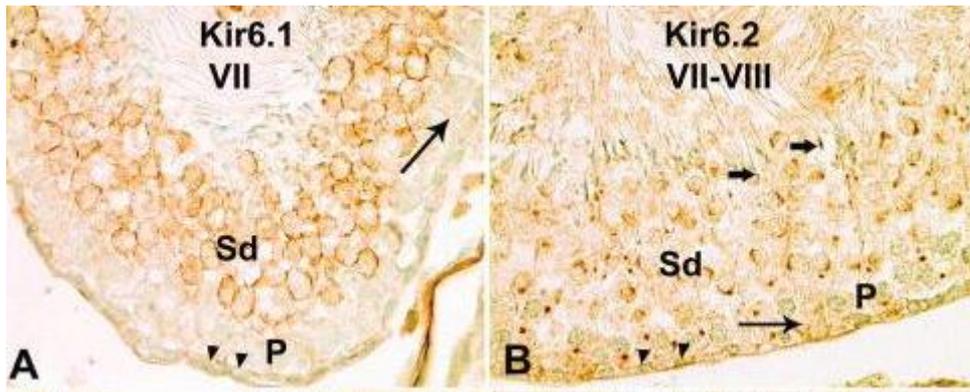
Os canais de  $K^+_{ATP}$  apresentam dois tipos de subunidades, uma subunidade retificadora e seletiva do canal, denominada de Kir e os receptores das sulfoniluréias SUR, parte reguladora do canal, membros da família ABC. Ambos estão organizadas em forma de tetrâmeros e juntos formam uma octâmero (Fig. 1.3) (DOYLE *et al.*, 1998; PEROZO *et al.*, 1999). O grau de retificação do canal depende da presença de Mg ou policátions como as poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) do interior da célula (LOPATIN *et al.*, 1995; NICHOLS & LOPATIN, 1997; NICHOLS *et al.*, 1996).



**Figura 1.3:** Representação do canal de  $K^+_{ATP}$  que forma um octômero funcional com quatro subunidades Kir.6.x, e cada subunidade está associada a uma subunidade SUR (MIKHAILOV *et al.*, 2005).

A subunidade Kir estabiliza o potencial de membrana das células, favorecendo o equilíbrio do  $K^+$ , evitando a despolarização celular. Esta subunidade forma um poro estreito no canal e apresenta uma alta seletividade ao íon  $K^+$ . A subunidade Kir do canal  $K^+_{ATP}$  apresenta dois domínios transmembrana ligados a uma hélice extracelular, denominadas M1 e M2, e apresentam um grande grau de semelhança e também participam da seletividade iônica do canal. As hélices internas de M2 mudam de conformação participando mais ativamente desta função (JAN & JAN, 1992; PONGS, 1993). A subunidade Kir apresenta seis subfamílias que vão de Kir 1.x a Kir 6.x, portanto Kir 6.x é um membro da família da subunidade Kir, e é sensível ao ATP, o qual promove o fechamento do canal, enquanto que a subunidade SUR interage com Mg-ADP que promove a abertura do canal (COLIN, 2006; ENKVETCHAKUL *et al.*, 2000; KAKEI, 2003; LI *et al.*, 2000).

Além da regulação do canal por ATP, estes canais são regulados pelas concentrações dos fosfolipídeos da membrana PIP2 e PIP3 (ENKVETCHAKUL *et al.*, 2003). A interação dos fosfolipídeos de membrana (PIP2) e ATP ocorre com os domínios citoplasmáticos terminais (N-terminal e C-terminal) da subunidade Kir 6.x do canal, que fornecem sítios de ligação tanto pra ATP quanto para PIP2 (PROKS *et al.*, 1999; KAKEI, 2003). Acredita-se que PIP2 e ATP competem pela ligação no canal, alterando o estado aberto e fechado do canal. Quando há maior ligação de PIP2 vai predominar o estado permissivo que diminui a ação inibitória de ATP sobre o canal  $K^+$ , mantendo o canal no estado aberto (KAKEI, 2003; MARKWORTH *et al.*, 2000; ENKVETCHAKUL *et al.*, 2003). Também são utilizados fármacos para a classificação dos canais de  $K^+_{ATP}$ . Um grupo que mantém o tempo médio de abertura dos canais, referidos como abridores dos canais de potássio ou KCOs (Diazoxida, pinacidil, cromakalin, P1075) e um grupo fechadores de canais de  $K^+$ , sulfoniluréias que se ligam na subunidade SUR (glibenclamida, tobultamida e iodoglibenclamida) (BRYAN & BRYAN, *et al.*, 1999). Estudo recente relata a expressão de canais de  $K^+$  em testículos de ratos. Os testículos possuem as subunidades dos canais de  $K^+_{ATP}$ , Kir6.1, Kir6.2,, SUR2A e SUR2B. Trabalhos de imuno-histoquímica verificaram a presença destas subunidades em diferentes localizações nas células de Sertoli, célula espermatogênicas de Leydig (Figura 1.4) (ZHOU *et al.*, 2011).



**Figura 1.4:** Imuno-histoquímica mostra subunidades do canal  $K^+_{ATP}$  no testículo de ratos. (A) imunorreatividade moderada com anticorpo anti-Kir6.1 é observada na membrana celular de espermatídes arredondadas (Sd), imunorreatividade fraca espermatócitos em paquíteno (P) e células de Sertoli (seta), e a imunorreatividade fraca em espermatogônias (pontas de setas). (B) Imunorreatividade moderada a intensa com o anticorpo anti-Kir6.2 nas espermatídes arredondadas (Sd), imunorreatividade fraca em espermatídes alongadas (setas pequenas) e peça intermediária de espermatozóides no lúmen dos túbulos seminíferos. Imunorreatividade fraca também é observada em espermatócitos paquíteno (P), células de Sertoli (seta) e espermatogônias (pontas de setas). (ZHOU *et al.*, 2011)

Experimentos de eletrofisiologia realizados em células de Sertoli verificaram que a testosterona é capaz de modular os canais de  $K^+_{ATP}$ , pois a aplicação de testosterona provoca despolarização seguida de aumento na resistência da membrana, efeito anulado pela perfusão com diazoxida (mantém canais de  $K^+_{ATP}$  abertos), indicando a participação deste canal no efeito despolarizante da testosterona (VON LEDEBUR *et al.*, 2002)

Assim, o estudo da testosterona sobre os canais de  $K^+_{ATP}$  é relevante, pois melhora a compreensão do componente de membrana de ação deste hormônio, isolando este efeito específico na membrana. Assim como, a utilização da catequina e da nandrolona esclarece a ação da testosterona por apresentarem efeito semelhante sobre o receptor de membrana AR.

## **1.9. OBJETIVOS**

### **1.9.1. Objetivo geral**

Verificar a ação não-clássica de andrógenos (testosterona, nandrolona) e observar a ação de catequina nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos.

### **1.9.2. Objetivos específicos**

- Verificar se a nandrolona e a catequina apresentam uma resposta eletrofisiológica similar à da testosterona na membrana de Sertoli de Ratos Wistar imaturos.
- Analisar se a inibição do receptor intracelular de andrógeno iAR altera a ação eletrofisiológica da testosterona, nandrolona e catequina na membrana das células de Sertoli de ratos Wistar imaturos.
- Observar o envolvimento dos canais de  $K^+_{ATP}$  e da PLC na ação da catequina em células de Sertoli de ratos Wistar imaturos.
- Verificar se a nandrolona e a catequina produzem alteração na captação de  $^{45}Ca^{2+}$  em células de Sertoli de ratos Wistar imaturos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. MATERIAIS**

#### **2.1.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos de 10 a 15 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Esta dissertação era parte do projeto “Diversidade das vias de sinalização do FSH e da Testosterona em células de Sertoli”, o qual obteve aprovação no Comitê de Ética sob o número 2007861. Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos do animal por incisão abdominal, limpos e decapsulados.

As carcaças dos animais e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao biotério do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS.

#### **2.1.2. Soluções**

Foi utilizada uma solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) como meio de incubação, em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza ‘pró-análise’ (P.A) da *E. Merck*

(Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções estoques conforme tabela 1.

**TABELA 1.** Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

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

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obterem-se as concentrações finais descritas na tabela 1. A solução era gaseificada com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em

pHmetro. A solução assim obtida foi mantida em gelo durante a preparação do experimento.

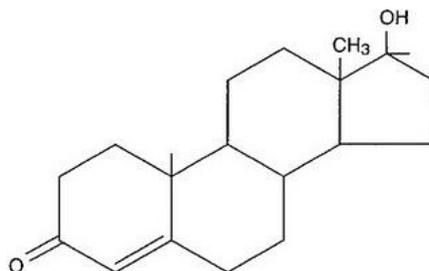
O descarte dos resíduos não tóxicos, por exemplo, soluções salinas que não foram utilizadas, foram feita no esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos experimentos foram acondicionados em frascos para serem encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para o procedimento correto quanto ao descarte. Os resíduos radioativos foram acondicionados e encaminhados conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS.

### **2.1.3. Substâncias utilizadas**

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

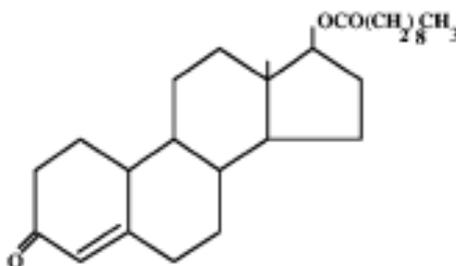
**b) Líquido de Cintilação:** Optiphase Hisafe III (Wallac, Finlândia). Foi utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

**c) Testosterona:** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Hormônio esteróide com ação andrógena e anabólica(fig 1.5), pesado em balança analítica em diluído em etanol e posteriormente em Krb produzindo uma solução com 1,0 $\mu\text{M}$  de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.



**Figura 1.5:** Estrutura molecular da Testosterona.

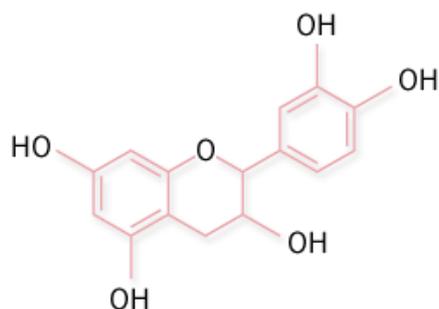
**d) Nandrolona (Decanoato de Nandrolona):** Deca Durabolin- Ampola 50mg (fig 1.6). Hormônio esteróide sintético derivado da testosterona. Foi utilizada Nandrolona comercial injetável, diluída primeiramente em etanol e posteriormente em Krb nas concentrações de 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M e 1,0  $\mu$ M. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.



**Figura 1.6:** Estrutura molecular da Nandrolona

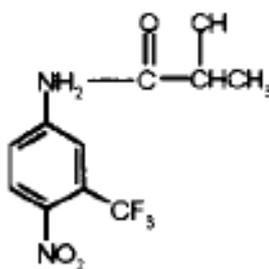
**e) Catequina :** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Flavonóide da subclasse dos polifenóis (fig1.7), possível agonista de receptores de andrógenos extraído de plantas e frutas,

pesado em balança analítica em diluído em etanol e posteriormente em Krb produzindo uma solução com 0,1  $\mu\text{M}$  , 0,5  $\mu\text{M}$  e 1,0 $\mu\text{M}$  de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução final.



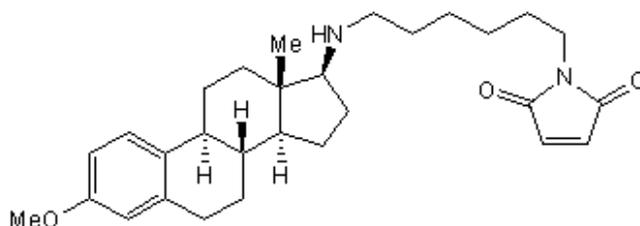
**Figura 1.7:** Estrutura molecular das Catequinas.

f) **Flutamida:** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Bloqueador de recepto intracelular de andrógeno ( $\text{iAR}$ ) (fig 1.8). Solúvel em DMSO foi utilizada em concentrações de 1,0 $\mu\text{M}$ , em experimentos protegidos da luz. Os experimentos foram conduzidos e processados sob lâmpada de sódio. A concentração de DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



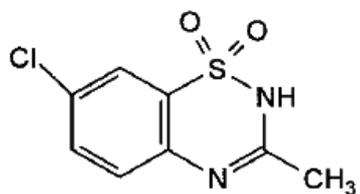
**Figura 1.8:** Estrutura molecular da Flutamida

**g) U73122:** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): (1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione) (fig1.9). Bloqueador da enzima fosfolipase C (PLC), pesado em balança analítica em diluído em etanol e posteriormente em Krb produzindo uma solução com 2,0 $\mu$ M de concentração final no experimento. A concentração de etanol não ultrapassou 0,1% na solução.



**Figura 1.9:** Estrutura molecular de U73122 (bloqueador da PLC)

**h) Diazoxida:** (RBI) Agonista de canais de  $K^+$ <sub>ATP</sub>, mantém os canais abertos (fig 1.10), foi diluída em 1 N de NaOH, em uma concentração de 100 $\mu$ M no final do experimento.



**Figura 1.10:** Estrutura da Diazoxida.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Eletrofisiologia**

### **2.2.2. Preparação dos túbulos seminíferos**

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

### **2.2.3. Registro intracelular**

O potencial de membrana das células de Sertoli foi registrado com microeletrodos preenchidos com 3 mol/L de KCl com uma resistência de 15 a 25 MΩ. O microeletrodo foi conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK) e o sinal era monitorado por um osciloscópio (*Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210*). Os traçados observados no osciloscópio eram adquiridos e armazenados em computador através de uma placa e um programa de interface (*Wavestar Lite Version 1.0.10*). Pulsos quadrados de corrente (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) foram aplicados através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass instruments) para avaliar a resistência da membrana. As substâncias testadas (testosterona, nandrolona e catequina) foram aplicadas topicamente ao banho após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos. Antagonistas ou bloqueadores (Flutamida, diazoxida e U73122) foram aplicados 5

minutos antes do hormônio por perfusão na câmara onde estão localizados os túbulos seminíferos. Os registros da variação do potencial de membrana e da resistência da membrana foram registrados com os diferentes tratamentos. Cada tratamento foi repetido por no mínimo de 5 vezes com diferentes células.

### **2.3. CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA**

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

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência ( $\Omega$ - ohms)

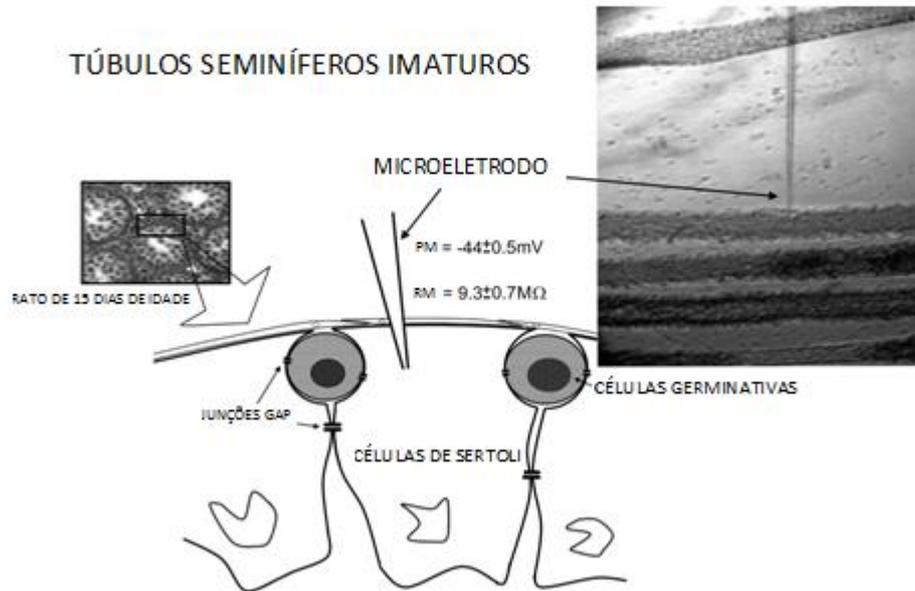
LEI DE OHM:

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

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

A voltagem registrada no osciloscópio relacionada ao valor de resistência corresponde 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 (Fig 2.)

A



B



**Figura 2.** A. Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana (PM) e resistência da membrana (RM). B. representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de  $-47 \text{ mV}$ . Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de  $0,5 \text{ nA}$ .

#### 2.4. CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Os testículos foram limpos, pesados e decapsulados. Os testículos foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo  $1 \text{ mL}$  de KRb (Krebs Ringer bicarbonato). Os testículos foram incubadas em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de  $34^\circ\text{C}$  em ambiente gaseificado

com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5, v/v), para a manutenção do pH. O período de pré-incubação foi de 60 minutos em 800μL de KRb com <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (4,44 KBq/20ng ou 0,2μCi) para alcançar o equilíbrio intra e extracelular de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>.

O período de incubação foi de 5 minutos a partir da aplicação de KRb com <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> com ou sem nandrolona e catequina. Para finalizar a incubação foi adicionado à cada tubo, 1 mL de cloreto de lantânio (LaCl<sub>3</sub>) (10 mM) à 0°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA & SJOGREN, 1983). O sobrenadante foi preservado, e os testículos foram removidos para tubos com 1 mL de água destilada. O tecido foi congelado e posteriormente fervido para que houvesse extravasamento do meio interno para a água destilada. Alíquotas de 0,1mL foram retiradas de cada tubo (sobrenadante e meio interno) para medida da radioatividade em líquido de Aquasol 2 Optiphase, procedendo-se a leitura em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia). A eficiência de contagem era de 85-90%. Os resultados foram expressos pela razão pmoles <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>/ g de tecido.

## 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

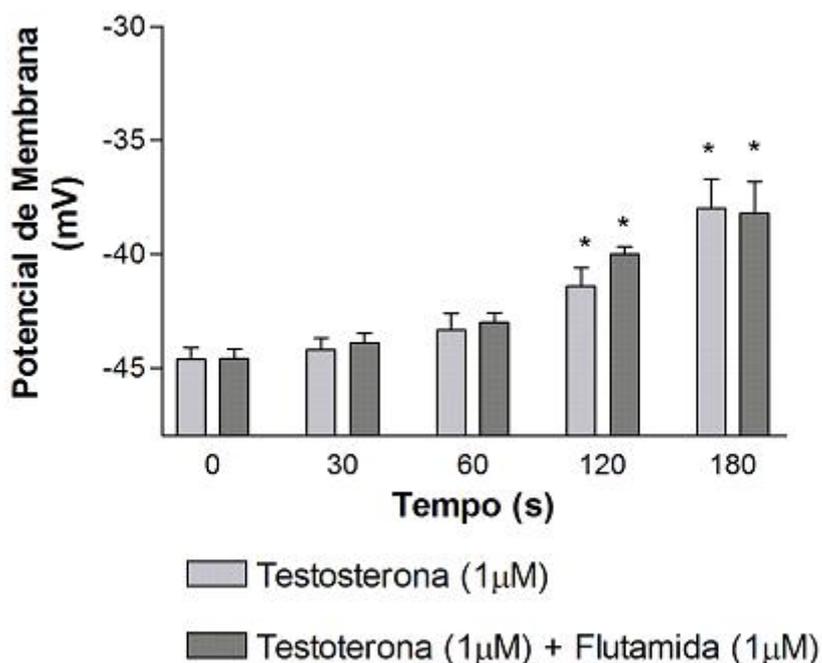
Nos experimentos de registro intracelular os tratamentos foram repetidos pelo menos 5 vezes. O número de amostras por grupo era de no mínimo 5 nos experimentos de captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. O cálculo amostral foi realizado com software *winpepi versão 9*, utilizando um poder amostral de 80% e um intervalo de confiança de 95%. Para a análise estatística foram utilizados o Teste-t de Student para comparação entre dois grupos ou ANOVA de uma ou duas vias, conforme o experimento, seguido do pós-teste

de Bonferroni. No caso dos registros eletrofisiológicos, como as células partem de diferentes valores de potencial de membrana, para a análise estatística as amostras são pareadas. Foi utilizado o programa *InStat*, versão 3.01,32 bit para Windows 95/NT, da (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 2.6. RESULTADOS

### 2.7. Ação eletrofisiológica da testosterona ( $1\mu\text{M}$ ) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli e de testosterona ( $1\mu\text{M}$ ) com perfusão de flutamida ( $1\mu\text{M}$ ).

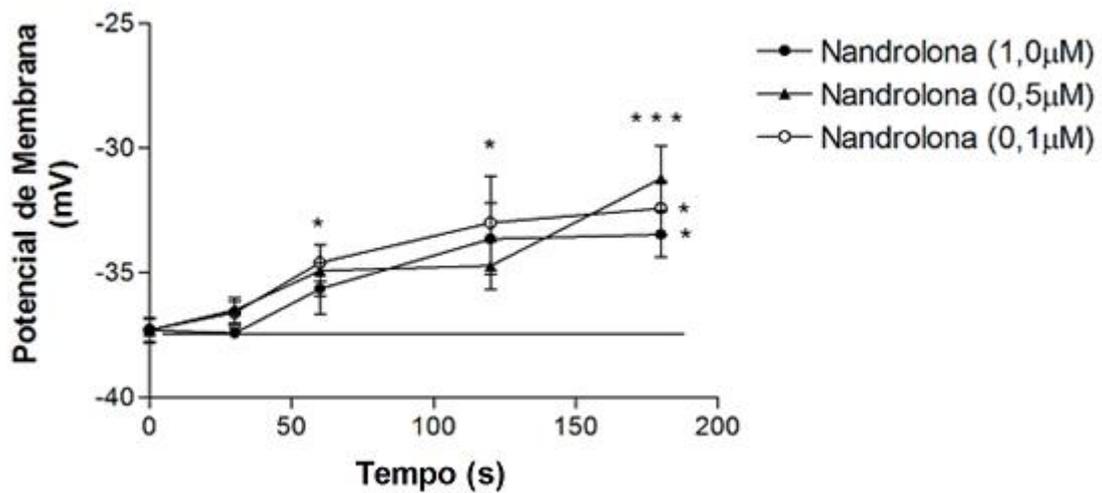
A aplicação da testosterona ( $1\mu\text{M}$ ) despolarizou a membrana das células de Sertoli de ratos imaturos, sendo significativo após os 120 segundos. A aplicação de testosterona após perfusão com flutamida ( $1\mu\text{M}$ ) apresentou efeito semelhante de despolarização com significância após os 120 segundos.



**Fig.2.1.** Efeito da Testosterona ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ) e de Testosterona com perfusão de flutamida ( $n=5$ ) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli, comparado com o potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias,  $*p < 0,05$ ).

## 2.8. Ação eletrofisiológica da nandrolona em diferentes doses sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli

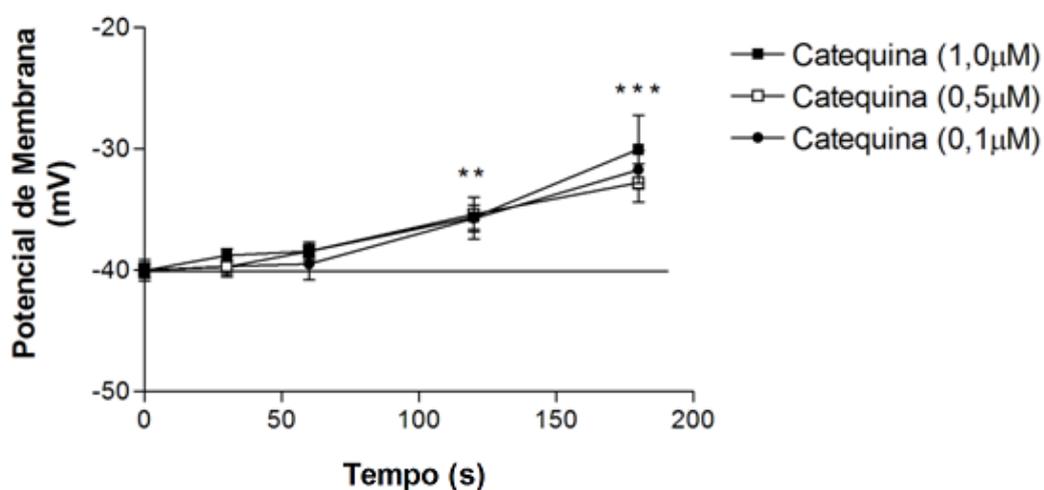
A nandrolona aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos provocou a despolarização do potencial de membrana das células de forma significativa aos 60, 120 e 180 segundos nas doses de 0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M e 1,0  $\mu$ M.



**Fig.2.2.** Efeito da Nandrolona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli nas doses de 0,1 $\mu$ M (n=5), 0,5 $\mu$ M (n=6), e 1,0 $\mu$ M (n=6), comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

## 2.9. Ação eletrofisiológica da catequina em diferentes doses sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli

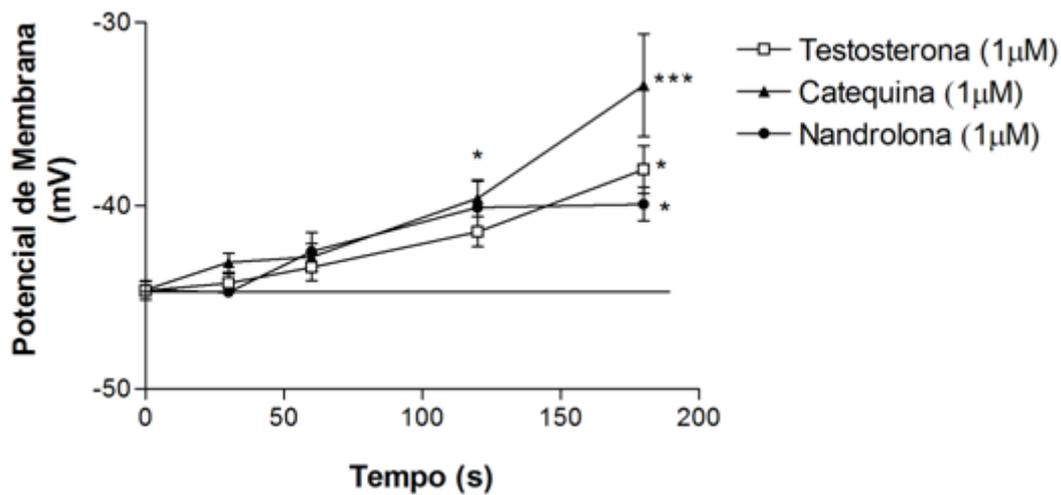
A catequina aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos provocou a despolarização do potencial de membrana das células de forma significativa aos 120 e 180 segundos nas doses de 0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M e 1,0  $\mu$ M.



**Fig.2.3.** Efeito da Catequina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli nas doses de 0,1 $\mu$ M (n=5), 0,5 $\mu$ M (n=5), e 1,0 $\mu$ M (n=9) comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

## 2.10. Comparação da resposta eletrofisiológica da nandrolona, da catequina e da testosterona na mesma dose sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli

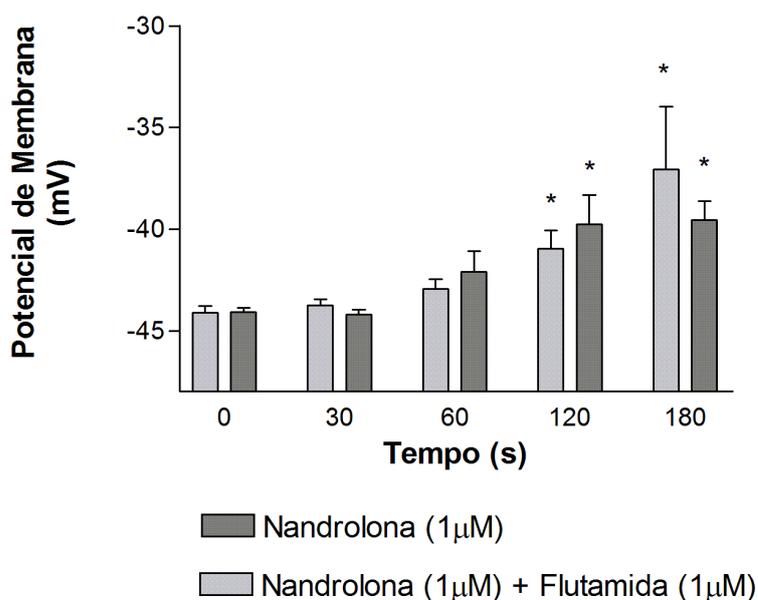
A testosterona ( $1\mu\text{M}$ ), a catequina ( $1\mu\text{M}$ ) e a nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) aplicadas nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos, alteram o potencial de membrana das células causando despolarização de forma significativa aos 120 e 180 segundos. O padrão de despolarização foi semelhante entre elas, sendo a catequina nesta dose mais potente que testosterona e nandrolona aos 180 segundos.



**Fig.2.4.** Efeito da Testosterona ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ), Catequina ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ) e Nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli, comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 3. Ação eletrofisiológica da nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli e de nandrolona (1 $\mu$ M) com perfusão de flutamida (1 $\mu$ M)

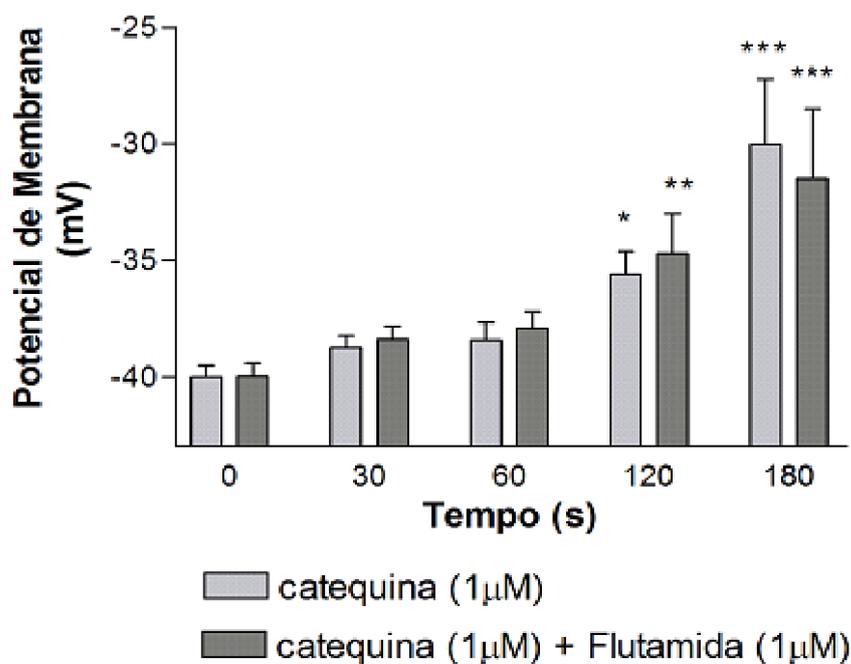
A aplicação de nandrolona (1 $\mu$ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos provocou despolarização da membrana e despolarizou a célula com a aplicação de Nandrolona (1 $\mu$ M) após perfusão de flutamida (1 $\mu$ M), sendo significativo aos 120 segundos e 180 segundos.



**Fig.2.5.** Efeito da Nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de sertoli com a perfusão de Flutamida (1 $\mu$ M) comparado com o potencial de membrana basal (n=7). (ANOVA de duas vias, \*p< 0,05).

### 3.1. Ação eletrofisiológica da catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli com perfusão de flutamida (1 $\mu$ M)

A aplicação de catequina (1 $\mu$ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos provocou despolarização da membrana e a despolarização se repetiu na aplicação de catequina (1 $\mu$ M) após perfusão com o bloqueador do receptor de andrógeno intracelular flutamida (1 $\mu$ M) sendo significativo aos 120 e 180 segundos.

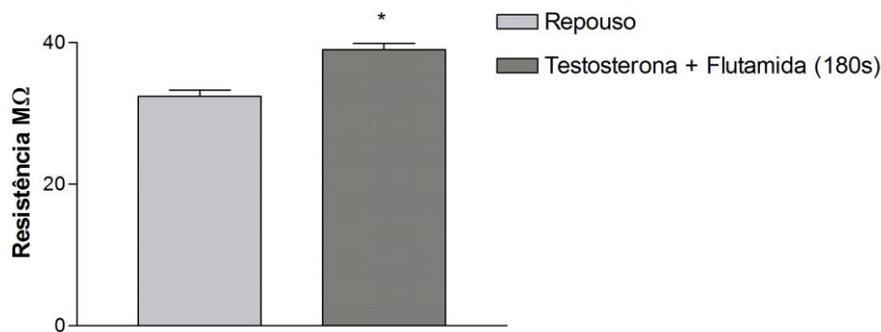


**Fig.2.6.** Efeito da Catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli com a perfusão de Flutamida (1 $\mu$ M) comparado com o potencial de membrana basal (n=6). (ANOVA de duas vias \*p<0,05, \*\*p<0,01,\*\*\* p<0,001).

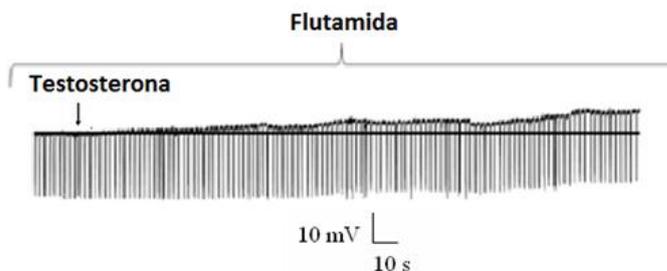
### 3.2. Comparação da resistência da membrana nas células de Sertoli entre repouso e após aplicação de testosterona com flutamida aos 180 segundos

Trabalhos realizados neste laboratório mostraram que a testosterona aplicada nas células de Sertoli aumenta a resistência da membrana na despolarização celular em relação ao repouso da célula (VON LEDEBUR, *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a testosterona (1 $\mu$ M) aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos após a perfusão com flutamida (1 $\mu$ M) provocou aumento da resistência durante a despolarização da membrana da célula em relação à resistência encontrada no repouso da célula verificada aos 180 segundos.



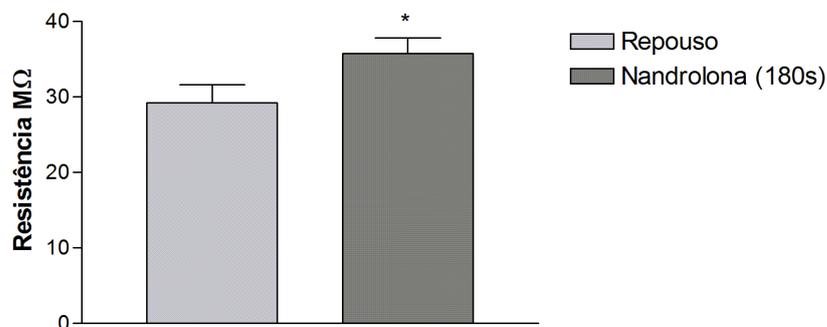
**Fig.2.7.** Efeito da Testosterona (1 $\mu$ M) com perfusão de Flutamida (1 $\mu$ M) sobre a resistência da membrana de células de Sertoli aos 180 segundos em relação ao repouso. (n=5). (ANOVA de uma via \*p<0,05).



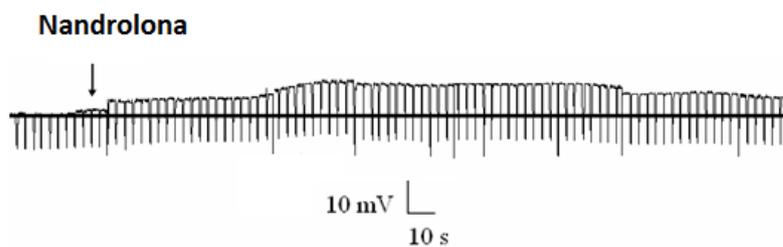
Célula típica: Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli com a aplicação tópica de testosterona com perfusão de flutamida.

### 3.3. Comparação da resistência da membrana nas células de Sertoli entre repouso e após aplicação de nandrolona aos 180 segundos

A nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos provocou aumento da resistência da membrana da célula verificada aos 180 segundos em relação à resistência encontrada no repouso da célula.



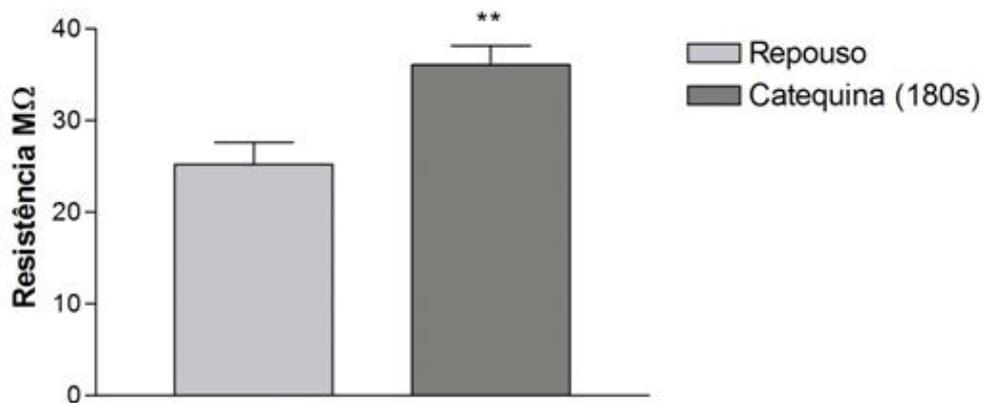
**Fig.2.8.** Efeito da Nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ) sobre a resistência da membrana de células de Sertoli aos 180 segundos em relação ao repouso. (ANOVA de uma via \* $p<0,05$ ).



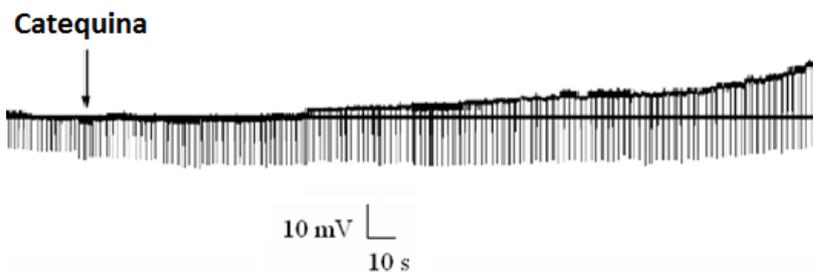
Célula típica: Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli com a aplicação tópica de nandrolona.

### 3.4. Comparação da resistência da membrana nas células de Sertoli entre repouso e após aplicação de catequina aos 180 segundos

A catequina (1 $\mu$ M) aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos provocou despolarização com aumento da resistência da membrana da célula verificado aos 180 segundos em relação à resistência encontrada no repouso da célula.



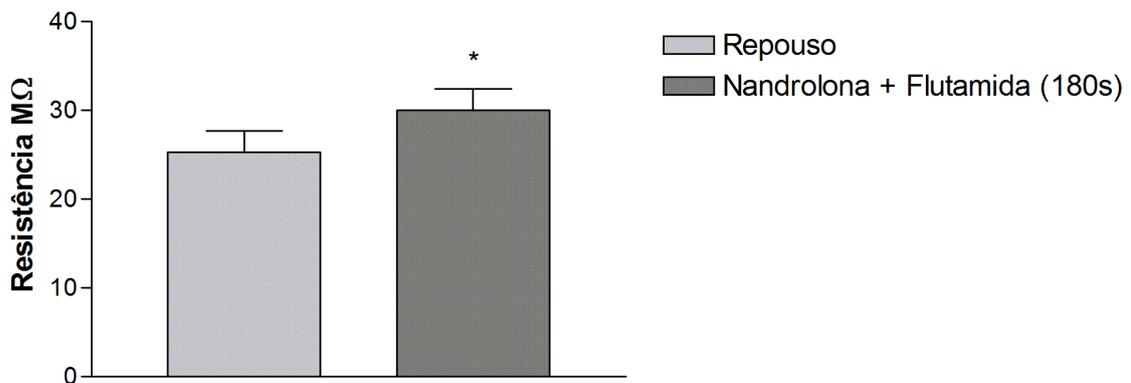
**Fig.2.9.** Efeito da Catequina (1 $\mu$ M) (n=9) sobre a resistência da membrana de células de Sertoli aos 180 segundos em relação ao repouso. (ANOVA de uma via \*\*p<0,01).



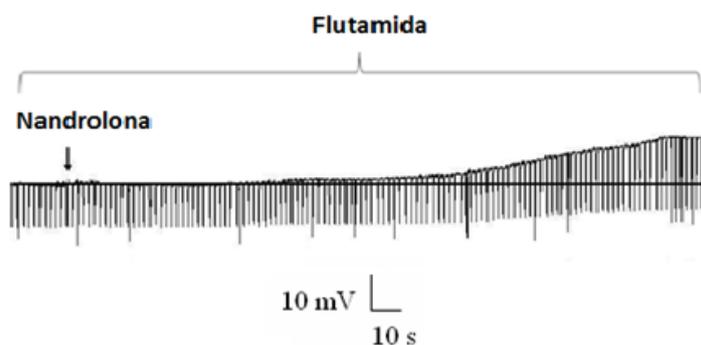
Célula típica: Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli com a aplicação tópica de catequina.

### 3.5. Comparação da resistência da membrana nas células de Sertoli entre repouso e após aplicação de nandrolona com flutamida aos 180 segundos

A nandrolona (1 $\mu$ M) aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos após a perfusão com flutamida (1 $\mu$ M) provocou aumento da resistência da membrana da célula verificada aos 180 segundos em relação à resistência encontrada no repouso da célula.



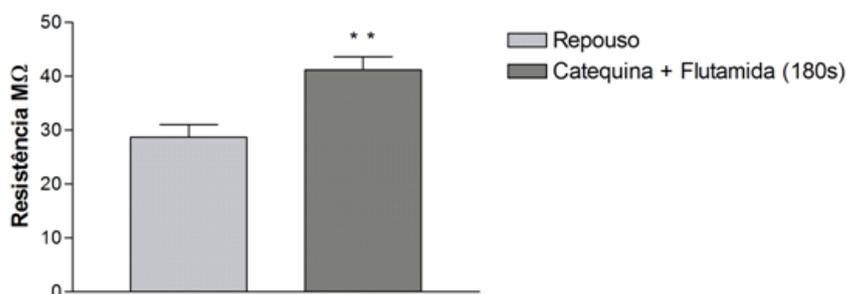
**Fig.2.10.** Efeito da Nandrolona (1 $\mu$ M) com perfusão de Flutamida (1 $\mu$ M) (n=7) sobre a resistência da membrana de células de Sertoli aos 180 segundos em relação ao repouso. (ANOVA de uma via \*p<0,05).



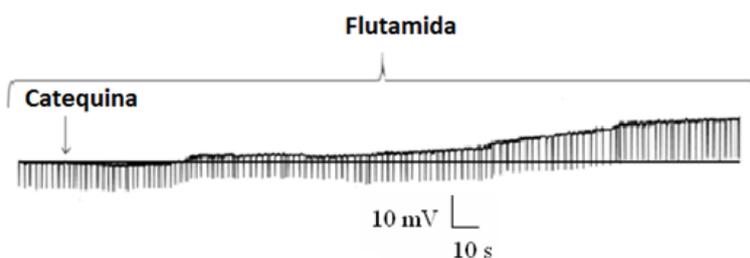
Célula típica: Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli com a aplicação tópica de nandrolona com perfusão de flutamida.

### 3.6. Comparação da resistência da membrana nas células de Sertoli entre repouso e após aplicação de catequina com flutamida aos 180 segundos

A catequina (1 $\mu$ M) aplicada nas células de Sertoli de ratos Wistar imaturos após a perfusão com flutamida (1 $\mu$ M) provocou aumento da resistência da membrana da célula em relação à resistência encontrada no repouso da célula.



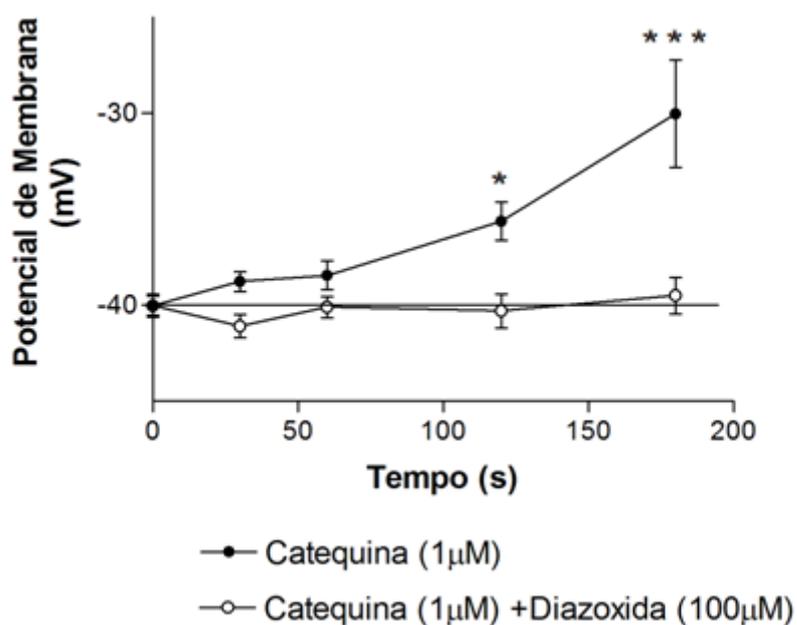
**Fig.3.** Efeito da Catequina (1 $\mu$ M) com perfusão de Flutamida (1 $\mu$ M) (n=6) sobre a resistência da membrana de células de Sertoli aos 180 segundos em relação ao repouso. (ANOVA de uma via \*\*p<0,01).



Célula típica: Registro do potencial de membrana de uma célula de Sertoli com a aplicação tópica de catequina com perfusão de flutamida.

### 3.7. Ação eletrofisiológica da catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli com perfusão de diazoxida (100 $\mu$ M)

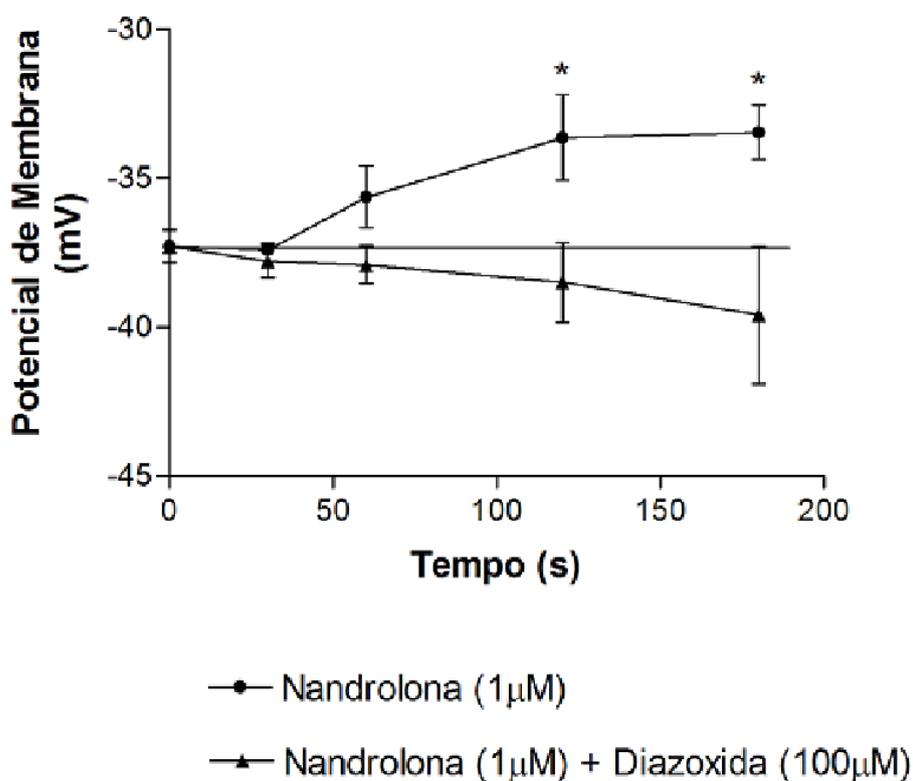
A perfusão com diazoxida (100 $\mu$ M) que mantém os canais de K<sup>+</sup> ATP abertos, anulou o efeito despolarizante da catequina (1 $\mu$ M) na membrana das células de Sertoli de ratos imaturos.



**Fig.3.1.** Efeito da Catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli com a perfusão de Diazoxida (100 $\mu$ M) comparado ao grupo não tratado. (n=7). (ANOVA de duas vias \*p< 0,05,\*\*\*p<0,001).

### 3.8. Ação eletrofisiológica da nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli com perfusão de diazoxida (100 $\mu$ M)

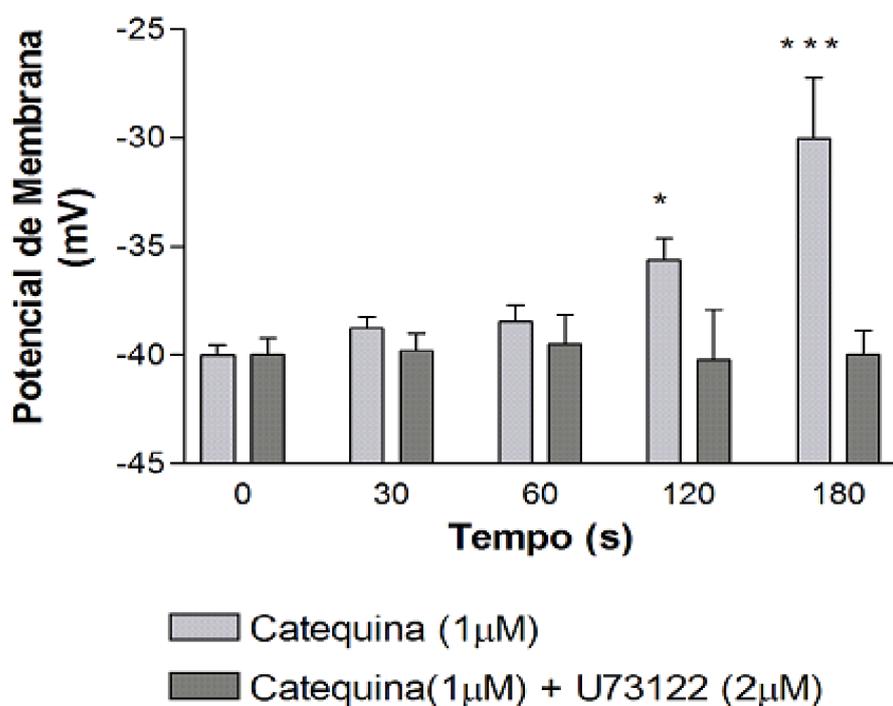
A perfusão com diazoxida (100 $\mu$ M) anulou o efeito despolarizante da nandrolona (1 $\mu$ M) na membrana das células de Sertoli de ratos imaturos.



**Fig.3.2.** Efeito da Nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli com a perfusão de Diazoxida (100 $\mu$ M) comparado ao grupo não tratado (n=6). (ANOVA de duas vias, \*p < 0,05).

### 3.9. Ação eletrofisiológica da catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli com perfusão de U73122 (2 $\mu$ M)

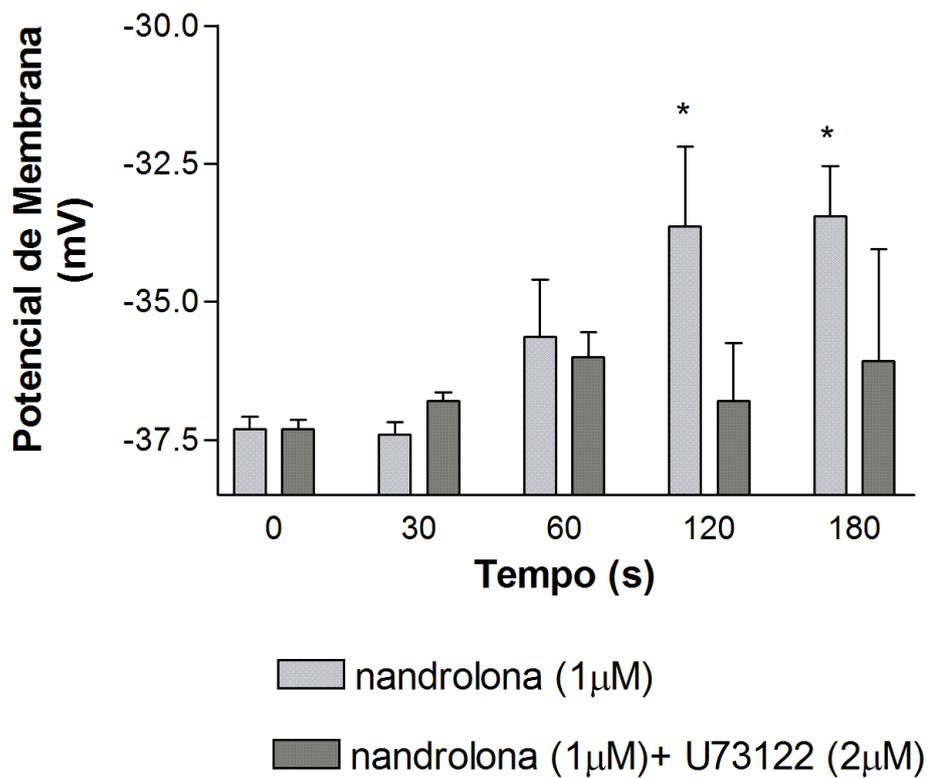
A perfusão com o bloqueador da PLC U73122 (2 $\mu$ M) anulou o efeito despolarizante da catequina (1 $\mu$ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos aos 120 e 180 segundos.



**Fig.3.3.** Efeito da Catequina (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli com a perfusão de U73122 (2 $\mu$ M) com o grupo não tratado. (n=5). (ANOVA de duas vias, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001).

### 3.10. Ação eletrofisiológica da nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana nas células de Sertoli com perfusão de U73122 (2 $\mu$ M)

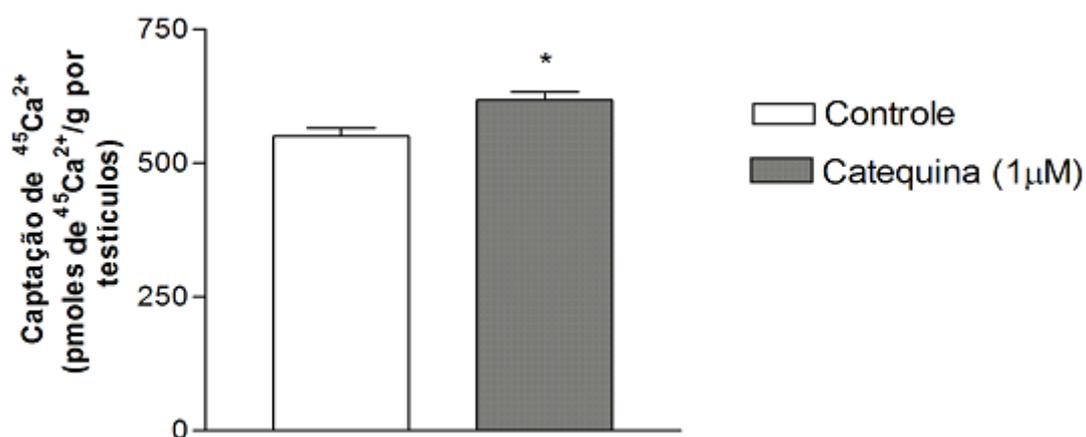
A perfusão com o bloqueador da PLC U73122 (2 $\mu$ M) anulou o efeito despolarizante da nandrolona (1 $\mu$ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos aos 120 e 180 segundos.



**Fig.3.4.** Efeito da Nandrolona (1 $\mu$ M) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli com a perfusão de U73122 (2 $\mu$ M) comparado ao grupo não tratado. (n=7). (ANOVA de duas vias \*p< 0,05, \*\*\*p<0, 001).

#### 4. Estímulo da catequina sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli

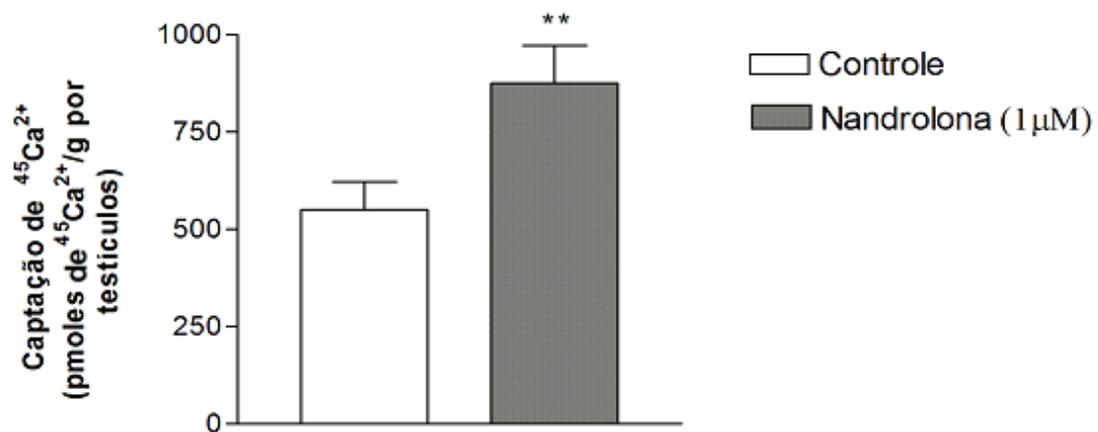
A catequina ( $1\mu\text{M}$ ) estimulou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  pelas células de Sertoli em experimento realizado com testículos inteiros de ratos imaturos (10 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle.



**Fig.3.5.** Ação da Catequina ( $1\mu\text{M}$ ) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) em células de Sertoli, (Teste t de Student \* $p < 0,05$ ;  $n=9$ )

#### 4.1. Estímulo da nandrolona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli

A nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) estimulou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  pelas células de Sertoli, experimento realizado com testículos inteiros de ratos imaturos (10 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos, em relação ao controle.



**Fig.3.6.** Ação da nandrolona ( $1\mu\text{M}$ ) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) em células de Sertoli, (Teste t de *Student* \*\* $p < 0,01$ ;  $n=5$ )

## 4.2. DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores deste laboratório, foi observado que a testosterona, quando aplicada topicamente em concentrações fisiológicas (0,1 a 0,25  $\mu\text{M}$ ), produz uma despolarização imediata ( $< 1$  segundo) sobre o potencial de membrana em células de Sertoli (VON LEDEBUR, *et al.*, 2002, LOSS *et al.*, 2004). Esta despolarização aumenta com o tempo, chegando ao seu máximo em 5 minutos e retorna ao potencial de repouso após a preparação ser lavada com solução salina (VON LEDEBUR *et al.*, 2002). A resposta à testosterona é específica, uma vez que nem progesterona nem estradiol exercem algum efeito na membrana destas células (VON LEDEBUR *et al.*, 2002).

O perfil de despolarização da resposta das células de Sertoli à testosterona para diferentes concentrações (0,1 à 10  $\mu\text{M}$ ) é similar variando apenas em intensidade, sendo maior nas doses mais elevadas (VON LEDEBUR *et al.*, 2002).

Neste presente trabalho observou-se alterações no potencial da membrana das células de Sertoli com a aplicação de testosterona (1 $\mu\text{M}$ ) seguido de perfusão com flutamida (1 $\mu\text{M}$ ). A testosterona apresentou um efeito despolarizante, mesmo com o bloqueio do receptor intracelular (iAR) (Fig 2.1). A utilização de flutamida para verificar se o iAR participa de ações não-clássicas da testosterona, foi realizada em diversos tipos celulares. A testosterona-BSA, em doses farmacológicas, provoca uma vasodilatação instantânea em aorta de coelhos; este efeito agudo do andrógeno não é inibido com perfusão de flutamida, indicando que este efeito rápido possa estar acontecendo por vias de sinalização intracelular, por ações não-clássicas da testosterona (YUE *et al.*, 1995; JONES *et al.*, 2004). A flutamida também não anula efeitos de influxo rápido de cálcio provocado pela aplicação de testosterona-BSA em

cardiomiócitos de ratos (VICENCIO *et al.*, 2006; ER *et al.*, 2007; VICENCIO 2006). Em células de Sertoli, estudos recentes afirmam que a testosterona age por uma via não clássica ativando a tirosina quinase Src, fazendo com que o receptor do fator de crescimento epidérmico seja ativado, promovendo a fosforilação e ativação de MAPK e ERK. A ativação de Src foi necessária para liberação dos espermatozóides a partir das células de Sertoli (CHENG *et al.*, 2007; WALKER, 2010; SHUPE *et al.*, 2011). A inibição de Src por PP2 e do receptor intracelular com flutamida prejudicou a liberação de espermatozóides em resposta à testosterona. Portanto, os autores concluem que o sucesso da espermatogênese dependem do iAR e da ativação de Src. (CHENG *et al.*, 2007; WALKER, 2010; SHUPE *et al.*, 2011). No entanto, outros trabalhos realizados em células de Sertoli, observaram que a testosterona produz a ativação de MAPK e de CREB (fator de transcrição em células de Sertoli), e que a ativação destas vias de sinalização ocorrem de forma independente da presença de iAR, pois o bloqueio do receptor de andrógeno intracelular com flutamida não inibiu a ativação de MAPK e CREB (SILVA *et al.*, 2002; HEINLEN & CHANG, 2002; CATO *et al.*, 2002).

A despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli após a aplicação de testosterona descrita anteriormente, caracteriza um efeito não-clássico da testosterona, pois ocorre em poucos segundos e não depende da ligação do hormônio com o receptor de andrógenos intracelular (iAR), visto que a perfusão com flutamida não alterou o padrão de resposta despolarizante da testosterona, identificando portanto um efeito de membrana da Testosterona.

Devido ao fato de que a testosterona causa despolarização da membrana das células de Sertoli, verificamos se a ação de outro andrógeno, porém sintético provocaria uma resposta semelhante. Há poucos relatos sobre a ação rápida da nandrolona. Um estudo observou que a aplicação de doses farmacológicas altas de 2mg/Kg de

Nandrolona e outro grupo com 2mg/Kg de testosterona em cérebros intactos de ratos machos e castrados apresentaram imunorreatividade aos receptores em locais clássicos e não-clássicos para os dois grupos andrógenos testados (MENARD & HARLAN, 1993). Em células de Sertoli, nenhum relato foi encontrado de que o decanoato de nandrolona possa apresentar efeito não-clássico.

No presente trabalho, observamos que a Nandrolona é capaz de despolarizar em segundos o potencial da membrana das células de Sertoli, em doses de 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5 $\mu\text{M}$  e 1 $\mu\text{M}$ . Este efeito foi semelhante ao efeito encontrado com a testosterona. (Fig 2.2)

Estudos realizados em células de câncer de mama T47D mostram que os flavonóides Catequinas são capazes de se ligar em receptores de andrógenos presentes na membrana destas células. A ligação das catequinas ocorre de forma competitiva com a testosterona-BSA, pois após a aplicação concomitante de testosterona-BSA e catequina, a presença de catequina desloca em 30% a ligação de testosterona na membrana destas células (NIFLI *et al.*, 2005). Com base nestes resultados, decidimos testar o efeito das catequinas nas células de Sertoli de ratos imaturos. Observamos que as catequinas causam a despolarização da membrana quando aplicadas nestas células, nas doses de 0,1 $\mu\text{M}$ , 0,5 $\mu\text{M}$  e 1,0 $\mu\text{M}$  (Fig 2.3). A despolarização ocorreu de forma semelhante à da testosterona, possivelmente por estar agindo diretamente em receptores de andrógenos na membrana, corroborando com as conclusões do estudo apresentadas, de que as catequinas são capazes de se ligarem em receptores de andrógenos.

Verificamos neste trabalho que a despolarização gerada pela nandrolona e pela catequina é muito semelhante ao padrão de despolarização da testosterona. (Fig 2.4)

Foram realizados experimentos com nandrolona (1,0 $\mu\text{M}$ ) e catequina (1,0 $\mu\text{M}$ ) e perfusão com flutamida. A nandrolona aplicada nas células de Sertoli com perfusão de flutamida desencadeou a despolarização da membrana apresentando o mesmo padrão de

resposta de quando aplicada isoladamente, pois a flutamida não anulou a despolarização (Fig 2.5). Portanto a nandrolona pode estar atuando através de vias não-clássicas por ligação com receptores de andrógenos de membrana (mAR), uma vez que esta resposta é uma resposta rápida e visto que a flutamida não altera a resposta. A catequina despolariza a membrana das células de Sertoli sem alteração no padrão de resposta com a perfusão de flutamida (Fig 2.6). Estes resultados indicam que as catequinas possam realmente estar atuando através de receptores de andrógenos presentes na membrana da célula (mAR) e que os receptores intracelulares (iAR) não são necessários para esta resposta.

Durante a despolarização, a testosterona produz um aumento da resistência da membrana a partir dos 30 segundos de seu efeito, indicando a redução de corrente iônica na membrana (VON LEDEBUR *et al.*, 2002). A aplicação das sulfonilurías, glibenclamida e tolbutamida produzem, na membrana das células de Sertoli, despolarização acompanhada de aumento da resistência (LOSS *et al.*, 2004). Estas sulfonilurías produzem bloqueio dos canais de  $K^+_{ATP}$ , reduzindo a corrente de  $K^+$  na membrana das células e com isso produzem despolarização. Além disso, a perfusão das células com diazoxida (mantém os canais de  $K^+_{ATP}$  abertos) gera hiperpolarização na membrana e impede a ação da testosterona (VON LEDEBUR *et al.*, 2002).

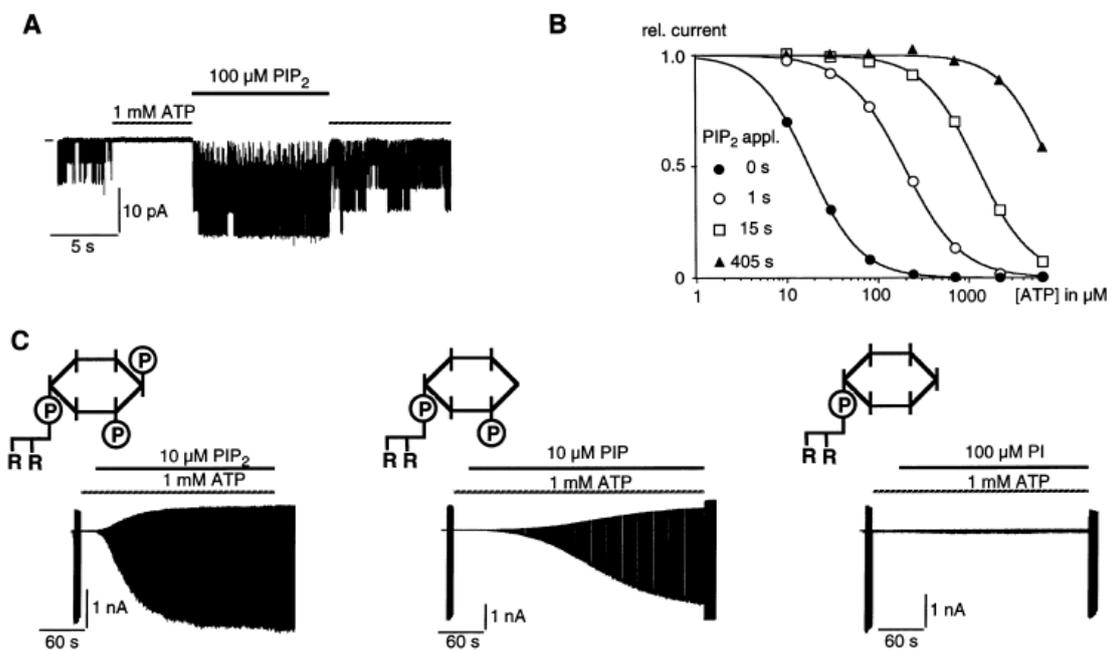
Neste trabalho, foi observado, que o efeito da aplicação da testosterona (1,0 $\mu$ M) sobre o aumento da resistência da membrana nas células de Sertoli é preservado mesmo com a perfusão de flutamida (1,0 $\mu$ M) (Fig 2.7). Concluimos que o padrão da ação despolarizante não-clássica da testosterona não foi modificado pelo bloqueio do receptor intracelular de andrógenos (iAR) com flutamida. Da mesma forma, ocorre despolarização da membrana das células de Sertoli acompanhada de um aumento na resistência da membrana após a aplicação de nandrolona (1,0 $\mu$ M) e de catequina

(1,0 $\mu$ M), reforçando a semelhança do padrão de despolarização destas substâncias com a testosterona (Fig 2.8 e Fig 2.9). O aumento da resistência indica que também há fechamento de canais iônicos na resposta rápida de despolarização da membrana das células de Sertoli na ação da nandrolona e da catequina.

A perfusão de flutamida (1,0 $\mu$ M) também não bloqueou o efeito despolarizante e o aumento de resistência, produzidos por nandrolona (1,0 $\mu$ M) e por catequina (1,0 $\mu$ M) aplicadas topicamente nas células de Sertoli, demonstrando que a ação destas substâncias ocorre de forma semelhante à testosterona quando aplicadas nas células de Sertoli, e que realmente estariam desencadeando efeitos de membrana (Fig 2.10 e Fig 3).

Vários autores afirmam que a testosterona é capaz de modular canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>. Estudos realizados pela técnica de patch-clamp em miócitos cardíacos de coelho demonstram que a testosterona promove o fechamento de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> e seguido de um aumento na condutância de canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à voltagem (DEENADAYALU *et al.*, 2001). Em cérebros de ratos, a testosterona modula canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> nas áreas pré-ópticas e região medial do hipotálamo. Análise por RT-PCR indicou que a castração inibe a expressão de mRNA para subunidade Kir 6.2 de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, enquanto a presença de testosterona induz a expressão da subunidade nestas regiões. A infusão de tobultamida nas regiões do cérebro descritas acima de machos castrados recuperou o comportamento sexual que existe na presença de testosterona. Portanto, o autor sugere que a testosterona modula o comportamento sexual através do fechamento de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (MCDEVITT *et al.*, 2009). Glibenclamida, uma sulfoniluréia que atua na subunidade SUR do canal de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (canais de K sensíveis a ATP) provocando o fechamento deste canal, tem um efeito despolarizante com aumento de resistência na membrana das células de Sertoli (LOSS *et al.*, 2004). Experimentos em células de

Sertoli com perfusão de diazoxida (fármaco que mantém o canal de  $K^+_{ATP}$  aberto) anulou o efeito despolarizante da testosterona nas células de Sertoli, indicando a participação do canal  $K^+_{ATP}$  na resposta despolarizante e que este canal seja o responsável pelo aumento na resistência da membrana após aplicação de testosterona (VON LEDEBUR *et al.*, 2002). WASSERMANN & LOSS, (2004) propõem que este fechamento dos canais de  $K^+_{ATP}$  se deve à depleção de PIP2 na membrana das células de Sertoli, pois esta queda de PIP2 permite que o ATP se ligue na subunidade Kir e atue fechando o canal, baseado em estudos que mostram que PIP2 é capaz de anular a ação do ATP no fechamento do canal de  $K^+_{ATP}$  devido a cargas negativas de PIP2 que repelem o ATP das proximidades do canal na membrana, representado na figura 3.7 (BAUKROWITZ & FAKLER, 2000).



**Figura 3.7.** Efeito de PIP2 nos canais de  $K^+_{ATP}$  que atua diminuindo a sensibilidade do canal ao ATP (BAUKROWITZ & FAKLER, 2000).

Há relatos de que as catequinas em concentrações micromolares, são capazes de modular canais de  $K^+_{ATP}$  em células  $\beta$ -pancreáticas de ratos inibindo a atividade destes canais verificados pela técnica de patch-clamp. No mesmo estudo *in vivo*, a catequina impede a secreção de insulina na presença de glicose, o autor conclui que as catequinas possam interagir em sítios de PIP2 na subunidade Kir do canal de  $K^+_{ATP}$  (JIN *et al.*, 2007).

Com base nas informações de que a testosterona e a catequina possam modular os canais de  $K^+_{ATP}$ , utilizamos a diazoxida (mantém canal o de  $K^+_{ATP}$  aberto) para verificar a participação destes canais na ação da catequina nas células de Sertoli, buscando observar se a despolarização seguida de aumento da resistência da membrana é causada pelo fechamento de canais de  $K^+_{ATP}$  como acontece com a testosterona nestas células. Foi observado que a diazoxida (100 $\mu$ M) inibiu completamente a despolarização causada pela catequina (1,0 $\mu$ M), causando uma leve hiperpolarização, devido ao aumento da corrente de  $K^+$  na membrana da célula. (Fig 3.1)

Esta resposta de hiperpolarização e inibição do efeito despolarizante pela diazoxida (100 $\mu$ M) também foi observada com a aplicação de nandrolona (1,0 $\mu$ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos (fig 3.2). Portanto, a nandrolona e a catequina são capazes de modular canais de  $K^+_{ATP}$ , neste caso fechando os canais de  $K^+_{ATP}$ , indicando a participação destes canais na resposta despolarizante à catequina e à nandrolona nas células de Sertoli de ratos imaturos, da mesma forma que ocorre em resposta à testosterona.

Estudos em macrófagos de camundongos indicam que a testosterona possa estar atuando em um receptor de membrana que está funcionalmente acoplado à alteração da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ , tanto através da corrente em canais de  $Ca^{2+}$  na membrana plasmática, como através da liberação de estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$  do

retículo endoplasmático. Estes dados indicam que esse receptor pertenceria a uma classe de receptores acoplados à proteína G, que atua sobre a enzima PLC (BENTEN *et al.* 1999). Outros estudos mostram que a aplicação de T-BSA (testosterona ligada à albumina sérica), que não se difunde para o interior da célula de macrófagos, provoca a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  (LIU *et al.*, 2005). Essas ações não foram afetadas pela ação de antagonistas do receptor intracelular como a ciproterona ou a flutamida, enquanto que esta ação foi completamente abolida pelo inibidor da PLC (U73122) e pelo bloqueador de proteína G (PTX) *Toxina Pertussis*, indicando que o influxo de cálcio é mediado pela ativação de uma proteína G (tipo Gq) e pela via de sinalização da PLC (fosfolipase C). (LIU *et al.*, 2005). Em estudos de células de Sertoli pela técnica de eletrofisiologia de registro intracelular, foi observado que a despolarização causada pela testosterona sobre as células é inibida pelo bloqueador da PLC (U73122) e pela PTX (toxina pertussis), um bloqueador de proteína G. (LOSS *et al.*, 2004). Com estes dados, acredita-se que a ação não-clássica da testosterona acontece pela ligação do hormônio a um suposto GPCR (receptor acoplado a Proteína G) na membrana, que causa a ativação da PLC, a qual provoca a quebra do fosfatidil inositol 4,5, bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacil glicerol (DAG) (WASSERMANN & LOSS, 2004; KONOPLYA *et al.*, 1992, HEILEN *et al.*, 2002; RAHMAN & CHRISTIAN, 2007). A depleção dos estoques de  $\text{PIP}_2$  da membrana inibe a condutância dos canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP (KirATP), produzindo a despolarização do potencial de membrana e aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (SCHULZE *et al.*, 2003 VON LEDEBUR *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, o aumento de  $\text{IP}_3$ , provocado pela quebra de  $\text{PIP}_2$ , causa a liberação de estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambos efeitos resultam no aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que, por sua vez atua como segundo mensageiro para diversos efeitos sobre as células de Sertoli. Por exemplo, o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{PIP}_2$  podem atuar em oposição na sobre a estabilidade do

citoesqueleto (CHENG& MRUK *et al.*, 2002, JANMEY, 1994), enquanto o  $Ca^{2+}$  despolimeriza filamentos de actina,  $PIP_2$  reage estabilizando estes filamentos, resultando em um controle sobre o movimento das células germinativas que depende desta reestruturação das junções aderentes ligadas à actina que se encontram entre as células de Sertoli e as germinativas (JANMEY, 1994).

Testosterona-BSA e catequina aplicadas em células TD47 (câncer de mama) resultam no mesmo padrão de movimentação do citoesqueleto, com formação de lameliopodia e filopodia, pois elas iniciam a fosforilação das mesmas moléculas de sinalização (PI3K), visto que o inibidor de PI3K reverte o efeito das catequinas e da testosterona-BSA na movimentação do citoesqueleto (NIFLI *et al.*, 2005). Após duas horas, ocorre a apoptose células com o tratamento das células T47D com testosterona-BSA e catequina, reforçando a semelhança na ação das duas substâncias, que resultaram na movimentação do citoesqueleto das células estudadas, e esta movimentação ocorreu em tempos iguais e provocou a apoptose também em momentos semelhantes. Acredita-se que testosterona e catequina possam ser utilizadas de maneira conjugada para o tratamento de câncer (NIFLI *et al.*, 2005). Movimentações do citoesqueleto foram observadas em células endoteliais de aorta bovina após utilização de extratos de semente de uva (rico em polifenóis de catequinas) (KHAN *et al.*, 2002).

A fim de observarmos se as catequinas atuam pela mesma cascata de sinalizações que já foi observada aplicando testosterona nas células de Sertoli por LOSS *et al.*,(2004) utilizamos neste trabalho um inibidor da PLC- U73122 (2,0 $\mu$ M), que foi aplicado por perfusão minutos antes da aplicação tópica de catequina (1,0 $\mu$ M). A perfusão com U73122 anulou o efeito despolarizante da catequina, assim como acontece com a testosterona (Fig 3.3). Podemos postular que as catequinas utilizam a mesma via de sinalização nas células de Sertoli, estas evidências comprovam cada vez mais, que as

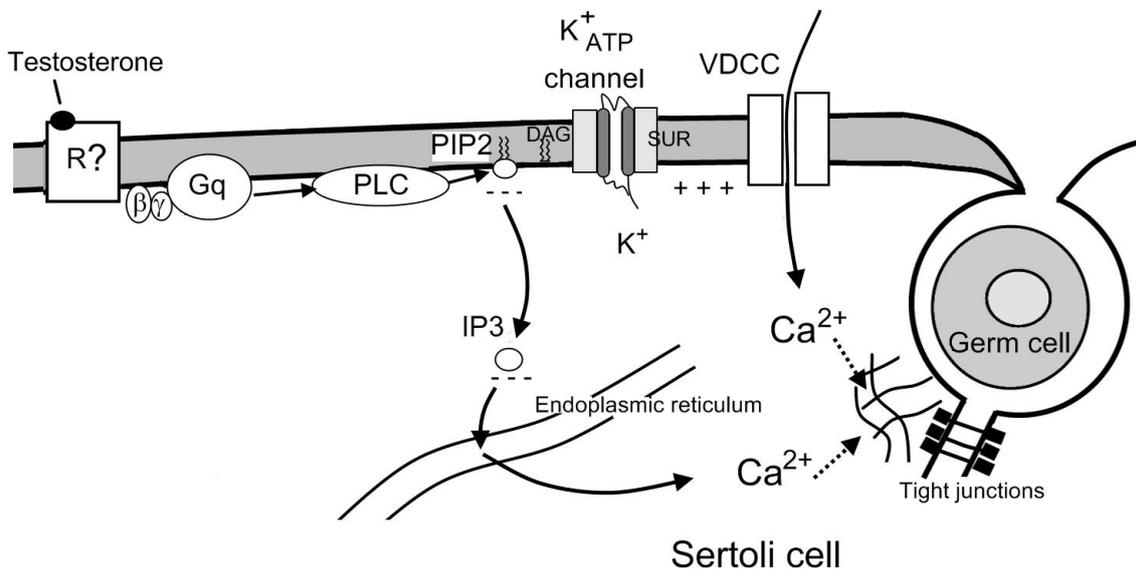
catequinas realmente possam estar agindo sobre o mesmo receptor que a testosterona e ativando as mesmas enzimas para produzirem os efeitos de despolarização nestas células.

Verificamos também a resposta das células de Sertoli na aplicação de Nandrolona (1 $\mu$ M) após a perfusão de U73122 (2 $\mu$ M). A Nandrolona não produziu despolarização ao bloqueio da PLC, (fig 3.4) indicando que este hormônio sintético derivado da testosterona possui ação semelhante à própria testosterona, não só na ação clássica, mas também nas ações rápidas não-clássicas, atuando na ativação das mesmas enzimas e mesma via de sinalização para produzirem a despolarização da membrana das células de Sertoli.

A testosterona promove um aumento no influxo de cálcio, como observado em macrófagos de camundongos, células LNCap (câncer de próstata) (SUN *et al.*, 2006; BENTEN *et al.* 1999). Nas células de Sertoli há expressão de pelo menos quatro tipos de canais de cálcio sensíveis à voltagem (tipo L, N, P/q e T) (FRAGALE, *et al.* , 2000). A testosterona é capaz de estimular o influxo de cálcio em menos de 5 minutos (MIRANDA *et al.*,1998). Até mesmo testosterona-BSA que não é difundida para dentro da célula promove o influxo de cálcio nas células de Sertoli, provavelmente devido a ações em receptores de andrógenos presentes na membrana (GORCZYNSKA & HANDELSMAN, 1995).

Decidimos neste trabalho verificar se há influxo de cálcio nas células de Sertoli por ação das catequinas e nandrolona e nosso estudo constatou que catequina (1,0 $\mu$ M) e nandrolona (1,0 $\mu$ M) estimulam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  pelas células de Sertoli (Fig 3.5 e Fig 3.6) e que estão de acordo com a via da PLC, pois, após o fechamento de canais de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ , a despolarização da célula é capaz de ativar o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensível à voltagem, o que pode explicar o aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Portanto, os efeitos rápidos de

despolarização de catequina e nandrolona se aproximam cada vez mais da ação da testosterona nas células de Sertoli, e que provavelmente, o andrógeno sintético nandrolona e o flavonóide catequina estejam atuando em receptores de andrógenos presentes na membrana (mAR). É possível que este receptor seja realmente um GPCR (proteína Gq) que ativa a PLC, da mesma maneira que o mecanismo proposto para a testosterona (Fig 3.8) (WASSERMAN & LOSS, 2004).



**Figura 3.8.** Representação esquemática do mecanismo de ação da testosterona na membrana de células de Sertoli. A ligação da testosterona aos receptores de membrana ativa a PLC através de uma proteína Gq. A PLC quebra PIP2 em IP3 e DAG, e a depleção de PIP2 na membrana inibe a condutância através do canal de K<sup>+</sup>-ATP devido a um desequilíbrio de carga iônica. O fechamento de canais de K<sup>+</sup>-ATP despolariza a membrana da célula e ativam canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L (VDCC) que aumentam o influxo de Ca<sup>2+</sup>. Ao mesmo tempo, IP3 libera Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático. (LOSS *et al.*, 2011)

### 4.3. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a testosterona produz despolarização na membrana das células de Sertoli de modo independente do receptor intracelular de andrógenos (iAR), pois, o bloqueio do receptor intracelular não altera o efeito despolarizante da testosterona, isolando um efeito de membrana da testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos.

Observamos que a catequina e a nandrolona possuem uma ação despolarizante sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos Wistar imaturos. Nandrolona produziu uma despolarização mesmo com o bloqueio do receptor intracelular pela flutamida, portanto este hormônio também pode estar atuando em receptores de andrógenos presentes na membrana (mAR).

O flavonóide catequina possui ação despolarizante mesmo com o bloqueio do receptor intracelular de andrógeno (iAR), e pode estar atuando por um receptor de membrana na membrana (mAR).

Há semelhança no padrão de despolarização entre nandrolona, catequina e testosterona, e há aumento na resistência da membrana, indicando o fechamento de canais iônicos. Este aumento de resistência produzido pela testosterona, nandrolona e catequinas não foi modificado com a perfusão de flutamida. A utilização de diazoxida que mantém os canais de  $K^+_{ATP}$  abertos, anulou o efeito da nandrolona e da catequina. Este resultado indica que a despolarização e o aumento na resistência da membrana ocorrem através do fechamento dos canais de  $K^+_{ATP}$ , assim como já havia sido observado para a testosterona.

O presente estudo também observou que além da semelhança na modulação de canais de  $K^+_{ATP}$ , nandrolona e catequina também atuam pela mesma via de sinalização

que a testosterona, a via da PLC. O bloqueio da enzima PLC com U73122 anula a despolarização da membrana das células de Sertoli produzida pela nandrolona e catequina.

A nandrolona e catequina aumentam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , indicando que há influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , efeitos já observados na ação da testosterona nas células de Sertoli. Portanto, há semelhança na via de sinalização utilizada pela nandrolona e catequina, com a via utilizada pela testosterona. As ações dessas substâncias são independentes do receptor de andrógenos intracelular, possivelmente por estar agindo em um receptor presente na membrana da célula.

#### 4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alen M, Reinila M, Vihko R. Response of serum hormones to androgen administration in power athletes. **Med Sci Sports Exerc**, (1985); 17:354–9.
2. Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans:A Need to Revisit? **J Androl**, (2008); 29 (5); 469–487.
3. Andrade TU, Santos MCS, Busato VCW, Medeiros ARS, Abreu GR, Moysés MR, Bissoli NS. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. **Arch Med Res**, (2008); 39(1):2732.
4. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J A view of SUR/KIR6.x, KATP channels. **Annu Rev Physiol**, (1998); 60:667–687.
5. Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Curr Opin Pharmacol**. (2004); 4(6):614-20.
6. Baker PJ, O’Shaughnessy PJ Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. **Reproduction**, (2001); 122:227–234.
7. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**. (2001); 86(11):5108-17.
8. Benten WPM, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **FASEB J**, (1999); 13: 123-33.
9. Benten WPM, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. **Mol Cell Biol**, (1999); 10: 3113-23.
10. Beutel A, Bergamaschi CT, Campos RR. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, (2005); 93:43-48.
11. Bonetti A, Tirelli F, Catapano A et al. Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. **Int J Sports Med**, (2008); 29: 679–87.
12. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, and Klinge CM Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, (2000) 141:3657–3667.

13. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. **Nat Rev Genet** . (2004); 5:509–21.
14. Bucher G, Berger DS, Fields-Gardner C, Jones R, Reiter WM. A prospectivestudy on the safety and effect of nandrolone decanoate in HIV positivepatients. **Proc of the 11th Int Conf on AIDS**, (1996); 26.
15. Camargo IC, Gaspar AL, Frei F, Mesquita Sde F. Effects of androgenic anabolic steroids on the uterus and reproductive parameters of adult female rats. **Rev Bras Ginecol Obstet**. (2009); (9):453-60
16. Cato AC, Nestl A & Mink S Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Science’s Signal Transduction Knowledge Environment**, (2002); RE9.
17. Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. **Proc Natl Acad Sci USA** (2004); 101:6876–6881.
18. Cheng CY, Mruk DD. Cell junctions dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiol Rev**, (2002); 82: 825-874
19. Cheng J, Simon C. Watkins, and William H. Walker Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Src Kinase and the Epidermal Growth Factor Receptor in Sertoli Cells. **Endocrinology**, (2007); 148(5):2066–2074.
20. Cheng Ye Mruk DD. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development **Physiol Rev**, (2002); 82;825-874.
21. Christian, H.C. et al. Non-genomic actions of testosterone on a subset of lactotrophs in the male rat pituitary. **Endocrinology** (2000); 141,3111–3119.
22. Clarck AS, Henderson LP. Behavioral and physiological responses to anabolicandrogenic steroids. **Neurosci Biobehav**, (2003); 27:413-36.
23. Colin G. Nichols. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**, (2006); 440-23.
24. Conway AJ, Handelsman DJ, Lording DW, Stuckey B, Zajac JD. Use, misuse and abuse of androgens. **Med J Aust**. (2000); 3;172(7):334.
25. Counis R, Laverrière Jn, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler MI, Magre S. Gonadotropin-Releasing Hormone And The control of gonadotrope function **Reprod. Nutr. Dev**. (2005); 45; 243-254.

26. Daayf (Eds.), **Polyphenols 2002: Recent Advances in Polyphenols Research. Groupe Polyphenols**, (2002); pp. 62– 93.
27. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Le´cureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, (2004); 101:1327–1332.
28. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X & Garcia AJ Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology** (2001); 281, H1720–H1727.
29. Dickerman RD, McConathy WJ, Zachariah NY. Testosterone, sex hormone-binding globulin, lipoproteins, and vascular disease risk. **J Cardiovasc Risk**, (1997);4:363–6.
30. Dore S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. **Neurosignals**, (2005); 14:61–70.
31. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. **Science**, (1998); 280:69–77
32. Edwards, G. & Weston, A.H. The pharmacology of ATPsensitive potassium channels. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, (1993); 33,597±637.
33. Enkvetchakul, D. & Nichols, C. Gating mechanism of KATP channels: function fits form. **J. Gen. Physiol**, (2003); 122, 471–480.
34. Enkvetchakul, D., Loussouarn, G., Makhina, E., Shyng, S. L. & Nichols, C. G. The kinetic and physical basis of KATP channel gating: toward a unified molecular understanding. **Biophys. J**, (2000); 78, 2334–2348.
35. Er F, Michels G, Brandt MC, Khan I, Haase H, Eicks M, Lindner M, Hoppe UC. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca<sup>2+</sup> sparks: acute actions antagonize chronic effects. **Cell Calcium**, (2007); 41, 467–477
36. Eva C. Creutzberg, PhD; Emiel F. M. Wouters, PhD; Rob Mostert, MD; Rob J. Pluymers, MD; Annemie M. W. A Role for Anabolic Steroids in the Rehabilitation of Patients With COPD? A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. **Chest**; (2003); 124;1733-1742.
37. Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **Am J Sports Med** (2004); 32:534—42.
38. Farber HW, Loscalzo J. Mechanisms of disease. Pulmonary arterial hypertension. **N Engl J Med**, (2004); 351:1655-65.20

39. Ferris HA; Shupnik MA. Mechanisms For Pulsatile Regulation Of The Gonadotropin Subunit Genes By GnRH. **Biol Reprod.** (2006); 74, 993-998.
40. Fine A.M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications, **Altern. Med. Rev.**, (2000); 51;44– 151.
41. Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. **Proc Natl Acad Sci USA**; (2004); 101:10919–24.
42. Foradori C.D., Weiser M.J., Handa R.J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology.** (2008); 29:169–181.
43. Fragale A, Aguanno S, Kemp M, Reeves M, Price K, Beattie R, Craig P, Volsen S, Sher E & D'Agostino A Identification and cellular localisation of voltage-operated calcium channels in immature rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology** (2000); 162 25–33.
44. Gao S, Liu GZ, and Wang Z. Modulation of androgen receptor-dependent transcription by resveratrol and genistein in prostate cancer cells. **Prostate**, (2004); 59:214–225.
45. Gennari, C., Agnusdei, D., Gonnelli, S. Effects of nandrolone decanoate therapy on bone mass and calcium metabolism in women with established postmenopausal osteoporosis: a doubleblind placebo-controlled study. **Maturitas**, (1989); 11, 187-197.
46. Gold J, Batterham MJ, Rekers H, Harms MK, Geurts TBP, Helmyr PME, Mendonc J Silva, Carvalho LH, Panos G, Pinchera A, Aiuti F, Lee C, Horban A, Gatell J, Phanuphak P, Prasithsirikul W, Gazzard B, Bloch M, Danner SA. Effects of nandrolone decanoate compared with placebo or testosterone on HIV-associated wasting. **HIV Medicine**, (2006); 7, 146–155.
47. Gold J, High HA, Li Y, Michelmore H, Bodsworth NJ, Finlayson R, Furner VL, Allen BJ, Oliver CJ Safety and efficacy of nandrolone decanoate fortreatment of wasting in patients with HIV infection. **AIDS**, (1996); 10:745–752.
48. Gorczyńska E & Handelsman DJ Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology** (1995); 136 2052–2059.
49. Gorczyńska, E. & Handelsman, D. J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology**, (1995); 136, 2052–2059.
50. Hamdy RC, Moore SW, Whalen KE, Landy C. Nandrolone decanoate for men with osteoporosis. **Am J Ther. Mar**; (1998); 5(2):89-95.
51. Han DH, Chae MR, Jung JH, So I, Park JK, Lee SW. Effect of testosterone on potassium channel opening in human corporal smooth muscle cells. **J Sex Med.** (2008); Apr;5(4):822-32. Epub 2008 Jan 17.

52. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med (Auckland, NZ)** (2004); 34:513–54.
53. Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. **Endocrinology**, (2003); 144:509–517.
54. Heilen CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in non-genomic androgen actions. **Mol Endocrinol**, (2002); 16: 2181-2187.
55. Hoffman JR, Ratamess NA. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? **J Sports Sci Med**. (2006); 5(2):182-93.
56. Holdcraft RW, Braun RE Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. **Development**, (2004); 131:459–467.
57. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, and Yang CS. Mechanism of action of (–)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. **Cancer Res**, (2005); 65:8049–8056.
58. Ishak, K.G., Zimmerman, H.J. Hepatotoxic effects of the anabolic/androgenic steroids. **Semin Liver Dis**. (1987); 7, 230-236.
59. Jan LY, Jan YN Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. **Annu Rev Physiol**, (1992); 54:537–555.
60. Janmey PA. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. **Annu Rev Phys.**(1994); 56: 169-191.
61. Jänne OA. Androgen interaction through multiple steroid receptors. In: Lin G, Erinoff L (eds). *Anabolic Steroid Abuse*, National Institute of Drug Abuse Research Monograph Series. **US Department of Health and Human Services, Rockville**, (1990);178–86.
62. Jarow, J. P., Chen, H., Rosner, T. W., Trentacoste, S. & Zirkin, B. R. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. **J. Androl.** (2001); 22, 640–645.
63. Jarow, J. P., Wright, W. W., Brown, T. R., Yan, X. & Zirkin, B. R. Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men. **J. Androl.** (2005); 26, 343–348.
64. Jegou B The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **Int Rev Cytol** (1993); 147; 25-96.

65. Jegou, B The Sertoli cell. **Baillieres Clin Endocrinol Metab** ,(1992); 6:273–311.
66. Jin JY, Park SH, Bae JH, Cho HC, Lim JG, Park WS, Han J, Lee JH, Song DK. Uncoupling by (–)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. **Pharmacological Research** (2007); 56 237–247.
67. Jin JY, Park SH, Bae JH, Cho HC, Lim JG, Park WS, Han J, Lee JH, Song DK. Uncoupling by (–)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. **Pharmacol Res.** (2007); Sep;56(3):237-47.
68. Johnson L, Donald L. Thompson Jr , Dickson D. Varner Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science** (2008); 105: 23–51.
69. Johnson L, Thompson DL Jr, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Anim Reprod Sci.** Apr,(2008); 105(1-2):23-51.
70. Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, Shaughnessy PJO. Regulation Of Sertoli Cell Number And Activity By Follicle-Stimulating Hormone And Androgen During postnatal Development In The Mouse. **Endocrinology**, (2004); 145(1);318-329.
71. Jones RD, Hugh Jones T, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. **Eur. J. Endocrinol.** (2004); 151, 29–37
72. Jun-Yup Jin, Sung-Hee Park, Jae-Hoon Bae, Ho-Chan Cho, Jeong-Geun Lim, Won Sun Park, Jin Han, Jin Ho Lee, Dae-Kyu Song. Uncoupling by (–)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP. **Pharmacological Research** (2007). 56 237–247
73. Kadi F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. **Br J Pharmacol.** (2008); 154(3):522-8.
74. Kakei M. Receptor-operated regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels via membrane phospholipid metabolism. **Curr Med Chem**, (2003);10: 235-243.
75. Kampa M, Papakonstanti EA, Hatzoglou A, Stathopoulos S, Stournaras C, Castanas E..The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. **FASEB J**; (2002);16: 1429-31.

76. Kampa M., Nistikaki A., Hatzoglou A., Kouimtzooglou H., Boskou D., Vercauteren J., Gravanis A., Castanas E.. Phenolic acids and polyphenols are potent inhibitors of cancer cell proliferation: assessment and mechanisms of action, in: I. El-Hadrami, F.
77. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. **Endocrinology**, (2000); 141:980–7.
78. Khan N.Q, Lees D.M., . Douthwaite J.A, Carrier M.J., . Corder R, Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells, **Clin. Sci.** (Lond.) 103 (Suppl. 48) (2002); 72S–75S.
79. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol**, (2008); 154(3):502-21.
80. Konoplya EF, Poppof EH. Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membrane. **Int J Biochem**, (1992); 24: 1979-1983
81. Kuhn CM. Anabolic steroids. **Recent Progr Horm Res.** (2002); 57:411-34.
82. Lee, S.-R., Suh, S.-I. and Kim, S.-P., Protective effects of the green tea polyphenol (2)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils, **Neurosci. Lett.**, (2000); 287 191±194.
83. Leite L, Luchi R, von Ledebur EICF, Loss ES, Wassermann GF. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. **Med Sci Res**, (1999); 27: 25-28.
84. Lenders JW, Demacker PN, Vos JA et al. Deleterious effects of anabolic steroids on serum lipoproteins, blood pressure, and liver function in amateur body builders. **Int J Sports Med** (1988); 9:19–23.
85. Levine JE. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRh) In: Encyclopedia Of Hormones. **Elsevier Science Usa**, (2003); 909-914.
86. Li, L., Wang, J. & Drain, P. The I182 region of Kir6.2 is closely associated with ligand binding in KATP channel inhibition by ATP. **Biophys. J**, (2000); 79, 841–852
87. Lieberherr M, Grosse B. Androgen increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. **J Biol Chem**,(1994); 269: 7217-23.
88. Liu L., Zhao Y., Wang Y., Li Q., Wang Z., Wang L., Qiao Z. Testosterone induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in bone marrow-derived macrophages via surface binding sites, Methods Find. Exp. **Clin. Pharmacol.** (2005), 27 623–628.

89. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. **Nature**, (1995); 372:366–369.
90. Loss ES, Jacobson M, Costa ZSM, Jacobus AP, Borelli F, Wassermann GF. Testosterone modulates K<sup>+</sup>ATP channels in Sertoli cell membranes via the PLC-PIP2 pathway. **Horm Metab Res**, (2004); 36:519–25.
91. Loss ES, Jacobus AP, Wassermann GF. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by Follicle Stimulating Hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes. **Life Science**, (2011); (impress).
92. Lydia Aguilar-Bryan and Joseph Bryan. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. **Endocr. Rev**, (1999); 20: 101-135
93. Lyng FM, Jones GR, Rommerts FFG. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: Similar biphasic responses between one picomolar and 100 nanomolar concentrations. **Biol Reprod**, (2000); 63:736–47.
94. Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. **Biol. Reprod.** (2003);68, 1087–1097.
95. Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. **Toxicol Lett.** (2005); 158(3):167-75.
96. Markworth, E., Schwanstecher, C. & Schwanstecher, M. ATP<sub>4</sub><sup>-</sup> mediates closure of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. **Diabetes**, (2000); 49, 1413–1418.
97. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP. (1993) GnRH Pulses-The Regulators Of Human Reproduction. **Trans Am Clin Climatol Assoc.** 104:31-46.
98. McDevitt MA, Thorsness RJ, Levine JE. A role for ATP-sensitive potassium channels in male sexual behavior. **Horm Behav.** (2009); Feb;55(2):366-74.
99. McLachlan, R. I., Wreford, N. G., O'Donnell, L., de Kretser, D. M. & Robertson, D. M. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **J. Endocrinol.** (1996); 148, 1–9.
100. McLaren A. Gonad development: assembling the mammalian testis. **Curr Biol**, (1998); Feb 26; 8(5):R175-7.
101. Menard CS, Harlan RE. Up-regulation of androgen receptor immunoreactivity in the rat brain by androgenic-anabolic steroids. **Brain Res**, (1993); 622:226–36.

102. Michels, G. et al. Long term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. **Endocrinology**, (2006); 147, 5160–5169.
103. Mikhailov, M. V. et al. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2–SUR1. **EMBO J**, (2005); 24, 4166–4175.
104. Miranda MJ, Liedke PER, Leite L, Loss ES, Wassermann GF. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. *Med Sci Res* 1998; 26: 703-706
105. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Nutr**, (2001); 131:27–32.
106. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocr Rev**, Oct; (2004); 25(5):747-806.
107. Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Szekeres T, and Jager W. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. **Bioorg Med Chem**, (2004); 12:5571–5578
108. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. **Annu Rev Physiol**, (1997); 59:171–191.
109. Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. **Circ Res**, (1996); 78:1–7
110. Nifli AP, Bosson-Kouamé A, Papadopoulou N, Kogia C, Kampa M, Castagnino C, Stournaras C, Vercauteren J, Castanas E. Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. **Exp Cell Res**. (2005); 309 (2):329-39.
111. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? **Endocrinology** (2006); 147(3):1166-1174.
112. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, (1988); 122:787–94.
113. Papaioannou M, Pitetti J, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar C, Descombes P, Zdobnov E, Michael T, McManus, Guillou F, Harfe B, Yan W, Jégou B, and Nef S. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. **Dev Biol**, (2009); 326(1): 250–259.

- 114.Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stournaras C. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. **Mol Endocrinol**, (2003); 17: 870-81.
- 115.Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K1 channel studied by EPR spectroscopy. **Nat Struct Biol**, (1998); 5:459–469.
- 116.Perry PJ, Lund BC, Deninger MJ, Kutscher EC, Schneider J. Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey of drug utilization. **Clin J Sport Med**. (2005); 15(5):326-30.
- 117.Phillips DJ, de Kretser DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. **Front. Neuroendocrinol**. (1998); Oct; 19(4):287-322.
- 118.Pluciennik F., Verrecchia F., Bastide B., Herve J.C., Joffre M., Deleze J. Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes, **J. Membr. Biol**. (1996); 149 169–177.
- 119.Pointis G, Gilleron J, Carette D, and Segretain D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. **Phil. Trans. R. Soc**, (2010); 365, 1607-1620.
- 120.Pongs O. Structure-function studies on the pore of potassium channels. **J Membr Biol**, (1993); 136:1–8.
- 121.Proks, P., Gribble, F. M., Adhikari, R., Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. Involvement of the N-terminus of Kir6.2 in the inhibition of the KATP channel by ATP. **J. Physiol. (Lond.)**, (1999); 514, 19–25.
- 122.Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, (2007);18: 371-378.
- 123.Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. **J Biol Chem**, (2003); 278:2701–2712.
- 124.Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. (1990) Clearwater, FL: **Cache River Press**.
- 125.Russell LD. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. **In: The Sertoli cell. GriswoldMD, Russell LD (eds.). Cache River Press, Clearwater**, (1993); 365–390.
- 126.Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. **Endocrinology**, (1990); 127:3180–6.

- 127.Sardar P, Jha A, D Roy, U Majumdar, Guha P, S Roy, R Banerjee, AK Banerjee, Bandyopadhyay D.. Therapeutic effects of nandrolone and testosterone in adult male HIV patients with AIDS wasting syndrome (AWS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.**Clin Trials HIV**, (2010); 11 (4) :220-9.
- 128.Schlussman SD, Zhou Y, Johansson P et al. Effects of the androgenic anabolic steroid, nandrolone decanoate, on adrenocorticotropin hormone, corticosterone and proopiomelanocortin, corticotropin releasing factor (CRF) and CRF receptor1 mRNA levels in the hypothalamus, pituitary and amygdala of the rat. **Neurosci Lett**, (2000); 284:190–4.
- 129.Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukowitz T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP2 site in the N terminus. **J Biol Chem** (2003); 278:10500-5.
- 130.Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. **In: The Physiology of Reproduction**. Knobil E, Neill J, (eds). 2nd ed. New York: Raven Press, (1994) 1363-1434.
- 131.Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD, editors. The physiology of reproduction. **New York: Raven Press**, (1994); 1363–434.
- 132.Shupe J, Cheng J, Puri P, Kostereva N, Walker WH. Regulation of sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. **Mol Endocrinol**. (2011); Feb;25(2):238-52.
- 133.Silva FRMB, Leite LD & Wassermann GF. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, (2002); 147.425–433.
- 134.Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Rev**, (1991); 12 45-77.
- 135.Song RX-D, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Saten RJ Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER<sub>α</sub>-Shc association and Shc pathway activation. **Mol Endocrinol** (2002); 16:116–127.
- 136.Sun Y-H, Gao X, Tang Y-J, Xu C-L, Wang L-H. Androgen induce increase in intracellular calcium via a G protein-coupled receptor in LNCaP prostate cancer cells. **J Androl**; (2006); 27: 671-678.
- 137.Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, and Yamada K A receptor for green tea polyphenol EGCG. **Nat Struct Mol Biol**, (2004); 11:380–381.
- 138.Tomoo H, Keiji H, Yukihiko H, Yoshifumi K. Tea catechin, (2)-epigallocatechin gallate, causes membrane depolarizations of myenteric neurons in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience Letters** (2001); 309 93±96.
- 139.Trube G, Hescheler J. Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, (1983); 322:R64.

140. Trube, G., Rorsman, P. & Ohno-Shosaku, T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sub>1</sub> channel in mouse pancreatic b-cells. **Pflügers Arch.** (1986) 407, 493±499.
141. Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annu. Rev. Biochem.** (1994); 63, 451–486.
142. Vergouwen R PFA, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JAG, de Rooij DG. Postnatal development of testicular populations in mice. **J Reprod Fertil**, (1993); 99:479-485
143. Verhoeven. G, Willems. A, Denolet. E, Johannes V. Swinnen, Gendt. K.D. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. **Phil. Trans. R. Soc. B** (2010); 365, 1537–1556.
144. Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S Testosterone induces an intracellular calcium increase by a non-genomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. **Endocrinology**, (2006); 147, 1386–1395.
145. Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a non-genomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. **Endocrinology** (2006); 147, 1386–1395
146. Von Ledebur, E. I., Almeida, J. P., Loss, E. S. & Wassermann, G. F. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels. **Horm. Metab.** (2002); Res. 34, 550–555.
147. Walker H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis **Phil. Trans. R. Soc**, (2010); 365, 1557-1569.
148. Walker w. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids.** (2008); 74:602–607
149. Walker, W. H. & Cheng, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, (2005); 130, 15–28.
150. Walker, W. H. Nongenomic actions of androgen in Sertoli cells. **Curr. Top. Dev. Biol.** (2003) 56, 25–53.
151. Wassermann GF, Loss ES. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a KIR6.x channel related effect. **Curr Pharm Des**, (2004); 10: 2649-2656
152. Kronenberg H M, Melmed S, Polonsky S K, Larsen P R. Williams Textbook of Endocrinology, 11th ed. (2008); pg. 645
153. Wislon, J.D., Griffin, J.E. The use and misuse of androgens. **Metabolism.** (1980); 29, 1278-1295.

154. Wong, C. H. & Cheng, C. Y. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data. **Dev. Biol.** (2005); 286, 1–15.
155. Wu FCW. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clin Chemistry**, (1997); 43(7):1289-92.
156. Wu FCW. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clin Chemistry**. (1997); 43(7):1289-92.
157. Yamada, Y. Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. **Brain Res.** (1979); 172, 165–168.
158. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. **Circulation**, (1995); 91, 1154–1160
159. Zhou M, He HJ, Tanaka O, Sekiguchi M, Kawahara K, Abe H. Different Localization of ATP Sensitive K(+) Channel Subunits in Rat Testis. **Anat Rec (Hoboken)**, (2011); Feb 15. doi: 10.1002/ar.21348.
160. Zirkin, B. R., Santulli, R., Awoniyi, C. A. & Ewing, L. L. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology** (1989); 124, 3043–3049.