

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

Efeito do quelante de zinco na resposta eletrofisiológica da testosterona e do decanoato de nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos

Rajla Bressan Simonetti

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloísa da Silveira Loss

Porto Alegre

2017

Rajla Bressan Simonetti

Efeito do quelante de zinco na resposta eletrofisiológica da testosterona e do decanoato de nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloísa da Silveira Loss

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sirlei e Custodio, por tudo e mais um pouco.

À minha família pelo incentivo. Em especial, ao Sullivan e à Camila pela amizade.

Aos meus amigos. Em especial, à Belize, amiga e companheira de café.

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

Ao professor Guillermo Federico Wasserman pelo legado científico e estrutural.

À Luciana Abreu pela presença constante e ajuda inestimável.

Aos colegas do LABENEX Gustavo Escott, Jéssica da Silva e Monica do Nascimento pela ajuda.

Ao CREAL pela constante disposição.

Ao CNPq e PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro.

À UFRGS pela oportunidade.

RESUMO

As células de Sertoli são células fundamentais que fornecem fatores essenciais para a progressão da espermatogênese. Do período fetal ao imaturo, as células de Sertoli estão proliferando. A via não-clássica dos androgênios é caracterizada por rápido evento que conduz à ativação de cascatas de sinalização citosólicas desencadeadas por receptores de membrana. Diferente dessa, na via clássica são necessárias horas ou até mesmo dias para a produção de novas proteínas. Existe um receptor de membrana específico para os andrógenos que estimula a cascata de sinalização não-clássica nas células de Sertoli por interação com o ZIP9, um transportador de zinco.

Esse estudo teve por objetivos: avaliar o envolvimento do receptor ZIP9 nos efeitos de membrana de células de Sertoli produzidos em resposta à aplicação de testosterona ou de nandrolona. Avaliar o papel do quelante de zinco (TPEN), nas concentrações 10 nM, 20 nM e 40 nM, sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos e avaliar o papel do quelante de zinco (TPEN), nas concentrações 10 nM, 20 nM e 40 nM, sobre a resposta eletrofisiológica da testosterona e da nandrolona em túbulos seminíferos isolados de testículos de ratos imaturos.

O potencial e a resistência de membrana das células de Sertoli foram registrados através da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. O registro intracelular da célula de Sertoli foi realizado utilizando microcapilares de borossilicato preenchidos com KCl 3 M acoplados a um eletrômetro. Nos túbulos seminíferos de animais entre o 12º e o 15º dpn foram aplicados e/ou perfundidos, DMSO (veículo) n = 8; quelante de zinco (TPEN) nas concentrações 10 nM n = 7; 20 nM n = 6; e 40 nM n = 8; Testosterona (T) 1 µM n = 15; T + TPEN 10 nM n = 10; T + TPEN 20 nM n = 9; T + TPEN 40 nM n = 7; Nandrolona (N) 1 µM n = 19; N + TPEN 10 nM n = 13; N + TPEN 20 nM n = 12; N + TPEN 40 nM n = 9. Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRGS nº 29644.

A aplicação tópica de DMSO e a perfusão de TPEN nas diferentes concentrações não altera o potencial de membrana de células de Sertoli. A aplicação tópica de T e de N resultou em despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli e em aumento da resistência da membrana de células de Sertoli. A aplicação tópica da T e da N em meio com perfusão de TPEN, nas concentrações 10 nM, 20 nM e 40 nM, não alterou o potencial de membrana e a resistência da membrana de células de Sertoli de ratos imaturos.

Concluimos que o quelante de zinco afeta o receptor de membrana de andrógenos na membrana de células de Sertoli de ratos entre o 12º e o 15º dpn. E podemos inferir que há envolvimento do ZIP9 nos efeitos de membrana de células de Sertoli produzidos em respostas à aplicação de T e de N.

ABSTRACT

Sertoli cells are key cells that provide essential factors for the progression of spermatogenesis. From the fetal to the immature period, Sertoli cells are proliferating. The non-classical signaling pathway is characterized by a rapid event that leads to the activation of cytosolic signaling cascades triggered by membrane receptors. On the other hand, in the classical pathway it takes hours or even days are necessary for the production of new proteins. There is an androgen-specific membrane receptor that stimulates the non-classical signaling cascade in Sertoli cells by interaction with ZIP9, a zinc transporter.

This aim of this study was to evaluate the involvement of the ZIP9 receptor in the membrane effects of Sertoli cells produced in response to the application of testosterone or nandrolone. Also, to evaluate the role of zinc chelator TPEN at 10 nM, 20 nM and 40 nM concentrations on the membrane potential of Sertoli cells from immature rats and to evaluate the role of zinc chelator TPEN in 10 nM, 20 nM and 40 nM concentrations in the electrophysiological response of testosterone and nandrolone in seminiferous tubules isolated from testes of immature rats.

The membrane potential and membrane resistance of Sertoli cells were recorded using a standard single microelectrode technique. The intracellular recording of Sertoli cells was performed using microcapillaries filled with 3 M KCl coupled to an electrometer. In the seminiferous tubules of animals between post-natal day (pnd) 12 and 15 were applied and/or perfused, DMSO (vehicle) n = 8; Zinc chelator (TPEN) at concentrations of 10 nM n = 7; TPEN 20 nM n = 6; and TPEN 40 nM n = 8; Testosterone (T) 1 μ M n = 15; T + TPEN 10 nM n = 10; T + TPEN 20 nM n = 9; T + TPEN 40 nM n = 7; Nandrolone (N) 1 μ M n = 19; N + TPEN 10 nM n = 13; N + TPEN 20 nM n = 12; N + TPEN 40 nM n = 9. For statistical analyses it was used ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni post-test. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of UFRGS (CEUA/UFRGS n° 29644).

Topical application of DMSO and perfusion of TPEN at different concentrations did not cause membrane potential depolarization of Sertoli cells. Topical application of T and N cause membrane potential depolarization of Sertoli cells and increased the cell resistance of Sertoli cells. Topical application of T and N in TPEN infusion at concentrations of 10 nM, 20 nM and 40 nM did not cause membrane potential depolarization and the cell resistance of the Sertoli cell membrane of immature mice. In summary, zinc chelator affects the androgen membrane receptor on the Sertoli cell membrane of rats between pnd 12 and 15. We can infer that there is the involvement of the ZIP9 in the membrane effects of Sertoli cells produced in response to T and N.

LISTA DE ABREVIATURAS

- $^{45}\text{Ca}^{2+}$: isótopo radioativo de cálcio
- AMH: hormônio anti-mülleriano
- BHT: barreira hematotesticular
- Ca^{2+} : íon cálcio
- CASR: receptor sensível ao cálcio
- CGP: células germinativas primordiais
- CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
- CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
- DAG: 1,2-diacilglicerol
- DHT: 5α -diidrotestosterona
- DMSO: dimetilsulfóxido
- dpn: dia pós-natal
- EGF: fator de crescimento epidermal
- ERK: proteína cinase regulada por sinais extracelulares
- FSH: hormônio folículo-estimulante
- GnRH: hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofina
- GPCR: receptor acoplado à proteína G
- GPER-1: receptor de estrogênio acoplado à proteína G
- HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*
- I: corrente (A- ampère)
- iAR: receptor intracelular de andrógenos
- ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
- IP_3 : inositol-3,4,5-trifosfato
- IRT: transportador regulado por metal
- K^+ : íon potássio
- K^+_{ATP} : canal de potássio sensível ao ATP
- KCl: cloreto de potássio
- kDa: quilodalton
- LDH-A: lactato desidrogenase-A
- LH: hormônio luteinizante

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno
mAR: receptor de membrana de andrógenos
mM: milimolar
mPR: receptor de membrana para progesterona
MΩ: megaohms
N: decanoato de nandrolona
nA: nanoampére
nM: nanomolar
pH: potencial hidrogeniônico
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLC: fosfolipase C
PM: peso molecular
PMC: células mioides peritubulares
PTX: toxina pertussis
R: resistência
T: testosterona
TPEN: N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
V: volts
VDCC-L: canal de cálcio dependente de voltagem tipo L
ZIP: transportador de zinco semelhante à IRT
ZRT: transportador regulado por zinco
Ω: ohms
μM: micromolar

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gônada masculina

Os testículos são órgãos pareados, ovoides e encapsulados pela túnica albugínea (SANTEN; BARDIN, 1973). A função básica dos testículos é promover a produção dos espermatozoides e de hormônios esteroides e proteicos, essenciais à função reprodutiva masculina (MAURICE GOODMAN, 2009). Os espermatozoides são originados a partir de células germinativas indiferenciadas por um processo complexo, a espermatogênese (REY, 1999).

Os dois compartimentos funcionais e morfologicamente distintos dos testículos são: uma rede de túbulos seminíferos e um tecido intersticial.

Os túbulos seminíferos são responsáveis pela produção e transporte de espermatozoides. São formados pelas células de Sertoli, células germinativas e células mioides peritubulares (PMC). Essas que juntamente com as células de Sertoli formam a membrana basal dos túbulos seminíferos (SMITH; WALKER, 2014) (Figura 1).

O tecido intersticial é constituído por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nervosas e células de Leydig. Essas têm a função de produzir hormônios androgênicos (O'DONNELL et al., 2006; REY, 1999).

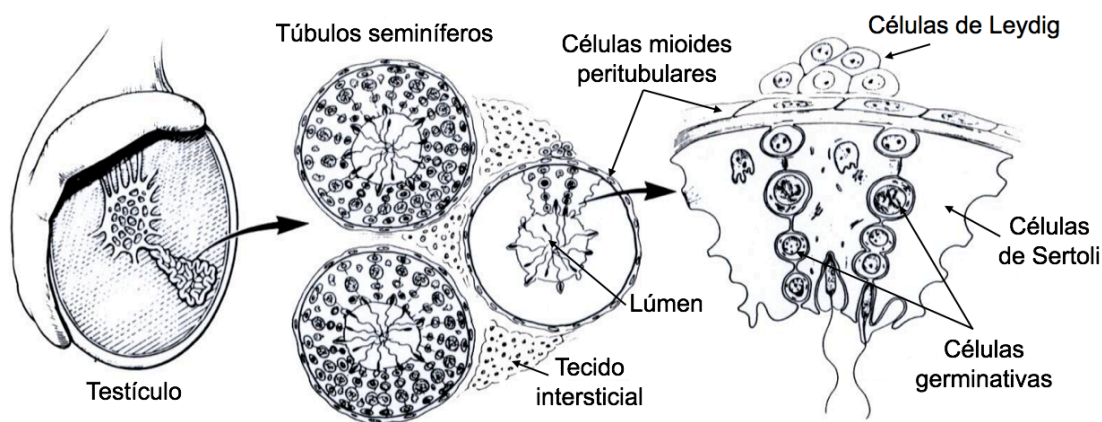


Figura 1: Representação do testículo, dos túbulos seminíferos e dos compartimentos dos testículos e suas estruturas. Fonte: adaptado de Skinner, 1991.

Morfologicamente existem cinco estágios do desenvolvimento testicular: desenvolvimento da crista genital, formação de uma gônada indiferenciada ou bipotencial, determinação sexual, formação dos cordões testiculares e desenvolvimento das funções dos testículos (CUPP; SKINNER, 2005). A célula de Sertoli tem papel fundamental no desenvolvimento do testículo funcional e na expressão do fenótipo masculino.

1.2 Células de Sertoli

As células de Sertoli são células grandes, complexas, de formato colunar, que se estendem da lâmina basal do túbulo seminífero até o seu lúmen (Figura 2). São células fundamentais no desenvolvimento das células germinativas (REY, 1999). Possuem junções entre as células adjacentes, próximo à lâmina basal, denominadas junções ocludentes. Essas junções formam a barreira hematotesticular (BHT) (MRUK; CHENG, 2004).

Na formação dos testículos, as células de Sertoli fornecem fatores essenciais para progressão das células germinativas em espermatozoides. Esses fatores são suporte físico, complexos ou barreiras juncionais e estimulação bioquímica na forma de fatores de crescimento (GRISWOLD, 1998).



Figura 2: Representação da célula de Sertoli e do processo da espermatogênese. Fonte: adaptado de Walker, 2010.

A fase imatura inicia no período fetal (OJEDA; SKINNER, 2006). As células de Sertoli se originam de precursores no epitélio celômico que migram até os cordões sexuais para formação dos testículos (KARL; CAPEL, 1998). A diferenciação dessas células depende da expressão dos genes SRY, SOX9 e NR5A1 (SEKIDO; LOVELL-BADGE, 2008). Como é o único tipo de célula que necessita do gene SRY, as células de Sertoli fetais são as responsáveis pelo início da diferenciação testicular e não parecem depender diretamente de estimulação hormonal (O'SHAUGHNESSY et al., 2009).

Uma vez diferenciadas, as células de Sertoli intervêm ativamente na organização e regulação da gônada masculina através da secreção do hormônio anti-mulleriano (AMH) que ocorre entre o 14º e o 15º dia gestacional, garantindo a regressão dos ductos de Müller (WAITES; SPEIGHT; JENKINS, 1985). Ainda, promovem a formação dos túbulos seminíferos, possibilitam a diferenciação de outras células testiculares e impedem a entrada das células germinativas em meiose (CUPP; SKINNER, 2005; SHARPE et al., 2003).

As células germinativas primordiais (CGP), células unipotentes capazes de produzir somente oócitos ou espermatozoides (BERTOCCHINI; CHUVA DE SOUSA LOPES, 2016), precursoras das células-tronco espermatogoniais nos machos, são originadas fora das gônadas e migram ativamente pelo intestino primitivo até as cristas gonadais (YOSHIDA, 2016).

A linhagem germinativa e as células somáticas exercem papéis diversos: as germinativas transmitem informação genética entre as gerações e o papel das somáticas é atuar como veículo que medeia a transmissão da linhagem germinativa (JOHNSON et al., 2011). Células somáticas são aquelas que não podem ser CGPs (BERTOCCHINI; CHUVA DE SOUSA LOPES, 2016).

O desenvolvimento das células germinativas depende da presença das células somáticas dos testículos. A respeito disso, as células de Sertoli em mamíferos, e provavelmente em todos os outros vertebrados, exercem um papel fundamental na diferenciação e desenvolvimento das funções testiculares (SHARPE et al., 2003).

Uma vez que cada célula de Sertoli possui a capacidade de fornecer suporte a um número limitado de células germinativas, a capacidade de produção de espermatozoides na vida adulta depende do número de células de Sertoli (SHARPE

et al., 2003), sendo assim, a fase proliferativa dessas é essencial para a reprodução masculina. Yoshida (2016) observa que com o aumento do número das células de Sertoli, aumenta também o número de células-tronco germinativas, o que demonstra a importância daquelas, não só para uma mudança morfológica, mas também para uma mudança fisiológica.

A proliferação das células de Sertoli, em ratos, inicia no período fetal e continua pelo período neonatal, do nascimento até o 7º dia pós-natal (dpn), até aproximadamente o 15º dpn, quando o rato ainda é imaturo (SHARPE et al., 2003). No período neonatal, as células de Sertoli se mostram sensíveis à presença de hormônios, como a testosterona (T) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), em torno do 5º ao 6º dpn em camundongos (JOHNSTON et al., 2004). Isso coincide com a diminuição da proliferação das células de Sertoli e aumento da atividade celular dessas (O'SHAUGHNESSY et al., 2009).

O resultado final da maturação sexual, um processo de múltiplas etapas que ocorre durante a puberdade, é a transição da fase imatura/proliferativa das células de Sertoli para uma fase madura/não-proliferativa, além disso, o início das divisões meióticas das células germinativas que dará origem aos espermatozoides e à formação da barreira hematotesticular (BHT).

A BHT, que é a formação de complexos juncionais entre as células de Sertoli adjacentes criando um compartimento adluminal exclusivo para as células germinativas, é fundamental para a espermatogênese e fisicamente divide o epitélio seminífero em compartimento basal e compartimento adluminal e providencia dois ambientes únicos para o desenvolvimento das células germinativas (DYM; FAWCETT, 1970).

No compartimento basal, as espermatogônias encontram-se na porção basal das células de Sertoli e na membrana basal, na periferia dos túbulos seminíferos. Seguido por uma série de etapas de diferenciação, atravessando a BHT, já no compartimento adluminal (MRUK; CHENG, 2010). Nesse último, as células da linhagem espermatogênica são isoladas pela BHT, o que impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos. Assim, essas células tornam-se totalmente dependentes das células de Sertoli (GRISWOLD, 1998; SHARPE et al., 2003).

Então, o desenvolvimento e a proliferação normal das células de Sertoli, na fase imatura, são essenciais para uma função testicular adequada na vida adulta. É fundamental que o animal se mantenha imaturo pelo tempo necessário para que as células de Sertoli proliferem adequadamente e amadureçam, sendo capazes de, então, fornecer suporte adequado à espermatogênese.

1.3 Andrógenos

Os andrógenos são hormônios esteroides que regulam a função da próstata, a densidade óssea, a função cardíaca, a massa muscular, o crescimento de pelos e a fertilidade. Se difundem através da membrana plasmática e atuam via receptor intracelular de andrógenos (iAR) (WALKER et al., 2015).

Os andrógenos estão envolvidos primariamente no desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogênese, no desenvolvimento da maturação sexual na puberdade, na manutenção da função reprodutora, da espermatogênese e do comportamento sexual (PATRÃO; SILVA; AVELLAR, 2009). As células de Leydig são as responsáveis pela secreção do andrógeno anabólico, a T.

A T é um hormônio esteroide produzido pelas células de Leydig, onde é convertido a partir do estradiol pela aromatase. A concentração de T nos testículos de humanos é entre 340 e 2000 nM, cerca de 25 a 125 vezes maior que a concentração desse hormônio no plasma (WALKER, 2009). Além da T, as células de Leydig produzem androstenediona, 5-androstenodiol, 5 α -dihidrotestosterona (DHT) e estradiol. A T pode também ser obtida pela conversão da DHT em tecidos periféricos que expressam a enzima 5 α -redutase (OJEDA; SKINNER, 2006).

O processo da espermatogênese é regulado por sinais endócrinos e parácrinos de interação complexa. O hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido no hipotálamo, desempenha um importante papel regulador no controle da neuro-hormonal da reprodução por estimular a liberação das gonadotrofinas hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) secretadas pela hipófise (COUNIS et al., 2005). O LH e o FSH agem nos testículos regulando o potencial espermatogênico (WALKER; CHENG, 2005).

O LH se liga aos receptores de membrana nas células de Leydig e estimula a produção de T que por sua vez difunde-se para dentro dos túbulos seminíferos. O

principal alvo dos hormônios que regulam a espermatogênese é a célula de Sertoli que possui receptores para T e FSH (WALKER; CHENG, 2005).

O evento inicial na virilização do trato urogenital masculino é o começo da regressão dos ductos müllerianos, que coincide com o desenvolvimento dos cordões espermatogênicos no testículo fetal (GEORGE, 1996).

A virilização envolve dois processos, a formação do epidídimo, do canal deferente e das vesículas seminais, a partir dos ductos de Wolff, e a conversão do tubérculo genital e seio urogenital em falo, uretra e próstata. Todos esses processos são mediados por andrógenos secretados pelos testículos em desenvolvimento (GEORGE; WILSON, 1994).

Após se diferenciarem, as células de Leydig fetais iniciam a síntese de T, que será essencial para a manutenção e desenvolvimento dos ductos de Wolff (DREWS, 1998; REY, 1999).

A produção de testosterona testicular é ativada no rato em desenvolvimento no útero e atinge o máximo entre o 18º e 19º dia de prenhez (WARREN; HALTMEYER; EIK-NES, 1973). No período fetal, a concentração intratesticular de T atinge seu pico no período final, declinando rapidamente após o nascimento, talvez refletindo a ausência das gonadotrofinas provenientes da placenta (LEE et al., 1975).

A concentração intratesticular de T eleva-se novamente na puberdade, permanecendo estável durante toda vida adulta. Na puberdade, a elevação da concentração intratesticular de T promove a maturação da célula de Sertoli, a inibição da produção de AMH e o início da espermatogênese completa (CHEMES et al., 2008); REY et al., 2009).

Já a concentração plasmática de T apresenta algumas particularidades em relação à sua concentração intratesticular. Durante toda a fase imatura os níveis plasmáticos de T são inferiores aos intratesticulares. Observa-se um declínio nos níveis plasmáticos de T após o nascimento, entretanto, a elevação dos níveis plasmáticos na puberdade ocorrerá somente após o aumento dos níveis intratesticulares de T.

Ainda, existem esteroides sintéticos, como o decanoato de nandrolona (17 β -hydroxyestr-4-en-3-on) que chamaremos de nandrolona (N). Apresenta várias ações semelhantes às da T pois é derivada dessa. Tem ação anabólica androgênica, se

liga ao iAR, sofre ação da α -redutase, na próstata e no folículo pilo-sebáceo, que converte a T em DHT. Pode também ser aromatizada em estrógeno, atuando nos receptores para estrógenos, por conseguinte, apresenta efeitos de feminilização (KUHN, 2002; SHAHIDI, 2001). Ainda, possui uma ação duradoura no organismo que permanece ativa por dias ou semanas (WILSON; GRIFFIN, 1980; WU, 1997).

1.4 Ação Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor Intracelular

Os hormônios esteroides influenciam amplamente na fisiologia das células, dos órgãos e dos organismos em vários aspectos. Dentre esses, os andrógenos são bem conhecidos por atuarem nos processos de desenvolvimento e manutenção dos órgãos reprodutores masculinos, ciclo capilar e músculo esquelético (WILSON, 1999).

A maioria das ações dos andrógenos são mediadas por um único receptor nuclear, o iAR, uma proteína nuclear com 110 kDa, membro da superfamília de receptores dos hormônios esteroides (MATSUMOTO et al., 2008; SMITH; WALKER, 2014), que inclui receptores de hormônio tireoideos, de ácido retinoico e de vitamina D (DETERA-WADLEIGH; FANNING, 1994). Essa superfamília provavelmente evoluiu a partir de um único ancestral que existia 500 – 830 milhões de anos atrás (GUREL; LIVSHITS, 2003).

O receptor intracelular de andrógenos possui dois ligantes, a T e seu mais potente metabólito, a 5α -diidrotestosterona (DHT) (MATSUMOTO et al., 2008). O mecanismo clássico genômico da sinalização de andrógenos ocorre quando um dos ligantes se difunde através da membrana plasmática da célula ligando-se ao iAR localizado no citosol ou no núcleo da célula. Sem o seu ligante, o iAR fica localizado no citoplasma celular onde é associado com proteínas de choque térmico (HSP) (HE et al., 1999, 2000; LOY et al., 2003).

A mudança de conformação no receptor ocorre quando há a ligação com andrógenos. Com essa mudança, o resultado é a dissociação do receptor com a HSP. O complexo hormônio-receptor é translocado até o núcleo onde se liga a uma sequência específica no DNA, resultando em recrutamento de coativadores, como a filamina-A e a importina, que se ligam ao sinal de localização nuclear do iAR, facilitando a dimerização nuclear e a expressão gênica (CUTRESS et al., 2008). São

necessários, de 30 a 45 minutos para ocorrer alteração da expressão gênica, e horas ou até mesmo dias para a produção de novas proteínas (FORADORI; WEISER; HANDA, 2008; LOSEL et al., 2003; WALKER, 2010).

A expressão de iAR no núcleo de células mioides peritubulares e de células de Leydig ocorre desde o início da vida fetal (REY et al., 2009). No período pós-natal, em ratos da linhagem *Sprague Dawley*, foi observada imunorreatividade referente ao iAR nas PMC e nas células de Leydig, já nas células de Sertoli, é observada discreta imunorreatividade a partir do 5º dpn (BREMNER et al., 1994; YOU; SAR, 1998). A ausência de expressão do receptor intracelular de andrógenos nas células de Sertoli (DA ROSA et al., 2015) diverge da elevada concentração intratesticular de T, proveniente da placenta, que atinge seu pico no final do período fetal (LEE et al., 1976; TAPANAINEN et al., 1984).

Há uma alta porcentagem de genes nas células de Sertoli que parecem serem regulados em resposta à sinalização de T (SMITH; WALKER, 2014). Ademais, a ligação entre o hormônio e o iAR diminui a proliferação das células de Sertoli, *in vitro*, e conseqüentemente leva ao término precoce da fase de maturação dessas células (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003). Rey e colaboradores (2009) sugerem que o período de insensibilidade da célula de Sertoli aos andrógenos aparenta proteger as células da maturação precoce, importante fator de proteção à funcionalidade futura dessas células.

A expressão de iAR mantém-se constante durante a vida adulta de um rato, tanto nas PMC quanto nas células de Leydig (REY et al., 2009). Em um estudo, as células germinativas não expressaram iAR em qualquer idade (BREMNER et al., 1994), porém, outro estudo sugeriu que a expressão de iAR nas células de Sertoli apresenta significativas variações durante os estágios do ciclo dos túbulos seminíferos (SMITH; WALKER, 2014). De qualquer forma, identificaram que a expressão de iAR nas células de Sertoli não parece ser crucial para a espermatogênese (SMITH; WALKER, 2014; TSAI et al., 2006).

1.5 Ação Não-Clássica de Hormônios Esteroides e Receptor de Membrana

Das duas possibilidades de ação dos hormônios esteroides, a via não-clássica é caracterizada por rápido evento que conduz à ativação de cascatas de

sinalização citosólicas normalmente desencadeadas por receptores de membrana (SHIHAN; BULLDAN; SCHEINER-BOBIS, 2014). Diferente do iAR, o receptor de membrana afeta a função celular por modulação ao nível de segundos mensageiros (FALKENSTEIN et al., 2000).

Nas últimas décadas, têm sido identificadas e descritas diversas funções dos receptores de membrana para progesterona (mPR) e para estrógenos, o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER-1). Entretanto, os receptores de membranas de andrógenos (mAR), que também exercem ações não clássicas em vários tipos de células, ainda não foram identificados (THOMAS et al., 2014). O GPRC6A tem sido indicado como um receptor de membrana de andrógenos, sendo que a remoção da proteína Gi acoplada ao receptor provoca feminização testicular em camundongos machos, porém este efeito é inespecífico (PI et al., 2008; WANG; LIU; CAO, 2014).

São descritas duas vias de sinalização não-clássica, nas quais o complexo receptor-ligante ou o andrógeno ativam a via de sinalização citoplasmática (O'HARA; SMITH, 2015). Essa sinalização pode ser por ativação de cascata MAPK e fosforilação do CREB ou por despolarização que causa influxo de cálcio nas células de Sertoli (WALKER, 2010).

A T se liga ao iAR e medeia a fosforilação das enzimas cinases Src, cascata MAPK e CREB. O iAR se aproxima da membrana plasmática quando há estímulo da T, ocorre a formação do complexo receptor-ligante intracelular. O complexo se liga ao Src, este é capaz de ativar o EGF (fator de crescimento epidermal) que estimula a cascata MAPK, ativando a cinase-p90 que por sua vez fosforila o fator de transcrição CREB que regula genes como a lactato desidrogenase-A (LDH-A) e o EGF-1, em 15 minutos (SMITH; WALKER, 2014; WALKER, 2010). A fosforilação do CREB não é capaz de ser induzida nem pelo estradiol nem pela progestina, confirmando que a T é o principal esteroide nas células de Sertoli (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011; WALKER, 2010).

Essa via é de extrema importância pois mantém processos cruciais para a reprodução como a formação e manutenção da BHT, adesão das células de Sertoli às células germinativas e regulação da espermatogênese (SHUPE et al., 2011; SMITH; WALKER, 2014).

A outra via descrita é a mediada pelo influxo de cálcio. Esse em células de Sertoli isoladas é observado em 20-40 segundos em resposta à T (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995). Estudos demonstraram que o U73122 (inibidor da fosfolipase C) e a *toxina pertussis* (inibidor da proteína G) bloqueiam a despolarização do potencial de membrana em células de Sertoli e o influxo de cálcio mediado pela T (LOSS et al., 2004). Esses achados sugerem que o efeito de estimulação da T cause ativação de um receptor acoplado à proteína G (GPCR) não-identificado.

O cálcio, importante segundo mensageiro intracelular, pode exercer diversos efeitos sobre o citoesqueleto da célula de Sertoli (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998), influenciando aspectos como mobilidade celular e adesão entre células de Sertoli e células germinativas (LOSS et al., 2004), fatores esses que influenciam diretamente na fertilidade (WALKER, 2010).

O hormônio T interage com uma estrutura que tem características de um receptor acoplado à proteína G na membrana plasmática. Esse complexo receptor-ligante ativa a fosfolipase C (PLC) que cliva o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (RAHMAN; CHRISTIAN, 2007; WALKER, 2010; WASSERMANN; LOSS, 2004).

A PLC é ativada por um andrógeno que reduz o PIP₂ na membrana. Esse libera a ação inibitória do ATP sobre o canal de K⁺ mediado por ATP (K⁺_{ATP}) fechando-o. Sob ação desse fechamento, a corrente iônica ao longo da membrana celular diminui e a membrana da célula de Sertoli despolariza (Figura 3).

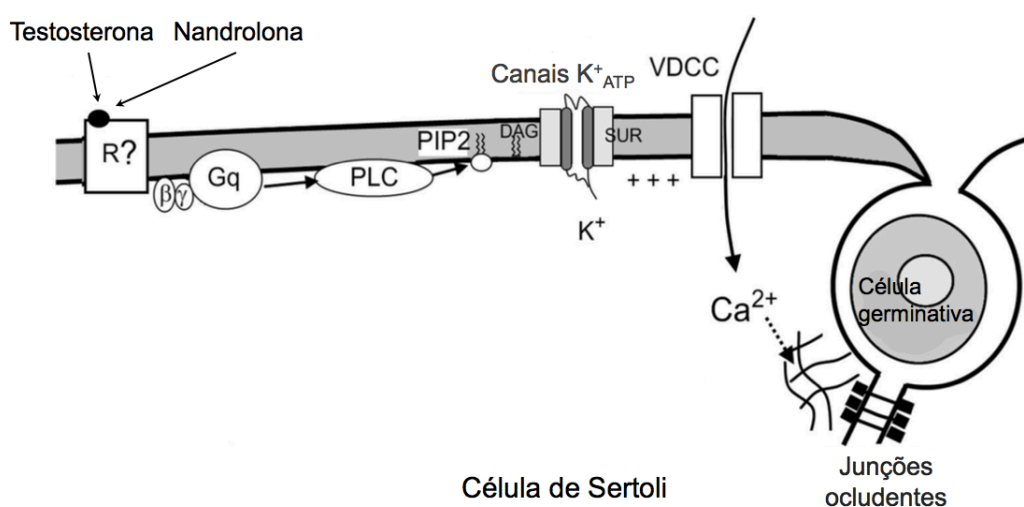


Figura 3: Via de sinalização não-clássica por ação da testosterona e da nandrolona nas células de Sertoli. Fonte: adaptado de Loss et al., 2011.

Como resultado, os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) se abrem, permitindo o influxo de cálcio e aumentando a resistência da membrana das células de Sertoli (VON LEDEBUR et al., 2002). Tanto a T como a N promovem aumento da resistência da membrana das células de Sertoli em ratos imaturos (CAVALARI et al., 2012; DA ROSA et al., 2015; VON LEDEBUR et al., 2002).

Nos VDCC foi observado que com a perfusão de verapamil, um bloqueador desses canais, ocorre um bloqueio parcial da despolarização provocada pela T (CAVALARI et al., 2012; VON LEDEBUR et al., 2002) e pela N (CAVALARI et al., 2012).

Vias similares da T mediadas pelos canais de cálcio têm sido descritas em outras células como nos osteoblastos, nos macrófagos, nas células prostáticas e nos miotúbulos (BENTEN et al., 1999; ESTRADA et al., 2003; LIEBERHERRT; GROSSE, 1994).

Existem fármacos como a glibenclamida e a tolbutamida que bloqueiam os K^+_{ATP} e produzem uma despolarização semelhante à produzida pela T (VON LEDEBUR et al., 2002). Ademais, o inibidor da fosfolipase C, U73122, e o inibidor da proteína G, *toxina pertussis*, bloqueiam a despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli e o influxo de cálcio mediado pela T (LOSS et al., 2004). Esses achados sugerem que o efeito da estimulação da T ocorre por uma via não-clássica, causando ativação de um receptor acoplado à proteína G não-identificado.

Foi demonstrado por nosso laboratório que quando a flutamida, um bloqueador do iAR, é perfundida na solução HBSS, a despolarização do potencial de membrana tanto com a aplicação de T (1 μ M) quanto a de N (1 μ M) ocorre normalmente, mais uma vez sugerindo que a resposta eletrofisiológica não depende somente do iAR (CAVALARI et al., 2012).

Muitos mecanismos são propostos para explicar a resposta rápida aos andrógenos, tais como, translocação de um receptor, da família dos receptores nucleares, para a membrana plasmática (HEINLEIN; CHANG, 2002), modificações dos canais iônicos em decorrência de efeitos não-específicos de andrógenos (LOSEL et al., 2003) e um GPCR6A. Esse último está envolvido com atividades anabólicas em diversos tecidos e órgãos, como pulmões, fígado, baço, coração, rins,

músculo esquelético, cérebro e ossos (HARNO et al., 2008; LUCAS-HERALD et al., 2017; PI et al., 2008).

O GPCR6A foi identificado como membro da família C dos GPCR, sendo relatado como um receptor sensível ao cálcio (CASR) (KUANG et al., 2005; WELLENDORPH; BRÄUNER-OSBORNE, 2004). Além disso, é provável receptor envolvido no mecanismo extracelular sensível ao cálcio em osteoblastos (PI et al., 2000) e está envolvido no metabolismo de energia em osteocalcina (LEE et al., 2007). Em camundongos *knockout* para o GPCR6A, está demonstrado que essa deficiência está associada com feminização, redução do tamanho testicular, redução do peso da vesícula seminal e redução dos níveis de T (PI et al., 2008).

A resposta rápida para esteroides ocorre não só com andrógenos, mas com outras substâncias como a progesterona, o estradiol, a aldosterona, o retinol e a triiodotironina (T₃) (WEHLING, 1997). Essa resposta rápida da ação não-clássica não está só atuando como complementar à via clássica como se acreditava anteriormente (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002), mas também, deve abranger a regulação desta última, visto que a ativação de enzimas cinases na via não-clássica pode resultar em regulação da transcrição gênica (SMITH; WALKER, 2014; WALKER, 2010).

Apesar de já terem sido demonstrados vários mecanismos de atuação da via não-clássica dos andrógenos, o receptor propriamente envolvido nessa via de sinalização ainda não foi identificado.

Alguns achados reforçam que há um receptor de membrana específico para os andrógenos que age independentemente ao iAR, pois bloqueadores deste último, flutamida e ciproterona, não anulam a via de sinalização não-clássica dos andrógenos, corroborando com a teoria de que existe um receptor de androgénos na membrana de células de Sertoli (CAVALARI et al., 2012; DA ROSA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2013; THOMAS et al., 2005).

Ademais, foi identificada a presença de mAR em ovários da espécie de peixe corvina (BRAUN; THOMAS, 2004), em células T provenientes do baço (BENTEN et al., 1999), em células endoteliais (FIGUEROA-VALVERDE et al., 2002), em macrófagos (GUO et al., 2002) e em cardiomiócitos (VICENCIO et al., 2006).

Nos últimos anos, pesquisadores utilizando técnicas similares às que identificaram o mPR também identificaram uma proteína 7-transmembrana que pode

ser forte candidata a ser o mAR (BERG et al., 2014; THOMAS et al., 2014). Esta proteína tem alta afinidade aos andrógenos, apresentando baixa ou nenhuma afinidade aos demais esteroides (THOMAS et al., 2014).

Trabalhos mais recentes demonstraram que a T estimula a cascata de sinalização não-clássica nas células de Sertoli por interação com o ZIP9, um transportador de zinco ligado ao IRT (transportador regulado por metal). Utilizando um silenciador do ZIP9, os pesquisadores constataram que a cascata de sinalização induzida pela T é prejudicada (BULLDAN et al., 2016; SHIHAN et al., 2015).

1.6 Transportador de zinco

O zinco (Zn) é conhecido por ser um elemento essencial para a vida. Nos sistemas biológicos, está presente em formas iônicas, se liga a proteínas, é cofator de mais de 300 enzimas, é requerido para a função de mais de 2000 fatores de transcrição e desempenha importante papel na manutenção do equilíbrio fisiológico (JEONG; EIDE, 2013; KAMBE et al., 2015; YAMAGUCHI et al., 2009).

Este elemento está envolvido em vários processos biológicos (JACKSON; LOWE, 1992), tais como, manutenção da integridade de membrana (BETTGER; O'DELL, 1993), síntese de DNA, proliferação celular, imunocompetência (CHESTERS; PETRIE; LIPSON, 1993), manutenção das células germinativas, progressão da espermatogênese e regulação da motilidade espermática (CROXFORD; MCCORMICK; KELLEHER, 2011; YAMAGUCHI et al., 2009).

A deficiência de zinco em ratos compromete as fases da espermatogênese, diminui a produção de T (OMU et al., 2015), induz à atrofia dos túbulos seminíferos e afeta a diferenciação das espermátides (MERKER; GÜNTHER, 1997; VALLEE; FALCHUK, 1993). Por outro lado, a suplementação de zinco corrigiu o déficit de zinco, retomando a espermatogênese normal (OMU et al., 2015). Além disso, a desintegração da homeostase do zinco está associada com diversas doenças, como diabetes, câncer e doenças imunes (FORMIGARI; IRATO; SANTON, 2007; FRANKLIN et al., 2005; FUKADA; KAMBE, 2011; JANSEN; KARGES; RINK, 2009).

As proteínas transportadoras de zinco são membros da superfamília SLC de transportadores de metais, e são divididas em duas famílias. O ZIP (SLC39A) definido como ZRT ou proteína IRT é a principal família de transportadores de zinco

(NISHIKAWA; MORI; HARA, 2017), regulam a entrada de zinco para o espaço intracelular e para os depósitos intracelulares (THOMAS; CONVERSE; BERG, 2017). São designados em 14 subfamílias, de ZIP1 a ZIP14 (KAMBE et al., 2015). A família SLC30 dos transportadores de zinco (ZnT) controla a exportação desse elemento a partir da célula (KAMBE et al., 2015; THOMAS et al., 2014).

Contudo, a despeito da relevância na manutenção da homeostase do zinco e na mediação das vias de transdução de zinco que controlam as funções vitais das células, as funções e modo de atuação do ZIP não são bem conhecidas (JEONG; EIDE, 2013; THOMAS et al., 2014).

A subfamília ZIP9 está localizada no complexo de Golgi e na superfície celular (MATSUURA et al., 2009; THOMAS et al., 2014). Pesquisadores sugerem que o complexo de Golgi, em receptores das células B em galinhas, tem papel fundamental na sinalização da regulação da atividade da ERK, translocando o zinco a partir do complexo de Golgi o que aumenta a concentração de zinco intracelular (TANIGUCHI et al., 2013).

Por fim, estudo recente revelou que um receptor de esteroides intervém na resposta celular, sob estímulo da T, através do aumento das concentrações intracelulares de zinco, além de ativar a sinalização da proteína G, e que a apoptose é dependente de ambas vias (THOMAS; CONVERSE; BERG, 2017). Esses achados revelam que o receptor de esteroides e a sinalização do zinco estão intimamente relacionados.

A partir da descoberta da presença de um mAR em células de ovários do peixe corvina (BRAUN; THOMAS, 2004), a análise da sequência do cDNA desse peixe mostrou ter alta afinidade de nucleotídeos e de sequências de aminoácidos com o ZIP9 (BERG et al., 2014).

Além disso, foi demonstrado que a sequência de aminoácidos desta proteína apresenta mais similaridade a proteínas de uma sub-família de um transportador de zinco (ZIP9) do que a um GPCR clássico (PASCAL; WANG, 2014; THOMAS et al., 2014).

Ao utilizar um quelante de zinco, foi possível bloquear a sinalização do receptor de membrana de andrógenos, assim como, a aplicação de bloqueadores da ERK, proteína cinase regulada por sinais extracelulares, bloqueou o mAR (THOMAS et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento do receptor ZIP9 nos efeitos de membrana de células de Sertoli produzidos em resposta à aplicação de testosterona e de nandrolona.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel do quelante de zinco TPEN, nas concentrações de 10 nM, 20 nM e 40 nM, sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos entre o 12° e o 15° dia pós-natal (dpn);

- Avaliar o papel do quelante de zinco TPEN, nas concentrações de 10 nM, 20 nM e 40 nM, sobre a resposta eletrofisiológica da testosterona e da nandrolona em túbulos seminíferos isolados de testículos de ratos entre o 12° e o 15° dpn.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos entre o 12º e o 15º dpn, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS.

No CREAL, os animais eram retirados da mãe e imediatamente eutanasiados por deslocamento cervical. Os testículos eram colocados no tampão HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) mantido em gelo, e transportados para o ICBS (Instituto de Ciências Básicas da Saúde) da UFRGS.

3.2 Substâncias utilizadas

Decanoato de nandrolona: Schering-Plough (São Paulo, SP, Brasil). Deca-Durabolin, ampola 50 mg. Hormônio esteroide sintético derivado da testosterona, com ação androgênica e anabólica (Figura 4).

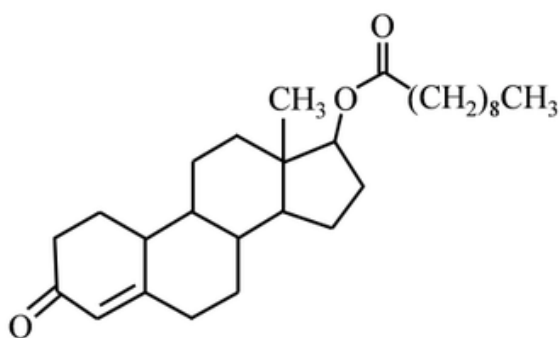


Figura 4: Estrutura molecular do decanoato de nandrolona.

DMSO: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Dimetilsulfóxido. D-8779. Solvente polar.

Testosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 17 β -Hydroxy-3-oxo-4-androstene, 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-one, 4-Androsten-17 β -ol-3-one, trans-Testosterone, PM 288,42. Hormônio esteroide com ação androgênica e anabólica (Figura 5).

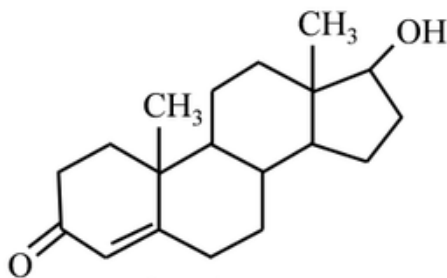


Figura 5: Estrutura molecular da testosterona.

TPEN: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine, PM 424,54. Quelante de zinco permeável à membrana; diminui o nível intracelular de zinco.

3.3 Soluções

O tampão HBSS, utilizado tanto para o acondicionamento/transporte dos testículos quanto para o experimento de eletrofisiologia, era preparado a partir de soluções estoque, conforme Tabela 1. O primeiro era preparado um dia antes do experimento e o segundo imediatamente antes da realização dos experimentos.

Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), exceto o HEPES proveniente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Para o preparo do tampão foram misturados volumes iguais de cada solução estoque, conforme Tabela 1, e o HEPES, que era pesado e diluído em água destilada (até completar o volume desejado), no momento da preparação do tampão. O pH da solução era aferido através de pHmetro e ajustado em 7,4 acrescentando-se NaOH (0,1 N). A solução era filtrada em papel filtro e mantida em gelo até o início do experimento.

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

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

A T era pesada em balança analítica, reconstituída primeiramente em DMSO (solução A) e posteriormente em HBSS (solução B), produzindo solução com 1 μ M de concentração final.

A N era diluída primeiramente em DMSO (solução A) e posteriormente em HBSS (solução B), produzindo solução com 1 μ M de concentração final.

O TPEN era reconstituído em DMSO, preparado em solução estoque e a partir dessa diluído em HBSS nas concentrações de 10 nM, 20 nM e 40 nM, feitas no dia do experimento.

Em todas soluções a concentração de DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.

3.4 Técnica eletrofisiológica de registro intracelular

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical nas dependências do CREAL. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e

colocados em solução HBSS mantida no gelo. Após o transporte, no laboratório, os testículos foram descapsulados e cuidadosamente estirados para expor 5 a 10 túbulos seminíferos que foram fixados no fundo de uma câmara de perfusão com um fio ortodôntico (Figura 6).

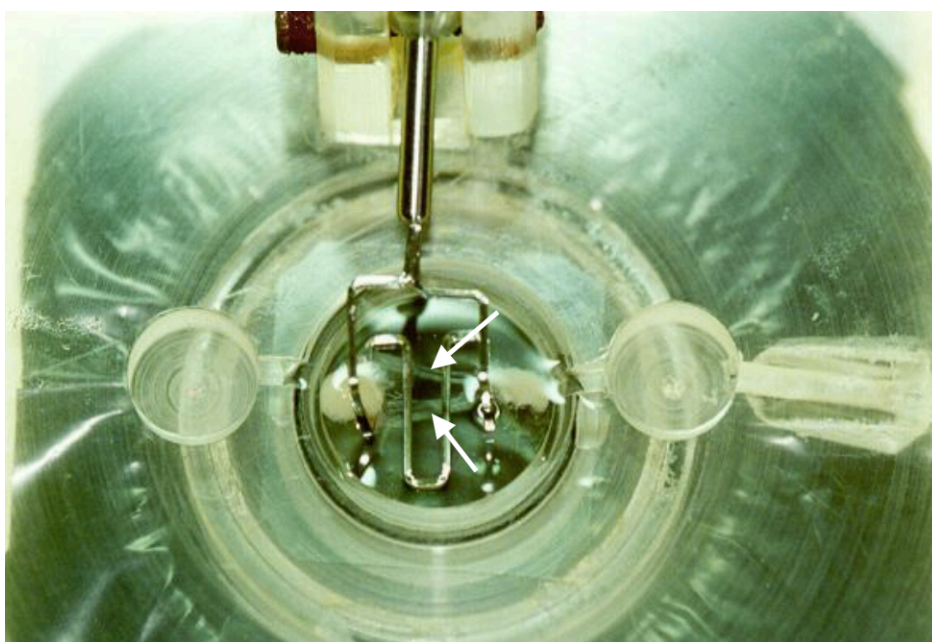


Figura 6: Placa da câmara de perfusão com túbulos seminíferos estirados ao fundo (setas brancas).

A placa da câmara de perfusão era então levada ao microscópio invertido (*Inverted Microscope Diaphot – TMD*, Nikon Instruments Inc. Melville, NY, EUA) e conectada ao sistema de perfusão com HBSS. O HBSS mantido em banho a 36°C perfundia os túbulos com fluxo de 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (*Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax*, modelo RP-1). Esse HBSS recebia perfusão de carbogênio para oxigenação adequada do testículo estirado, assim como os testículos não estirados que também ficavam em HBSS com perfusão de carbogênio. O HBSS ficava 30 minutos perfundindo a câmara antes do início dos registros.

Após esse período, uma célula de Sertoli era empalada com um microeletrodo de vidro, sob controle visual no microscópio invertido. A movimentação mecânica do eletrodo para aproximação da célula e empalhamento era realizado por um

micromanipulador mecânico (Narishige – Japão), capaz de executar movimentos macros e micros nos três eixos.

O potencial de membrana das células de Sertoli empaladas foi registrado com o uso de microeletrodo, preenchido com KCl (3 mol/L), com resistência de 15 a 25 M Ω . Esse microeletrodo estava conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK), que permite o monitoramento do potencial de membrana da célula através de um osciloscópio (TDS 200 Tectronic, Inc).

Os dados foram armazenados em um computador através da placa de aquisição de dados (TDS 210 Tectronix) e do programa Wave Star (Lite versão 1.0.10, 1996 Tectronix, Inc). Pulsos de corrente quadrados (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) foram aplicados através de eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass Instruments) (Figura 7).

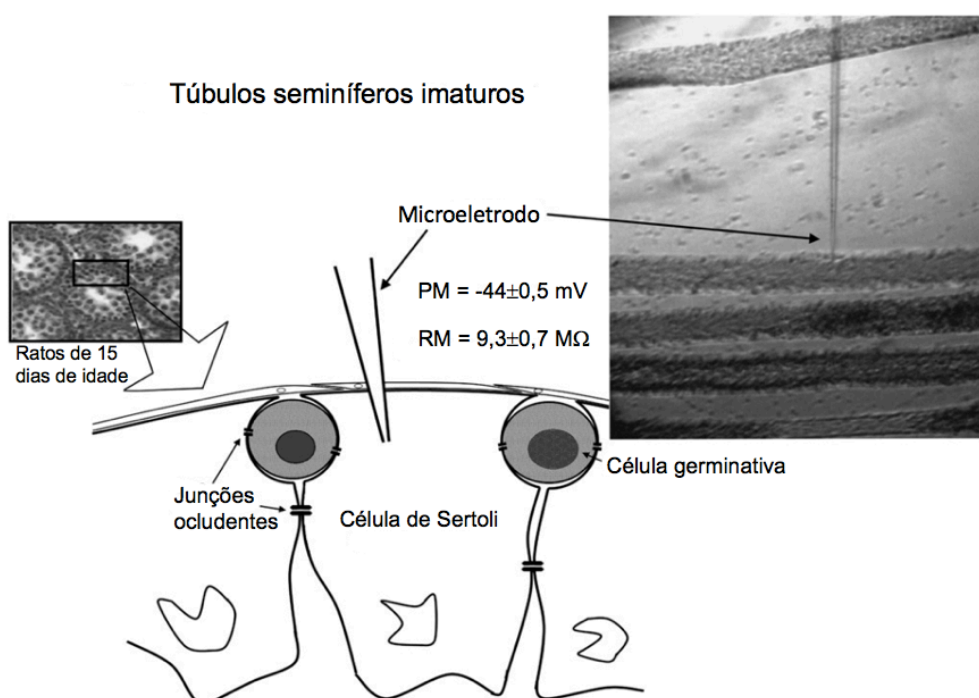


Figura 7: Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos de ratos com a média dos valores basais de potencial de membrana (PM) e resistência da membrana (RM). Fonte: adaptado de Loss et al., 2011.

Foram utilizadas apenas células que apresentassem potenciais de membrana entre -30 mV e -60 mV, uma vez que, de acordo com trabalho anterior do

laboratório, esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011).

Após a estabilização do potencial de repouso da célula (Figura 8) por pelo menos dois minutos, os hormônios eram aplicados topicamente à câmara de perfusão (Figura 9), sendo registrado o potencial após a aplicação por pelo menos cinco minutos. Para verificar se o veículo da T e da N produz algum efeito no potencial de membrana de células de Sertoli foi utilizado somente o DMSO (Figura 10). Os hormônios T ou N foram aplicados topicamente à câmara de perfusão no tempo zero para avaliar o efeito dos andrógenos, no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos (Figura 11).

O TPEN, nas diferentes concentrações, foi acrescentado ao HBSS e perfundido na câmara de perfusão nos grupos experimentais antes da aplicação dos hormônios. Após a perfusão do TPEN, o potencial foi registrado, por pelo menos cinco minutos, para observar a produção de alguma alteração no potencial de membrana das células de Sertoli (Figura 12). Para verificar se o quelante de zinco produz algum efeito no potencial de membrana de células de Sertoli, foi utilizado somente o TPEN, nas diferentes concentrações, precedido e lavado posteriormente por HBSS (Figura 13).



Figura 8: Representação de um registro de controle de uma célula com potencial de repouso de -43 mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana à aplicação de pulsos de 0,5 nA.

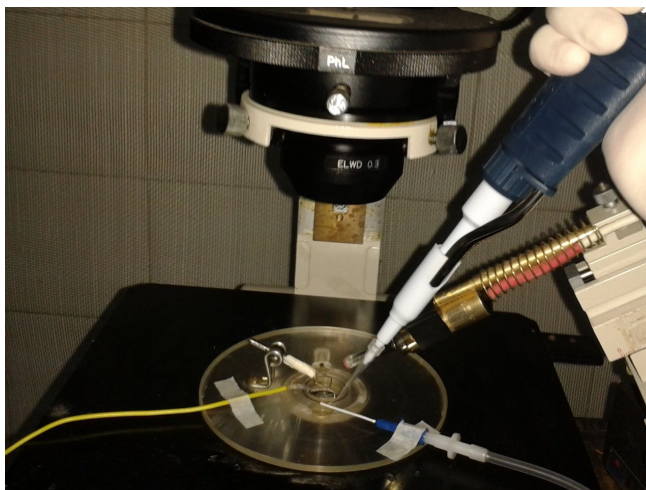


Figura 9: Aplicação tópica dos hormônios diretamente na câmara de perfusão.

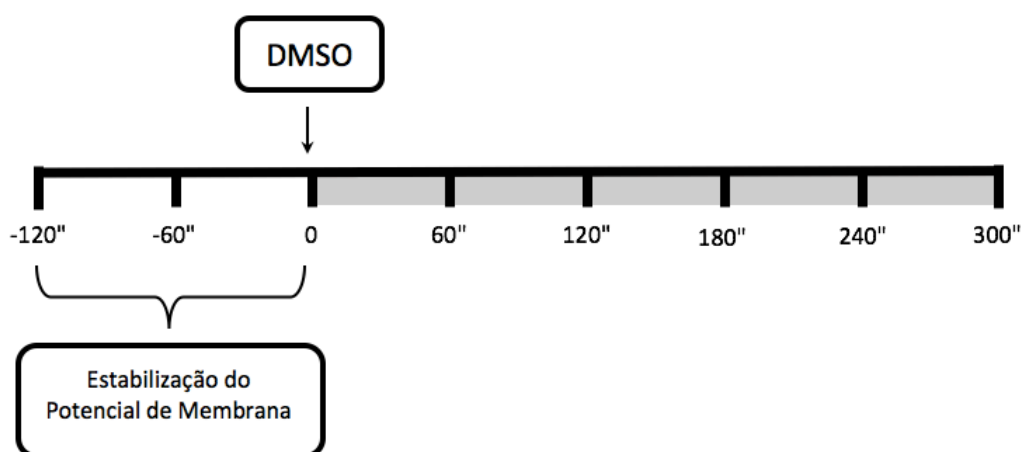


Figura 10: Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. Avaliação do efeito do DMSO, no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos; n = 8.

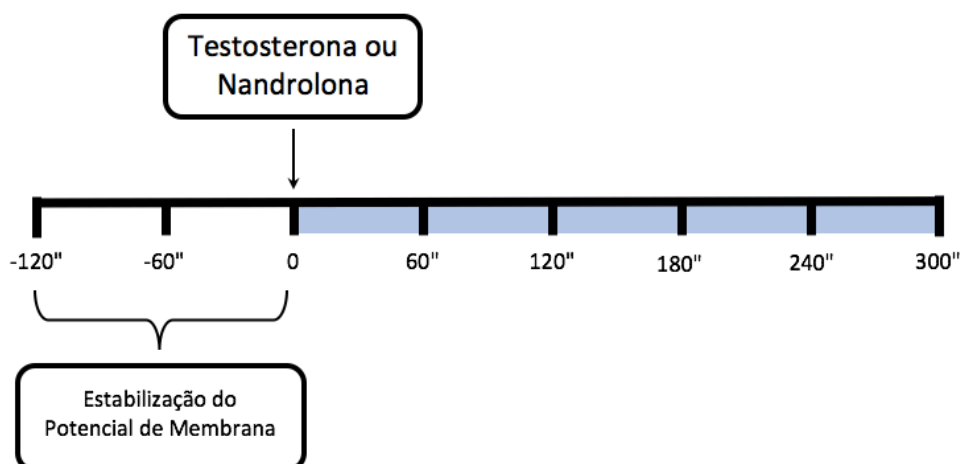


Figura 11: Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. Avaliação do efeito da testosterona ou da nandrolona, no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos.

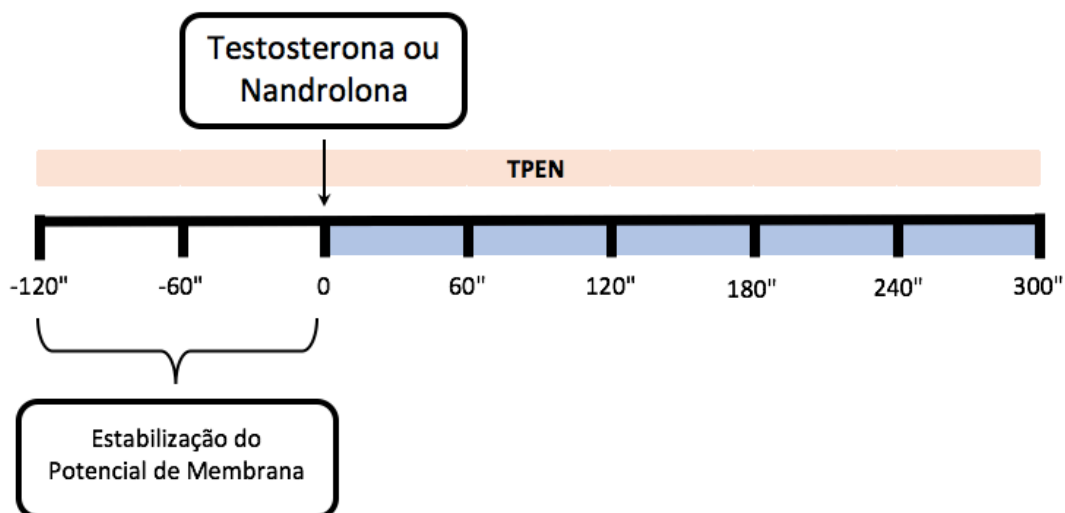


Figura 12: Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. Avaliação do efeito da testosterona ou da nandrolona sob perfusão do TPEN, no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos.

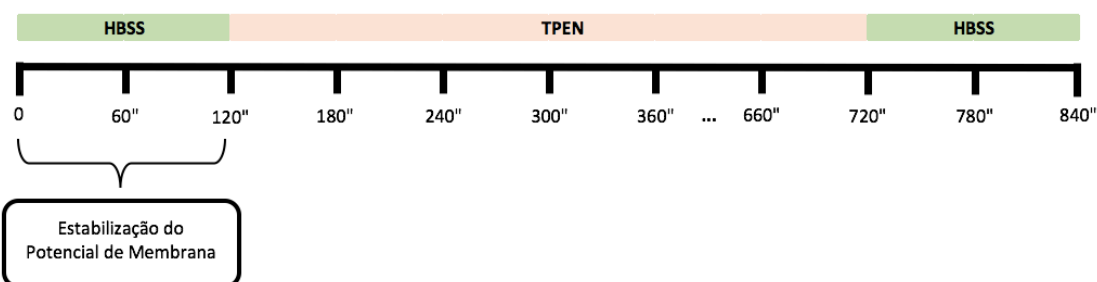


Figura 13: Desenho experimental da técnica eletrofisiológica de registro intracelular. Avaliação do efeito da perfusão do TPEN, no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos.

Foram registradas e comparadas as variações do potencial e da resistência da membrana de células de Sertoli após a aplicação tópica dos hormônios.

A resistência da membrana será calculada utilizando-se a lei de Ohm: $I = V/R$
 $\rightarrow R = V/I$

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R = resistência (Ω - ohms)

Resistência da membrana = voltagem registrada no osciloscópio/pulso de corrente aplicado (0,5 nA).

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

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizada ANOVA para medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com). O nível de significância estatística foi definido com $p < 0,05$.

5 BIOSSEGURANÇA E DESCARTE DE RESÍDUOS

Durante a execução dos experimentos propostos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimento e aventais para sua própria proteção. Quando necessário foram utilizadas máscaras cirúrgicas e óculos de proteção.

O descarte de resíduos não tóxicos, por exemplo, as soluções salinas que não foram utilizadas, foram realizadas no esgoto comum.

As carcaças dos animais foram congeladas no próprio CREAL e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao CREAL a partir do ICBS.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número 29644.

Os animais foram eutanasiados antes de se iniciar qualquer procedimento. A eutanásia é o processo no qual um ser vivo é levado à morte sem dor. A técnica de deslocamento cervical é uma manobra rápida em que há o rompimento da medula espinhal, que em segundos leva o animal à perda total de sensibilidade e à morte (RHODEN, 2006). Desta forma, entendemos que o grau de sofrimento ao qual os animais foram submetidos é mínimo.

De acordo com o Guia de Severidade de Procedimentos Científicos da UFRGS todos os procedimentos são classificados como leves. Essa classificação reflete o grau de dor, sofrimento, incômodo ou prejuízo duradouro a ser experienciado pelo animal durante a execução dos procedimentos.

10 REFERÊNCIAS

BENTEN, W. P. et al. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 1, p. 123–133, 1999.

BERG, A. H. et al. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I. Discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4237–4249, 2014.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium--a life and death signal. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 645–648, 1998.

BERTOCCHINI, F.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. Germline development in amniotes: A paradigm shift in primordial germ cell specification. **BioEssays**, v. 38, n. 8, p. 791–800, 2016.

BETTGER, W. J.; O'DELL, B. L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 194–207, 1993.

BRAUN, A. M.; THOMAS, P. Biochemical characterization of a membrane androgen receptor in the ovary of the atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 146–155, 2004.

BREMNER, W. J. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 1227–1234, 1994.

BULLDAN, A. et al. Non-classical testosterone signaling mediated through ZIP9 stimulates claudin expression and tight junction formation in Sertoli cells. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 8, p. 1075–1085, 2016.

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3722–3731, 2003.

CAVALARI, F. C. et al. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: Effects of nandrolone decanoate and catechin. **Steroids**, v. 77, n. 1–2, p. 118–125, 2012.

CHEMES, H. E. et al. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in sertoli cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 11, p. 4408–4412, 2008.

CHESTERS, J. K.; PETRIE, L.; LIPSON, K. E. Two zinc-dependent steps during G1 to S phase transition. **Journal of cellular physiology**, v. 155, n. 3, p. 445–51, 1993.
COUNIS, R. et al. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope

function. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 243–254, 2005.

CROXFORD, T. P.; MCCORMICK, N. H.; KELLEHER, S. L. Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 3, p. 359–65, 2011.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. [s.l: s.n.]. p. 43–70.

CUTRESS, M. L. et al. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 7, p. 957–968, 2008.

DA ROSA, L. A. et al. Non-classical effects of androgens on testes from neonatal rats. **Steroids**, v. 93, p. 32–38, 2015.

DE CASTRO, A. L. et al. Epitestosterone and testosterone have similar nonclassical actions on membrane of Sertoli cells in whole seminiferous tubules. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 1, p. 15–21, 2013.

DETERA-WADLEIGH, S. D.; FANNING, T. G. Phylogeny of the steroid receptor superfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 192–205, 1994.

ESTRADA, M. et al. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3586–3597, 2003.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 513–556, 2000.

FIGUEROA-VALVERDE, L. et al. Synthesis and evaluation of the cardiovascular effects of two, membrane impermeant, macromolecular complexes of dextran-testosterone. **Steroids**, v. 67, n. 7, p. 611–619, 2002.

FORADORI, C. D.; WEISER, M. J.; HANDA, R. J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 169–181, 2008.

FORMIGARI, A.; IRATO, P.; SANTON, A. **Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects** *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 2007.

FRANKLIN, R. B. et al. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. **Molecular cancer**, v. 4, p. 32, 2005.

FUKADA, T.; KAMBE, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 3, n. 7, p. 662–674, 2011.

GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D. J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2052–2059,

1995.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 4, p. 411–416, 1998.

GUO, Z. et al. Nongenomic testosterone calcium signaling: Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29600–29607, 2002.

GUREL, I.; LIVSHITS, G. Phylogeny of vertebrate nuclear receptors--analysis of variance components in protein sequences. **Collegium antropologicum**, v. 27, n. 2, p. 599–610, 2003.

HARNO, E. et al. Evidence for the presence of GPRC6A receptors in rat mesenteric arteries. **Cell Calcium**, v. 44, n. 2, p. 210–219, 2008.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 10, p. 2181–2187, 2002.

HYUN, H. J. et al. Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 42, n. 2, p. 460–465, 2001.

JACKSON, M. J.; LOWE, N. M. Physiological role of zinc. **Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 233–238, 1992.

JANSEN, J.; KARGES, W.; RINK, L. **Zinc and diabetes - clinical links and molecular mechanisms** **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2009.

JEONG, J.; EIDE, D. J. **The SLC39 family of zinc transporters** **Molecular Aspects of Medicine**, 2013.

JOHNSON, A. D. et al. Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. **Reproduction**, v. 141, n. 3, p. 291–300, 2011.

JOHNSTON, H. et al. Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen during Postnatal Development in the Mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 318–329, 2004.

KAMBE, T. et al. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 3, p. 749–784, 2015.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. **Developmental Biology**, v. 203, n. 2, p. 323–333, 1998.

KUANG, D. et al. Cloning and characterization of a Family C orphan G-protein coupled receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, n. 2, p. 383–391, 2005.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p.

411–34, 2002.

LEE, N. K. et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, 2007.

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

LEE, V. W. et al. Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. I. Plasma LH, FSH and testosterone levels. **Journal of reproduction and fertility**, v. 46, p. 1–6, 1976.

LEITE, L. et al. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. **Medical Science Research**, v. 27, n. January 1999, p. 25–28, 1999.

LIEBERHERRT, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7217–7223, 1994.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, I.; TREVIÑO, C. L.; DARSZON, A. Regulation of Spermatogenic Cell T-Type Ca^{2+} Currents by Zn^{2+} : Implications in Male Reproductive Physiology. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 3, p. 659–667, 2016.

LOSEL, R. M. et al. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. **Physiological reviews**, v. 83, p. 965–1016, 2003.

LOSS, E. S. et al. Testosterone modulates K^{+} ATP channels in sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 8, p. 519–525, 2004.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: Calcium inflow and electrophysiological changes. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 577–583, 2011.

LUCAS-HERALD, A. K. et al. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1405–1418, 2017.

MATSUMOTO, T. et al. Androgen receptor functions in male and female physiology. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 3–5, p. 236–241, 2008.

MATSUURA, W. et al. SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1142–1148, 2009.

MAURICE GOODMAN, H. **Basic Medical Endocrinology**. [s.l: s.n.].

MERKER, H. J.; GÜNTHER, T. Testis damage induced by zinc deficiency in rats. **J Trace Elem Med Biol.**, v. 11, n. 1, p. 19–22, 1997.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747–806, 2004.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Tight junctions in the testis: new perspectives. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1621–35, 2010.

NISHIKAWA, M.; MORI, H.; HARA, M. Analysis of ZIP (Zrt-, Irt-related protein) transporter gene expression in murine neural stem/progenitor cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. May, p. 81–88, 2017.

O'DONNELL, L. et al. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 1017–1069.

O'HARA, L.; SMITH, L. B. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 595–605, 2015.

O'SHAUGHNESSY, P. J. et al. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: Data from mutant and genetically modified mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1–2, p. 2–8, 2009.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 2061–2126.

OMU, A. E. et al. Molecular basis for the effects of zinc deficiency on spermatogenesis: An experimental study in the Sprague-dawley rat model. **Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India**, v. 31, n. 1, p. 57–64, 2015.

PASCAL, L. E.; WANG, Z. **Unzipping androgen action through ZIP9: A novel membrane androgen receptor** *Endocrinology*, 2014.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, p. 934–945, 2009.

PI, M. et al. Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3256–3263, 2000.

PI, M. et al. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic

syndrome. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

RAHMAN, F.; CHRISTIAN, H. C. Non-classical actions of testosterone: an update. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 10, p. 371–378, 2007.

REY, R. **The prepubertal testis: A quiescent or a silently active organ?** *Histology and Histopathology*, 1999.

SANTEN, R. J.; BARDIN, C. W. Episodic Luteinizing Hormone Secretion in Man. **The Journal of clinical investigation** *The Journal of clinical investigation*, v. 52, n. October, p. 2617–2628, 1973.

SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, v. 453, n. 7197, p. 930–934, 2008.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355–1390, 2001.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 769–784, 2003.

SHIHAN, M. et al. Non-classical testosterone signaling in spermatogenic GC-2 cells is mediated through ZIP9 interacting with Gn α 11. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 10, p. 2077–2086, 2015.

SHIHAN, M.; BULLDAN, A.; SCHEINER-BOBIS, G. Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with Gn α 11. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 6, p. 1172–1181, 2014.

SHUPE, J. et al. Regulation of Sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 238–252, 2011.

SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 425–433, 2002.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 2–13, 2014.

TANIGUCHI, M. et al. Essential Role of the Zinc Transporter ZIP9/SLC39A9 in Regulating the Activations of Akt and Erk in B-Cell Receptor Signaling Pathway in DT40 Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

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

THOMAS, P. et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, 2005.

THOMAS, P. et al. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: II. Role of human ZIP9 in testosterone-induced prostate and breast cancer cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 155, n. 11, p. 4250–4265, 2014.

THOMAS, P.; CONVERSE, A.; BERG, H. A. ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. **General and Comparative Endocrinology**, 2017.

TSAI, M.-Y. et al. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 18975–18980, 2006.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. **The biochemical basis of zinc physiology**. [s.l.: s.n.]. v. 73

VICENCIO, J. M. et al. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1386–1395, 2006.

VON LEDEBUR, E. I. et al. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K⁺ATP channels. **Horm Metab Res**, v. 34, n. 10, p. 550–555, 2002.

WAITES, G. M. H.; SPEIGHT, A. C.; JENKINS, N. A. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. **Journal of reproduction and fertility**, v. 75, n. 1, p. 317–26, 1985.

WALKER, W. H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids**, v. 74, n. 7, p. 602–607, 2009.

WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1557–1569, 2010.

WALKER, W. H. et al. Restoration of spermatogenesis and male fertility using an androgen receptor transgene. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2015.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 15–28, 2005.

WANG, C.; LIU, Y.; CAO, J. M. **G protein-coupled receptors: Extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids** *International Journal of Molecular Sciences*, 2014.

WARREN, D. W.; HALTMEYER, G. C.; EIK-NES, K. B. Testosterone in the fetal rat

testis. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 560–565, 1973.

WASSERMANN, G. F.; LOSS, E. S. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a KIR6.x channel related effect. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 21, p. 2649–56, 2004.

WEHLING, M. Specific , Nongenomic Actions. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 365–393, 1997.

WELLENDORPH, P.; BRÄUNER-OSBORNE, H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. **Gene**, v. 335, n. 1–2, p. 37–46, 2004.

WILSON, J. D. **The role of androgens in male gender role behavior** **Endocrine Reviews**, 1999.

WILSON, J. D.; GRIFFIN, J. E. The use and misuse of androgens. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 29, n. 12, p. 1278–1295, 1980.

WU, F. C. W. **Endocrine aspects of anabolic steroids**. Clinical Chemistry. **Anais...** 1997

YAMAGUCHI, S. et al. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 26, p. 10859–10864, 2009.

YOSHIDA, S. From cyst to tubule: Innovations in vertebrate spermatogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 1, p. 119–131, 2016.

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