



**HAL**  
open science

# Interactions between the estrogenic path and vitamin D in testicular cells

Renata Goncalves

► **To cite this version:**

Renata Goncalves. Interactions between the estrogenic path and vitamin D in testicular cells. Human health and pathology. Normandie Université; Universidade federal de Santa Catarina (Brésil), 2018. Portuguese. NNT : 2018NORMC411 . tel-01885699

**HAL Id: tel-01885699**

**<https://theses.hal.science/tel-01885699>**

Submitted on 2 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

**Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie**

**En cotutelle internationale avec Universidade Federal de Santa Catarina , BRESIL**

### **Interactions entre la signalisation estrogénique et la vitamine D dans les cellules testiculaires**

**Présentée et soutenue par  
Renata GONCALVES**

**Thèse soutenue publiquement le 28/02/2018  
devant le jury composé de**

M. PEDRO FONTES OLIVEIRA	Professeur, Université de Porto	Membre du jury
Mme KATIA PADILHA BARRETO	Professeur, Université Fédérale de Santa Maria	Président du jury
Mme ROZANGELA PEDROSA	Professeur, Université Fédérale de Santa Catarina	Membre du jury
Mme VIRGINIE ROUILLER FABRE	Professeur des universités, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Membre du jury
Mme FATIMA REGINA MENA SILVA	Professeur, Université Fédérale de Santa Catarina	Membre du jury
Mme HELENE BOURAIMA	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par HELENE BOURAIMA, Oestrogènes, reproduction, cancer (Caen)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement







Normandie Université

## THESE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité** Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

**En partenariat international avec Universidade Federal de Santa Catarina - Brésil**

## Interactions entre la signalisation estrogénique et de la vitamine D dans les cellules testiculaires

**Présentée et soutenue par  
Renata GONCALVES**

**Thèse soutenue publiquement le 28/02/2018  
devant le jury composé de**

Mme Héléne BOURAÏMA-LELONG	Professeur de l'Université Caen Normandie	Directeur de thèse
Mme Fátima Regil a Mel a Barreto SILVA	Professeur, UFSC (Brésil)	Examinateur
M. Pedro FONTES OLIVEIRA	Professeur, Universidade do Porto (Portugal)	Rapporteur
Mme Kátia PADILHA BARRETO	Professeur, UFSM (Brésil)	Rapporteur
Mme Virginie ROUILLER-FABRE	Professeur de l'Université Paris 7 Denis Diderot	Examinateur
Mme Rozalinda PEDROSA	Professeur, UFSC (Brésil)	Examinateur

**Thèse dirigée par Héléne BOURAÏMA-LELONG, Laboratoire Oestrogènes, Reproduction, Cancer (OeReCa)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdir (*in memoriam*) e Ivone, pelos ensinamentos, incentivo e amor incondicional. Por entenderem os momentos distantes e sempre me apoiarem nas minhas escolhas. Ao meu irmão, Rodrigo, pela ajuda e pelo carinho em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Luís, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis; por sempre me incentivar a ser melhor.

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Fátima R. M .B. Silva e Profa. Dra. Hélène Bouraïma-Lelong, pelo apoio, confiança e aprendizado, não só na elaboração deste trabalho mas também no dia a dia, com conselhos carinhosos e a presença constante. Vocês são um exemplo que levo para toda a vida.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

À Samilla, pela amizade, paciência e companhia desde os tempos de faculdade.

Aos colegas do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais pela amizade e momentos de agradável convivência. Aos colegas que já não fazem parte do nosso convívio, mas que me ajudaram quando estavam perto e continuam presentes, Ana Paula, Bárbara e Delsi.

Aos colegas do Laboratório OeReCa em Caen, que me acolheram e se tornaram minha segunda família na França. Agradeço todo o apoio, os momentos de distração e também o conforto nos momentos difíceis. Em especial agradeço a Camille, Vanessa, Emmanuelle, Maureen e Fatemeh (OeReCa's girls!), por toda a ajuda, amizade e carinho.

Aos professores e funcionários do Laboratório OeReCa em Caen pelos momentos de ensinamento e convivência.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, em especial a Daiane, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e a École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, e pela oportunidade de realizar o doutorado em co-tutella na França.

## RESUMO

A  $1\alpha,25$ -diidroxivitamina  $D_3$  ( $1,25-D_3$ ) é a forma ativa da vitamina D, sintetizada a partir do colesterol pela exposição solar da pele. As ações deste hormônio são mediadas por um receptor da vitamina D (VDR) no núcleo, resultando em ações genômicas como a regulação da expressão gênica. O VDR também é encontrado na membrana plasmática, e juntamente com o receptor PDIA3 media as ações não genômicas da  $1,25-D_3$ , como a modulação da atividade de canais iônicos e proteínas cinases. A vitamina D possui um papel importante na função reprodutiva, uma vez que a redução da fertilidade foi observada em ratos deficientes em vitamina D, VDR e enzima  $1\alpha$ -hidroxilase, responsável pela última etapa de ativação da vitamina D. Nestes animais, a suplementação com cálcio e estrógenos foi capaz de reverter os efeitos deletérios sobre a função reprodutiva, indicando que há uma relação entre as vias de sinalização da  $1,25-D_3$  e dos estrógenos. O estradiol (E2) é sintetizado a partir da testosterona pela enzima aromatase (CYP19). O E2 está presente em grandes quantidades no sistema reprodutor masculino, e assim como a  $1,25-D_3$  possui ações genômicas e não genômicas, mediadas pelos receptores ESR1, ESR2 e GPER. O bisfenol A (BPA) é um xenoestrógeno utilizado na indústria plástica, capaz de modular o sistema endócrino atuando sobre os mesmos receptores que o E2. O objetivo do presente trabalho foi estudar as interações no metabolismo e nas vias de sinalização da  $1,25-D_3$  e do E2, bem como a influência do BPA em células testiculares. Foram desenvolvidas três linhas de trabalho: tratamentos *in vivo* em ratos de diferentes idades, onde foram analisadas a expressão dos genes e proteínas CYP27A1, VDR e PDIA3 nos testículos; testículos de ratos pré-púberes tratados *in vitro*, onde foram analisados efeitos não genômicos através da técnica de influxo de  $^{45}Ca^{2+}$ ; e células de Leydig isoladas de ratos adultos tratadas *in vitro*, onde foram analisados efeitos genômicos sobre os genes CYP27A1, CYP2R1, VDR, PDIA3, ESR1, CYP19 e também efeitos não genômicos pelo influxo de  $^{45}Ca^{2+}$ . Na primeira linha de trabalho, foram realizados três protocolos experimentais (PE) onde foi administrado E2 e BPA nos animais entre o 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de idade, dos quais uma parte foi eutanasiada ao fim do tratamento (PE1) e outra parte foi mantida após o tratamento até a idade adulta com 75 dias (PE2). Um terceiro grupo de animais recebeu os tratamentos na idade adulta (PE3). No PE1 o tratamento com E2 diminuiu a expressão do gene CYP27A1, que codifica a enzima 25-hidroxilase, responsável pela segunda etapa de ativação da  $1,25-D_3$ . E2 e BPA diminuíram a expressão do gene VDR, efeito que não foi verificado na expressão proteica do receptor. Já no PE2, o E2 aumentou a expressão dos genes VDR, PDIA3 e CYP27A1, e das proteínas VDR e CYP27A1, indicando um efeito compensatório sobre a inibição destes genes na idade pré-púbere. No PE3 não houve mudanças na expressão gênica com os tratamentos, indicando que a idade pré-púbere é mais susceptível a exposição de estrógenos. Na segunda linha de trabalho, foram estudados efeitos não-genômicos do BPA sobre testículos de ratos pré-púberes através do influxo de  $^{45}Ca^{2+}$ . O BPA estimulou o influxo de  $^{45}Ca^{2+}$  em tempos e concentrações semelhantes ao E2. Este efeito foi independente dos ERs clássicos, de maneira consistente com a ativação de um receptor acoplado à proteína G, possivelmente o GPER. Este efeito envolve a modulação de canais iônicos como canais de  $K^+$ , TRPV1 e canais de cloreto. Ainda, o BPA demonstrou poder modular estoques intracelulares de cálcio pela inibição da SERCA e ativação de receptores de  $IP_3$  no retículo endoplasmático. Ele também modula a ativação de enzimas cinases como a PKA e PKC. As respostas rápidas do BPA no influxo de cálcio poderiam, por sua vez, desencadear uma inter-relação através da ativação da MEK e  $p38^{MAPK}$  e mediar respostas genômicas. Na terceira linha de trabalho, foi analisado a expressão de genes envolvidos no metabolismo e sinalização da  $1,25-D_3$  e do E2 nas células de Leydig, um dos principais sítios de produção de E2 no rato adulto. Foi observado que a  $1,25-D_3$  diminuiu a expressão do gene CYP27A1, efeito que também foi observado quando as células foram co-

incubadas com 1,25-D<sub>3</sub> e E2. O E2 teve efeitos negativos sobre a expressão dos genes ESR1 e CYP19. Ambos os hormônios demonstraram um efeito de retroalimentação negativa sobre o seu próprio metabolismo nestas células. Também foram estudados efeitos não genômicos nestas células, onde o E2 parece ter um efeito inibitório enquanto que a 1,25-D<sub>3</sub> foi capaz de estimular o influxo de cálcio. A partir destes resultados podemos concluir que a 1,25-D<sub>3</sub>, o E2 e o BPA possuem efeitos moleculares importantes no sistema reprodutor masculino, através do controle da expressão gênica de receptores e enzimas envolvidos no metabolismo dos hormônios esteroides estudados. Estes resultados também reforçam a teoria de que há uma relação entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2, e assim como a 1,25-D<sub>3</sub>, o E2 e o BPA também possuem efeitos não-genômicos na sinalização do cálcio.

**Palavras-chave:** 1- $\alpha$ ,25-diidroxitamina D<sub>3</sub>, estradiol, bisfenol A, testículos, células de Leydig, VDR, PDIA3, cyp27a1, cálcio.

## ABSTRACT

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>), the active form of vitamin D, is synthesized from cholesterol by skin exposure to the sun. This hormone's actions are mediated by vitamin D receptor (VDR) in the nucleus, resulting in genome actions like gene expression regulation. VDR can also be found in the plasmatic membrane, and together with PDIA3 receptor they mediate 1,25-D<sub>3</sub> non-genomic actions like ion channels and protein kinase modulation. Vitamin D has an important role in reproductive function, since fertility reduction was observed in vitamin D deficient rats, as well as VDR and 1 $\alpha$ -hydroxylase (enzyme responsible for the last step in vitamin D activation) deficiency. In these animals, calcium and estrogen supplementation was able to reverse the deleterious effects in reproductive function, indicating that there is a relation between 1,25-D<sub>3</sub> and estrogens signalling pathways. Estradiol (E2) is synthesized from testosterone by aromatase enzyme (CYP19). E2 is found in high levels in the male reproductive function, and like 1,25-D<sub>3</sub> can induce genomic and non-genomic actions, mediated by ESR1, ESR2 and GPER receptors. Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen utilized in plastic industry, capable of modulating the endocrine system through E2 receptors. The aim of this work was to study metabolism and signaling pathways interactions between 1,25-D<sub>3</sub> and E2, as well as BPA influence in testicular cells. Three lines of work were developed: *in vivo* treatments in different ages where the expression of CYP27A1, VDR and PDIA3 genes and proteins was analysed in the testis; prepubertal rat testis treated *in vitro*, where non genomic effects were analysed by <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx; and isolated adult rats Leydig cells treated *in vitro*, where genomic effects were analysed by the expression of CYP27A1, CYP2R1, VDR, PDIA3, ESR1 and CYP19 genes and non genomic effects were also analysed by <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx. In the first line of work, three treatment protocols (TP) were realized, where E2 and BPA were administrated in rats between 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days, where a portion of the animals were euthanized at the last day of treatment (TP1) and another portion was kept alive after the treatment until euthanized at adult age with 75 days (TP2). A third animal group also received the same treatments when adults (TP3). In TP1, E2 treatment decreased CYP27A1 gene expression, a gene that codes the 25-hydroxylase enzyme, which is responsible for 1,25-D<sub>3</sub> second activating step. E2 and BPA decreased VDR gene expression. This effect was not verified in VDR protein expression. In TP2, E2 increased VDR, PDIA3 and CYP27A1 gene expression, and VDR and CYP27A1 protein expression, indicating a compensatory effect over gene expression inhibition in prepubertal age. In TP3, treatments did not change gene expression, indicating that prepubertal age is more susceptible to estrogen exposure. In the second line of work, non-genomic effects of BPA were studied through <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx in prepubertal rat testis. BPA stimulated <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx in a similar manner to E2. This effect was independent of classical ERs, consistent with a G protein-coupled receptor mechanism, probably GPER. This effect involves the modulation of ionic channels, such as K<sup>+</sup>, TRPV1 and Cl<sup>-</sup> channels. Furthermore, BPA is able to modulate calcium from intracellular storages by inhibiting SERCA and activating IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channels at the endoplasmic reticulum and activate kinase proteins, such as PKA and PKC. The rapid responses of BPA on calcium influx could, in turn, trigger a cross talk by MEK and p38<sup>MAPK</sup> activation and also mediate genomic responses. In the third line of work, the expression of some genes involved in 1,25-D<sub>3</sub> and E2 metabolism and signalling were analysed in Leydig cells, an important E2 production site in adult rats. 1,25-D<sub>3</sub> decreased CYP27A1 gene expression, an effect that was also observed when cells were coincubated with 1,25-D<sub>3</sub> and E2. E2 decreased ESR1 and CYP19 gene expression. Both hormones demonstrated a negative feedback mechanism over their on metabolism in these cells. Non-genomic effects were also studied in these cells, where E2 seems to have an inhibitory effect while 1,25-D<sub>3</sub> was able to stimulate calcium influx. From these results we



can conclude that 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA have important molecular effects in the male reproductive system, through gene expression control over receptors and enzymes involved in the metabolism of the steroid hormones studied. These results also reinforce the theory that there is a relationship between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signalling pathways, as well as 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA also have non-genomic actions in calcium signalling.

## RÉSUMÉ

### Introduction

Depuis plusieurs années la vitamine D est considérée un facteur important pour la fonction reproductive masculine. La 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>) est la forme active de la vitamine D, synthétisée à partir du cholestérol par l'exposition solaire de la peau, par des réactions d'hydroxylation dans le foie, par les enzymes 25-hydroxylase (CYP27A1; CYP2R1) et les reins, par l'enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1). Les actions de cette hormone sont médiées par un récepteur de vitamine D (VDR) dans le noyau, ce qui entraîne des effets génomiques tels que la régulation de l'expression des gènes. Le VDR est également trouvé à la membrane plasmique, et avec le récepteur PDIA3 ils déclenchent des effets non-génomiques de la 1,25-D<sub>3</sub>, tels que la modulation de l'activité des canaux ioniques et des protéines kinases. Certaines études avec des souris déficientes pour VDR montrent une insuffisance gonadique avec une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et des anomalies histologiques. De plus, chez le rat mâle déficient en vitamine D la capacité de reproduction et le taux de fécondité ont été diminués. L'estradiol (E2) est connu comme une hormone typiquement féminine, mais plusieurs études démontrent des effets importants sur la reproduction masculine. L'E2 est synthétisé à partir de la testostérone par l'enzyme aromatasase (CYP19). L'E2 est présent en grandes quantités dans le système reproducteur masculin, et tout comme la 1,25-D<sub>3</sub> a des effets génomiques et non-génomiques médiés par les récepteurs ESR1, ESR2 et GPER. L'absence de certains récepteurs aux estrogènes entraîne l'infertilité chez les souris. De plus, l'absence de l'enzyme aromatasase conduit au développement progressif d'une infertilité chez les souris. Des études montrant une relation entre les voies de signalisation de la vitamine D et des œstrogènes émergent depuis quelques années. L'expression de l'enzyme aromatasase dans des testicules des souris est diminuée avec l'absence du récepteur VDR, mais également la 1,25-D<sub>3</sub> est capable d'augmenter l'expression de cette enzyme dans les cellules de Sertoli de rat. De plus ces études montrent un lien entre production d'E2 et vitamine D. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de l'E2 sur le métabolisme et les voies de signalisation de la vitamine D dans des testicules des rats à différents âges ainsi qu'une perturbation éventuelle initiée par un perturbateur endocrinien à activité estrogénique, le Bisphénol A (BPA).

### Methodologie

Trois axes de travail ont été développés: des traitements *in vivo* chez des rats d'âges différents, où l'expression des gènes et des protéines CYP27A1, VDR et PDIA3 dans les testicules a été analysée (partie 1); testicules de rats pré-pubères traités *in vitro*, où les effets non-génomiques ont été analysés par la technique d'afflux de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (partie 2); et des cellules de Leydig isolées de rats adultes traités *in vitro*, où des effets génomiques sur les gènes CYP27A1, CYP2R1, VDR, PDIA3, ESR1, CYP19 ont été analysés, ainsi que des effets non-génomiques par l'afflux de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (partie 3).

Partie 1: Des traitements *in vivo* ont été réalisés avec des rats à différents stade de développement sexuel. 32 rats Sprague-Dawley ont été répartis en 4 groupes pour chaque protocole expérimental (PE): contrôle (DMSO ; 0,7%), E2 (20  $\mu$ g/kg pc/jour), BPA (50  $\mu$ g/kg pc/jour) et E2 + BPA (20  $\mu$ g/kg pc/jour E2 ; et 50  $\mu$ g/kg pc/jour BPA). Trois PE différentes ont été réalisées: traitement de J15 pp à J30 pp correspondant à la période prépubère, et euthanasie immédiate à J30 (PE1), traitement de J15 pp à J30 pp et euthanasie différée à J75 (PE2) et enfin traitement à l'âge adulte de J60 à J75 et euthanasie immédiate à J75 (PE3). L'expression des gènes cibles (CYP27A1, PDIA3 et VDR) a été mesurée par RT-PCR temps réel et lorsqu'une variation significative du taux d'ARN messager est détectée, l'expression de la protéine est analysée par Western-Blot.

**Partie 2:** Des testicules de rats pré-pubères ont été traités *in vitro*, où les effets non-génomiques ont été analysés par la technique d'afflux de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Des testicules de rats de 30 jours ont été incubés avec tampon KRb frais contenant  $0,1 \mu\text{Ci/mL } ^{45}\text{Ca}^{2+}$  pendant 60 min. Après, le tissu a été incubé par 30, 60 ou 300 s en présence ou absence de E2 ou BPA. Dans quelques expériences des antagonistes des canaux ou inhibiteurs des protéines kinases ont été ajoutés 15 min avant les traitements et maintenus pendant la période d'incubation. En fin d'incubation, le  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire a été lavé avec un tampon contenant du  $\text{LaCl}_3$ . Après, les testicules ont été homogénéisés dans une solution 0,5 M NaOH et des aliquots ont été utilisés pour la détermination de la radioactivité par scintillation liquide et quantification des protéines par la méthode de Lowry.

**Partie 3:** Des cellules de Leydig isolées de rats adultes ont été traités *in vitro*, où des effets génomiques sur les gènes CYP27A1, CYP2R1, VDR, PDIA3, ESR1, CYP19 ont été analysés par RT-PCR temps réel, ainsi que des effets non-génomiques par l'afflux de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Pour les effets génomiques, les cellules ont été traitées avec 1,25-D<sub>3</sub>, E3 ou BPA par 3, 6, 10 et 24 h, et l'expression génique a été analysée. Pour les effets non-génomiques, les cellules ont été traitées avec 1,25-D<sub>3</sub>, E2 et BPA dans conditions similaires que les testicules dans la partie 2.

### Résultats et discussion partie 1

Dans le PE1, avec un traitement en période prépubère et une analyse immédiate, le traitement avec l'E2 montre une diminution de l'expression des ARNm de l'enzyme 25(OH)ase et du récepteur VDR. Le groupe traité au BPA présente une diminution de l'expression de l'enzyme et une augmentation de l'expression de la protéine VDR. Quand le BPA a été ajouté à E2, le BPA a inhibé l'effet du E2 sur l'expression du gène VDR. Dans le PE2, traitement en période prépubère et analyse différée à l'âge adulte, le groupe E2 présente une augmentation des ARNm de l'enzyme 25(OH)ase et des récepteurs VDR et PDIA3, ainsi que les protéines VDR et CYP27A1. Le traitement au BPA ne présente aucun effet significatif. Les traitements n'ont eu aucun effet dans le PE3 qui concerne des animaux traités et analysés à l'âge adulte. Ces résultats démontrent un effet de l'E2, dépendant de l'âge, sur le métabolisme (CYP27A1) et la signalisation (VDR, PDIA3) de la vitamine D dans le testicule de rat. Un traitement en période prépubère entraîne à la fois un effet immédiat et différé alors que le traitement à l'âge adulte semble sans effet. Ceci tend à démontrer que la vitamine D serait une cible de l'E2 lors de l'initiation de la première spermatogenèse en période prépubère. Le BPA seul ne présente pas les mêmes effets que l'E2 mais annule les effets de celui-ci lorsque les deux molécules sont ajoutées ensemble. Ainsi il perturbe la signalisation oestrogénique sur le métabolisme et la signalisation testiculaire de la vitamine D lors de la phase de maturation testiculaire de mise en place de la première vague de spermatogenèse en période prépubère.

### Résultats et discussion partie 2

Le BPA a stimulé l'afflux de calcium dans les concentrations 1  $\mu\text{M}$ , 1 et 0,1  $\text{pM}$  dans des incubations de 5 min. Le BPA a aussi inhibé l'afflux de calcium dans les concentrations 0,1 et 0,01  $\text{fM}$  dans le même temps d'incubation. De cette façon, le BPA a démontré un effet triphasique, de manière un peu pareille avec les effets du E2. Cet effet semble ne pas impliquer les récepteurs classiques des estrogènes, mais semble se produire de manière compatible avec l'activation d'un récepteur couplé à la protéine G, probablement le GPER. Le mécanisme d'action de l'effet du BPA sur l'afflux de calcium a été investigué. Le effet du BPA semble impliquer des canaux TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) et aussi des canaux chlorés, sans la participation des canaux calciques dépendant du voltage. Aussi, le BPA a été capable de changer la signalisation calcique intracellulaire, une fois qu'il semble activer les canaux calciques dépendants du stock par l'épuisement des niveaux calciques du réticulum

endoplasmique. De la même façon, le BPA peut activer des protéines kinases comme la PKA, PKC et des MAPK. Ces résultats démontrent que le BPA peut stimuler l'afflux de calcium d'une forme indépendante des récepteurs classiques des estrogènes. Cet effet se produit par la modulation de la fonction des canaux ioniques, comme des canaux potassiques, TRPV1 et des canaux chlorés. Aussi BPA module le calcium du stock intracellulaire par l'inhibition de la SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) et l'activation du récepteur IP<sub>3</sub>/canaux calcique. Également les protéines kinases PKA, PKC, MEK et p38<sup>MAPK</sup> participent de l'effet du BPA, qui pourrait déclencher un *cross talk* avec les voies de signalisation nucléaires résultant la médiation des réponses génomiques.

### Résultats et discussion partie 3

Les cellules de Leydig représentent, ainsi que les cellules germinales, les sites de synthèse de l'E2 chez le rat. Les gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation de la 1,25-D<sub>3</sub> et de l'E2 ont été analysés *in vitro*. Nous confirmons l'inhibition de l'expression de l'aromatase et du récepteur ESR1 par le traitement avec l'E2 et aussi l'inhibition de l'expression du ARNm de l'enzyme 25(OH)ase (CYP27A1) par la 1,25-D<sub>3</sub>. De plus, les résultats montrent un effet rapide (3-6 h) de la 1,25-D<sub>3</sub> seule et combinée avec E2 sur l'expression du ARNm du CYP27A1. Par contre, aucun effet de la 1,25-D<sub>3</sub> sur la signalisation et métabolisme de l'E2 n'a été mis en évidence. On a aussi vérifié les effets de la vitamine D, l'E2 et le BPA sur l'afflux de calcium dans différents temps d'incubation. Les résultats démontrent que la vitamine D semble stimuler l'afflux de calcium après 60 s d'incubation. D'autre façon l'E2 semble inhiber l'afflux de calcium. L'effet inhibiteur de l'E2 peut être lié au effet de retours négatifs (*negative feedback*) de cette hormone sur les cellules de Leydig, une fois que la présence du calcium est indispensable pour la synthèse des estrogènes.

### Conclusions

En observant les résultats nous pouvons affirmer que la 1,25-D<sub>3</sub>, E2 et le BPA ont des effets moléculaires importants dans le système reproducteur masculin, par l'expression génique des récepteurs et des enzymes impliqués dans le métabolisme des hormones stéroïdes 1,25-D<sub>3</sub> et E2. De plus, les résultats obtenus renforcent la théorie selon laquelle il existe une relation entre les voies de signalisation 1,25-D<sub>3</sub> et E2. Comme le 1,25-D<sub>3</sub> et l'E2, le BPA stimule également les effets non-génomiques impliqués dans la signalisation du calcium.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização do testículo.....	20
Figura 2	Esteroidogênese e a síntese do estradiol.....	22
Figura 3	Ilustração esquemática dos túbulos seminíferos e da espermatogênese.....	23
Figura 4	Ilustração esquemática do processo espermatogênico.....	26
Figura 5	Eixo hormonal reprodutivo masculino.....	27
Figura 6	Representação esquemática da sinalização do cálcio.....	32
Figura 7	Metabolismo da vitamina D.....	34
Figura 8	Mudanças conformacionais da estrutura da 1,25-D <sub>3</sub> .....	36
Figura 9	Mecanismos de ação da 1,25-D <sub>3</sub> .....	37
Figura 10	Mecanismos de ação do E2.....	41
Figura 11	Estrutura química e conformacional do E2 e do BPA.....	43
Figura 12	Esquema demonstrativo dos tratamentos em cada experiência realizada.....	50
Figura 13	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos pré-púberes.....	56
Figura 14	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com E2 e BPA na expressão da proteína VDR em testículos de ratos pré-púberes.....	58
Figura 15	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> na idade pré-púbere com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos adultos tratados na idade pré-púbere.....	59
Figura 16	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> na idade pré-púbere com E2 e BPA na expressão da proteína VDR e CYP27A1 em testículos de ratos adultos tratados na idade pré-púbere.....	61
Figura 17	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos adultos..	62
Figura 18	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com E2 e BPA na expressão da proteína PDIA3 em testículos de ratos adultos.....	63
Figura 19	Efeitos do BPA e do E2 no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	68
Figura 20	Envolvimento dos receptores ERs no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> estimulado pelo BPA e E2 em testículos de ratos de 30 dias.....	70
Figura 21	Envolvimento dos canais VDCC nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	71
Figura 22	Envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP e dos canais TRPV1 nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	72
Figura 23	Envolvimento da bomba Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> e do trocador de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	73
Figura 24	Envolvimento do [Ca] <sup>i</sup> nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	74
Figura 25	Envolvimento dos canais de cloreto nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	75
Figura 26	Envolvimento de proteínas cinases nos efeitos do BPA no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em testículos de ratos de 30 dias.....	76

Figura 27	Representação esquemática das vias de sinalização do cálcio induzidas pelo BPA em testículos de ratos de 30 dias.....	82
Figura 28	Efeito do BPA na expressão do RNAm do gene PDIA3 em células de Leydig de ratos adultos.....	83
Figura 29	Efeito da 1,25-D <sub>3</sub> e do E2 na expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos.....	84
Figura 30	Efeito da 1,25-D <sub>3</sub> , E2 e BPA na expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos.....	85
Figura 31	Efeito da 1,25-D <sub>3</sub> , E2 e BPA na expressão do RNAm do gene ESR1 em células de Leydig de ratos adultos.....	88
Figura 32	Efeito da 1,25-D <sub>3</sub> , E2 e BPA na expressão do RNAm do gene da enzima aromatase (CYP19) em células de Leydig de ratos adultos...	89
Figura 33	Efeitos do E2 e da 1,25-D <sub>3</sub> no influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> em células de Leydig de ratos adultos.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados no PCR em tempo real.....	52
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[Ca]<sup>i</sup></b>	- cálcio intracelular
<b>1,25-D<sub>3</sub></b>	- 1 $\alpha$ ,25-diidroxitamina D <sub>3</sub>
<b>1,25-MARRS</b>	- proteína de ligação a esteróides associado à membrana
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b>	- 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	- 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
<b>Akt</b>	- proteína cinase B
<b>BHT</b>	- barreira hemato-testicular
<b>BPA</b>	- bisfenol A
<b>BPF</b>	- bisfenol F
<b>BPS</b>	- bisfenol S
<b>CaMKII</b>	- proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II
<b>CFTR</b>	- canal regulador de condutância transmembranar de fibrose cística
<b>CYP27B1KO</b>	- deficiência da 1 $\alpha$ -hidroxilase
<b>DBP</b>	- proteína sérica ligadora de vitamina D
<b>DNAc</b>	- DNA complementar
<b>E2</b>	- estradiol
<b>ERE</b>	- elementos responsivos a estrógenos
<b>ERp57</b>	- proteína do retículo endoplasmático 57
<b>ERp60</b>	- proteína do retículo endoplasmático 60
<b>ERs</b>	- receptores de estrógenos
<b>ESR1 / ER<math>\alpha</math></b>	- receptor de estrógenos do tipo 1 / $\alpha$
<b>ESR1KO</b>	- deficiente do receptor ESR1
<b>ESR2 / ER<math>\beta</math></b>	- receptor de estrógenos do tipo 2 / $\beta$
<b>FSH</b>	- hormônio folículo estimulante
<b>GnRH</b>	- hormônio regulador de gonadotrofina
<b>GPER</b>	- receptor de estrógenos acoplado à proteína G
<b>Grp58</b>	- proteína regulada por glicose 58
<b>hCG</b>	- gonadotrofina coriônica humana
<b>HPG</b>	- eixo hipotálamo-hipófise-testículo
<b>IGF-I</b>	- fator de crescimento semelhante à insulina-I
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	- interleucina 1 $\alpha$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	- interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	- interleucina 6
<b>INSL3</b>	- fator semelhante à insulina 3
<b>IP3</b>	- inositol 3-fosfato
<b>KO</b>	- deficiente ( <i>knockout</i> )
<b>KRb</b>	- tampão Krebs Ringer bicarbonato
<b>LA</b>	- células de Leydig adultas
<b>LDH</b>	- lactato desidrogenase
<b>LF</b>	- células de Leydig fetais
<b>LH</b>	- hormônio luteinizante
<b>MAPK</b>	- proteína cinase ativada por mitógenos
<b>MEK</b>	- MAP cinase cinase
<b>NCX</b>	- trocador de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>NOAEL</b>	- nível de efeito adverso não observável
<b>PCB</b>	- compostos bifenilos policlorados
<b>PDIA3</b>	- proteína disulfuro isomerase família A, membro 3



**PE1** - protocolo experimental 1  
**PE2** - protocolo experimental 2  
**PE3** - protocolo experimental 3  
**PI3K** - fosfatidilinositol 3-cinase  
**PKA** - proteína cinase A  
**PKB** - proteína cinase B  
**PKC** - proteína cinase C  
**PLC** - fosfolipase C  
**PPAR $\gamma$**  - receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo gama  
**PTH** - hormônio da paratireoide  
**RBMVEC** - células endoteliais microvasculares de cérebro de rato  
**RNA** - ácidos ribonucleicos  
**RXR** - receptor retinóide  
**SERCA** - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático  
**SERM** - modulador seletivo de receptores de estrógenos  
**SOCs** - canais de cálcio dependentes dos estoques  
**StAR** - proteína reguladora aguda da esteroidogenese  
**TDI** - dose de gestão diária aceitável  
**TGF $\alpha$**  - fator de transformação de crescimento  $\alpha$   
**TGF $\beta$**  - fator de transformação de crescimento  $\beta$   
**TNK2** - tirosina cinase não receptora 2  
**TRP** - canais iônicos receptores de potencial transiente  
**TRPV1** - canais iônicos receptores de potencial transiente tipo vanilóide  
**VDCC** - canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem  
**VDR** - receptor da vitamina D  
**VDRKO** - deficiente do receptor VDR

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>Sistema Reprodutor Masculino</b>	<b>19</b>
1.1.1	Testículos e túbulos seminíferos	19
1.1.2	Células de Leydig e a esteroidogênese	20
1.1.3	Células de Sertoli	22
1.1.4	Células germinativas e espermatogênese	24
1.1.5	Regulação da espermatogênese	26
<b>1.2</b>	<b>Sinalização do cálcio</b>	<b>28</b>
1.2.1	Influxo de cálcio da região extracelular	29
1.2.2	Mobilização do cálcio de reservas intracelulares	30
1.2.3	Importância do cálcio para a função reprodutiva	32
<b>1.3</b>	<b>1<math>\alpha</math>,25-diidroxitamina D3</b>	<b>33</b>
1.3.1	Metabolismo da vitamina D	33
1.3.2	Mecanismo de ação da 1,25-D <sub>3</sub>	35
1.3.3	VDR e PDIA3 como receptores da vitamina D	37
1.3.4	1,25-D <sub>3</sub> e a função reprodutora	38
<b>1.4</b>	<b>Estradiol e o sistema reprodutor masculino</b>	<b>39</b>
1.4.1	Aromatase e a síntese do estradiol	39
1.4.2	Receptores do estradiol	40
1.4.3	Efeitos dos estrógenos na reprodução masculina	41
<b>1.5</b>	<b>Perturbadores endócrinos com atividade estrogênica: o Bisfenol A</b>	<b>42</b>
1.5.1	BPA na reprodução masculina	44
<b>1.6</b>	<b>Evidências de interações entre as vias da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>48</b>
3.1	Desenho experimental	48
3.2	Animais	48
3.3	Tratamentos <i>in vivo</i>	49
3.4	Cultura de células de Leydig	50
3.5	Extração e Quantificação do RNA total	51
3.6	Amplificação dos transcritos dos genes	51
3.6.1	Transcrição Reversa (RT)	51
3.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR tempo real)	51
3.7	Extração de proteínas	52
3.8	Western Blot	53
3.9	Tratamentos <i>in vitro</i> – Influxo de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup>	54
3.10	Análise estatística	54
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
4.1	Parte I: Efeitos genômicos do tratamento <i>in vivo</i> de E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D <sub>3</sub> em testículo de ratos de diferentes idades	56
4.1.1	Resultados	56
4.1.2	Discussão	64
4.2	Parte II: Estudo dos efeitos não genômicos <i>in vitro</i> do BPA em testículos de ratos pré-púberes	67
4.2.1	Resultados	67
4.2.2	Discussão	77

<b>4.3 Parte III: Efeitos da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e E2 em células de Leydig de ratos adultos tratadas in vitro .....</b>	<b>83</b>
4.3.1 Resultados .....	83
4.3.2 Discussão.....	91
<b>5 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>95</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE A – Manuscrito artigo 1.....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE B – Manuscrito artigo 2.....</b>	<b>138</b>
<b>APÊNDICE C – Manuscrito artigo 3 .....</b>	<b>166</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Reprodutor Masculino

O Sistema Reprodutor Masculino consiste em um par de testículos, vias espermáticas (epidídimo, canal deferente, uretra), pênis e glândulas anexas (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais). Nos testículos ocorre a produção de espermatozóides e hormônios sexuais; nas vias espermáticas ocorre a maturação, circulação e liberação dos espermatozóides enquanto que as glândulas anexas secretam os fluidos de transporte e nutrição que irão formar, juntamente com os espermatozóides, o esperma (FAWCETT, 1993).

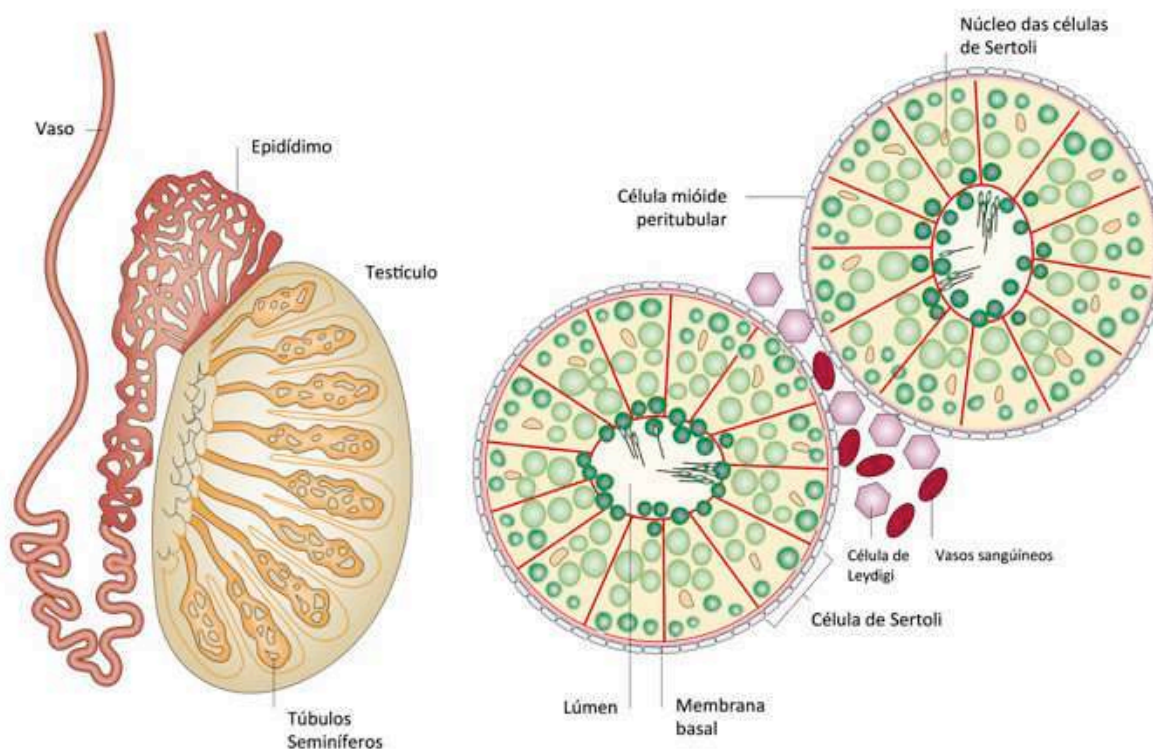
### 1.1.1 Testículos e túbulos seminíferos

O testículo é um órgão complexo e compartimentalizado que possui duas funções importantes no processo de reprodução: a produção de hormônios sexuais esteroides e a produção de gametas (espermatogênese e espermiogênese). Estas funções testiculares são controladas por gonadotrofinas e diversos fatores sintetizados localmente, como esteroides, fatores de crescimento e citocinas (BOURGUIBA et al., 2003; CARREAU; HESS, 2010; SAEZ, 1994).

O tecido testicular é dividido em dois compartimentos: os túbulos seminíferos e o tecido intersticial (figura 1). O compartimento intersticial está situado entre os túbulos seminíferos e constituído de tecido conjuntivo frouxo, células de Leydig (responsáveis pela produção de testosterona), assim como fibroblastos, macrófagos, linfócitos e vasos sanguíneos e linfáticos. Nos túbulos seminíferos ocorre a produção de gametas, sendo o epitélio constituído por células de Sertoli rodeadas pelas células germinativas, as quais se diferenciam por meiose a espermatozóides. O epitélio seminífero é cercado por células peritubulares ou mióides, que estão em contato com a superfície basal das células de Sertoli e espermatogônias. Estas células provocam contrações que contribuem para o movimento dos espermatozoides e do fluido através do lúmen dos túbulos seminíferos (BELLVÉ et al., 1977; JOHNSON; THOMPSON; VARNER, 2008; KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009). Os túbulos seminíferos formam um ambiente adequado para as células germinativas se desenvolverem, sendo considerados a unidade funcional do testículo. As células de Sertoli,

por sua vez, são consideradas o principal componente estrutural do epitélio seminífero por possuírem um papel central no desenvolvimento funcional do testículo (RATO et al., 2012).

**Figura 1:** Organização do testículo



Fonte: adaptado de COOKE; SAUNDERS, 2002.

### 1.1.2 Células de Leydig e a esteroidogênese

As células de Leydig são encontradas no compartimento intersticial do testículo. Estas células se organizam em grupos em torno dos capilares presentes entre os túbulos seminíferos. Elas são responsáveis pela produção e secreção de hormônios e fatores importantes para a diferenciação, desenvolvimento e maturação do sistema reprodutor masculino (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003).

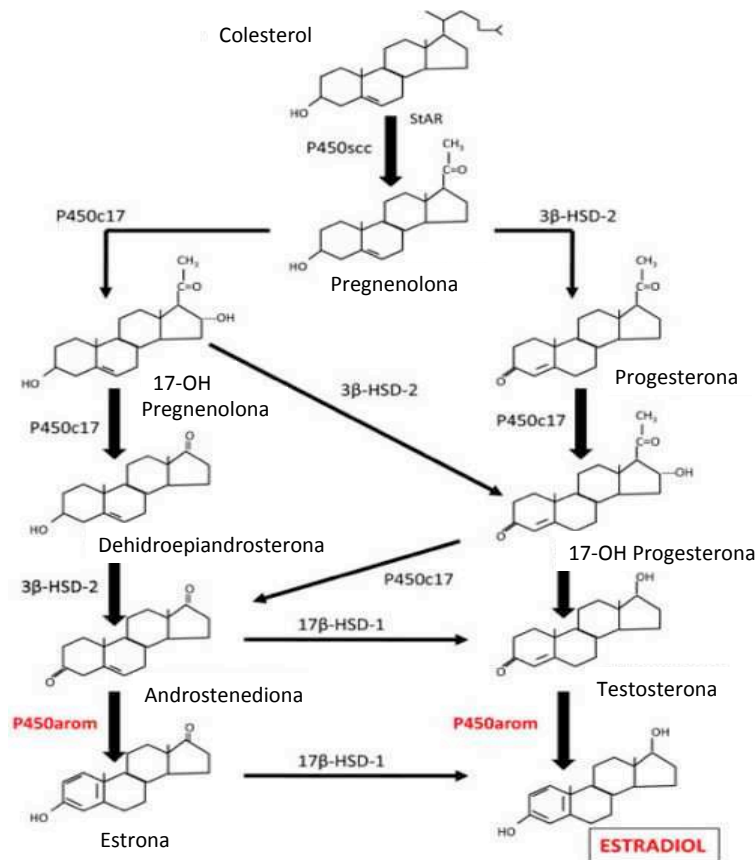
No rato, as células de Leydig podem ser diferenciadas em dois tipos: células de Leydig fetais (LF) e adultas (LA). Entre os dois tipos são encontradas diferenças morfológicas e funcionais, como tempo de vida, capacidade de síntese de andrógenos e mecanismos de regulação por gonadotrofinas e fatores de crescimento. As LF podem ser reconhecidas a partir do 14º dia fetal até o 25º dia pós natal através da presença da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) e receptores do hormônio luteinizante (LH). As

LA podem ser identificadas a partir do 10<sup>o</sup> dia pós natal, e passam por três estágios de desenvolvimento: células progenitoras, imaturas e maduras. Como células adultas, os níveis das enzimas que participam da biossíntese de testosterona aumentam, o que torna a testosterona o principal andrógeno produzido pelas LA. O processo de diferenciação e maturação das LA é considerado completo em torno do 70<sup>o</sup> dia pós natal (para revisão ver (PAYNE; HARDY, 2007)).

Uma das principais funções das células de Leydig é a síntese de testosterona. A testosterona, um hormônio andrógeno esteroide, é sintetizada quase exclusivamente por estas células. Através da esteroidogênese, o colesterol é convertido em testosterona por uma série de reações enzimáticas, envolvendo as enzimas StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese), 3 $\beta$ -HSD e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD), entre outras (figura 2) (PAYNE; HALES, 2004). A síntese de andrógenos pelas células de Leydig é essencial para a diferenciação do trato genital masculino, masculinização e diferenciação sexual do sistema nervoso central durante o desenvolvimento sexual masculino, além da manutenção da espermatogênese na idade adulta (RENSHAN; HARDY, 2007). As células de Leydig também são responsáveis pela secreção do fator semelhante à insulina 3 (INSL3). Este fator atua na iniciação do processo de descida do testículo da cavidade abdominal, o que é demonstrado pelo desenvolvimento de criptorquidia em modelo de animais knockout para este gene. Diferentemente da testosterona, cuja produção e secreção é regulada pelo LH, o INSL3 é expresso constitutivamente pelas células de Leydig, podendo ser usado com um marcador de função destas células (IVELL; WADE; ANAND-IVELL, 2013).

A atividade das células de Leydig, assim como as enzimas que participam da esteroidogênese são reguladas por diversos fatores. Dentre eles podemos citar hormônios como o LH, andrógenos e estrógenos, hormônio antimulleriano; fatores de crescimento como interleucinas, fator de transformação de crescimento  $\beta$  e a inibina (HAIDER, 2004).

**Figura 2:** Esteroidogênese e a síntese do estradiol

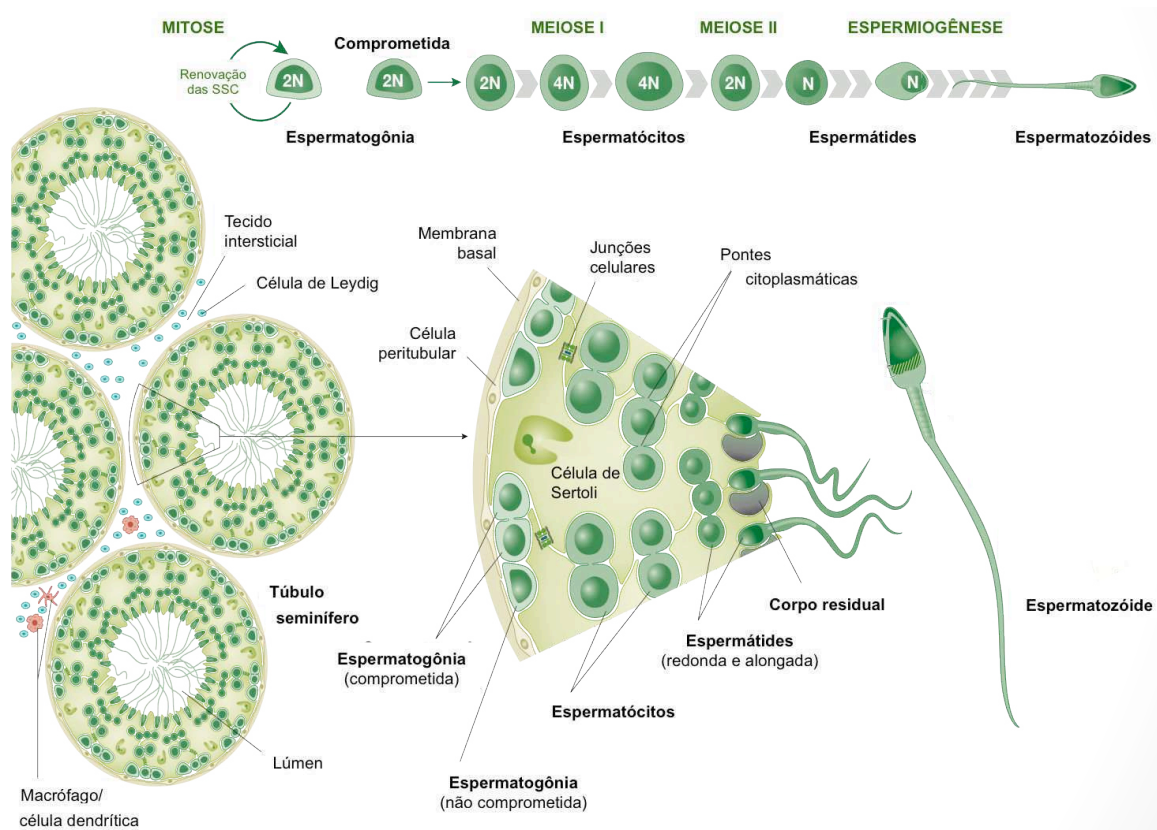


Fonte: adaptado de NOTHNICK, 2011.

### 1.1.3 Células de Sertoli

As células de Sertoli são o principal elemento estrutural do epitélio seminífero. Frequentemente chamadas de “células enfermeiras”, são responsáveis pela regulação do fluxo de nutrientes e fatores de crescimento para as células germinativas em desenvolvimento (figura 3). As células de Sertoli formam junções apertadas próximo à membrana basal entre as células adjacentes, criando a barreira hemato-testicular (BHT). A BHT atua como uma barreira física, imunológica e fisiológica, controla o fluxo de moléculas, nutrientes, células do sistema imune e citocinas entre os compartimentos basal e luminal do túbulo seminífero (PETERSEN; SODER, 2006; RATO et al., 2012).

**Figura 3:** Ilustração esquemática dos túbulos seminíferos e da espermatogênese.



Fonte: adaptado de KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009.

As células de Sertoli fornecem fatores necessários para o metabolismo das células germinativas, como lactato, transferrina e proteína ligadora de andrógeno. São também responsáveis pela produção de fatores de crescimento (fator de célula tronco, fatores de transformação de crescimento  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I)) (SKINNER, 2005).

Nos testículos de mamíferos, as células de Sertoli exercem um papel chave no início e na manutenção da espermatogênese. A proliferação das células de Sertoli ocorre mais ativamente antes do nascimento, e em ratos a proliferação se estende até três semanas após o nascimento. Este processo possui várias etapas e é denominado “maturação”, onde as células se transformam de células “fetais” em “adultas”, perdendo a capacidade proliferativa e ativando várias funções necessárias para a manutenção e suporte da espermatogênese. Após este período, o número de células de Sertoli, por testículo, é considerado estável no decorrer da vida animal. O número de células de Sertoli no testículo adulto determina tanto o tamanho do testículo como a produção diária de esperma. Esta relação se dá pelo fato que cada célula de Sertoli possui capacidade fixa para o número de células germinativas que consegue



suportar/sustentar (PETERSEN; SODER, 2006; SHARPE et al., 2003; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). As células de Sertoli formam associações íntimas com as células germinativas através de inúmeras prolongações citoplasmáticas nos diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas (RATO et al., 2012).

Já foi demonstrado que as células de Sertoli são alvos da ação de diversos hormônios, fatores parácrinos e autócrinos. Entre eles, atuam nas Sertoli o hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona, hormônios da tireoide, prolactina, retinol, vitamina D, estrogênio, fatores de crescimento, inibina B e citocinas inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6). Vários destes hormônios agem nas células de Sertoli regulando funções celulares como secreção, proliferação, diferenciação e atividade enzimática (PETERSEN; SODER, 2006; SHARPE et al., 2003; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). A investigação da função das células de Sertoli *in vitro* está focada na influência de vários fatores endócrinos e parácrinos na expressão e atividade de certas proteínas, como transferrina, aromatase, receptor de andrógenos e a lactato desidrogenase (LDH) (PETERSEN; SODER, 2006).

#### 1.1.4 Células germinativas e espermatogênese

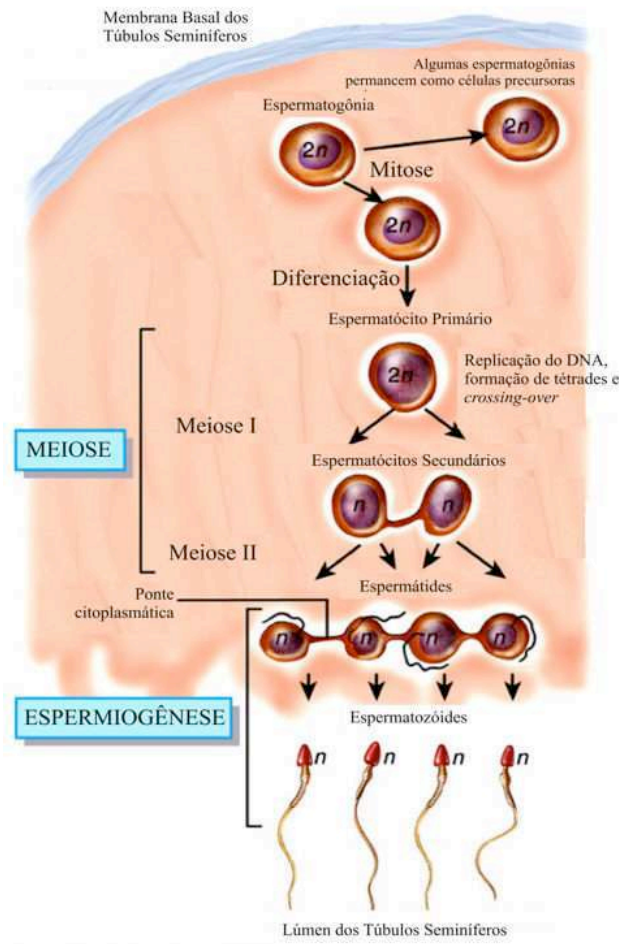
As células germinativas são encontradas nos túbulos seminíferos, entre as células de Sertoli. O processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas possui diferentes estágios, no decorrer dos quais as células germinativas podem ser classificadas em espermatogônias, espermatócitos primário e secundário e espermatíde (redonda e alongada) (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003).

Na espermatogênese as células germinativas passam por uma complexa diferenciação que envolve diversas alterações morfológicas, levando à formação de espermatozoides diferenciados. A espermatogênese pode ser subdividida em três fases principais: (i) proliferação mitótica espermatogonial, (ii) meiose e (iii) espermiogênese – processo morfológico onde a espermatíde haploide é convertida em espermatozoide (LEBLOND; CLERMONT, 1952). No decorrer da espermatogênese, as células germinativas se movem da periferia para o lúmen do túbulo seminífero. Um corte transversal do túbulo seminífero mostra as espermatogônias localizadas na base do túbulo, espermatócitos no meio, e espermatídes no ápice do epitélio, demonstrando a progressão do desenvolvimento de células imaturas às células germinativas maduras à medida que elas se movem em direção ao lúmen, onde as espermatídes são liberadas, ou espermiadas como espermatozoides (HESS; FRANÇA, 2008; RATO et al., 2012).

A espermatogênese inicia com a replicação mitótica de células tronco espermatogênicas (espermatogônia A) para garantir a linhagem de células germinativas e dar início a novas populações. Uma das células filhas se diferencia a espermatogônia B, que pode ser identificada através de critérios morfológicos. A espermatogônia B se diferencia em espermatócito primário, o qual atravessa a BHT e entra na primeira fase da divisão meiótica, gerando espermatócitos secundários. Na segunda divisão meiótica são produzidas espermátides redondas. Uma vez que espermátides são formadas, a divisão celular para e é iniciado o processo de espermiogênese, que dá origem a espermátides alongadas. Este processo culmina na liberação das espermátides alongadas do epitélio germinal no lúmen do túbulo seminífero, sendo as células livres chamadas de espermatozóides (figura 4) (DE ROOIJ, 2001; HESS; FRANÇA, 2008; HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003). Através da técnica de citometria de fluxo, a cinética de aparição dos diferentes tipos de células germinativas no decorrer do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino no rato foi determinada (MALKOV; FISHER; DON, 1998). A primeira onda de meiose termina entre o 24<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dia após o parto, com a aparição das espermátides redondas. Os primeiros espermatozóides podem ser visualizados a partir do 36<sup>o</sup> dia após o parto.

Os diferentes estágios de maturação de uma geração de células germinativas seguem uma sucessão cronológica em um ponto fixo do túbulo seminífero, num processo denominado ciclo do epitélio seminífero, ou ciclo da espermatogênese. No rato, o ciclo do epitélio seminífero pode ser dividido em 14 estágios, onde variam o tipo de célula germinativa predominante e a associação entre as células de Sertoli e germinativas (BITTMAN, 2015; LEBLOND; CLERMONT, 1952).

**Figura 4:** Ilustração esquemática do processo espermatogênico



Fonte: adaptado de <http://www.studyblue.com/notes/n/reproduction-i-male/deck/1107820>.

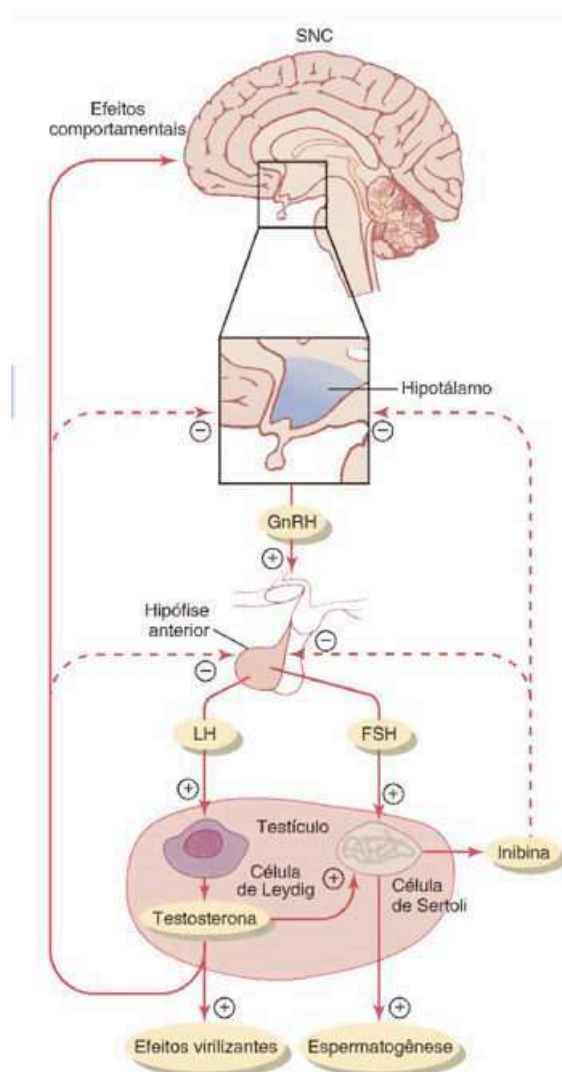
### 1.1.5 Regulação da espermatogênese

A espermatogênese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo (*hypothalamic-pituitary-gonadal axis*, eixo HPG), basicamente por dois hormônios pituitários: FSH e LH, os quais ligam funcionalmente o cérebro com os testículos e a disfunção deste eixo leva a infertilidade. No hipotálamo, a secreção pulsátil do hormônio regulador de gonadotrofina (GnRH) inicia a liberação de LH da hipófise, estimulando as células de Leydig a produzir testosterona. A testosterona é distribuída por todo o organismo, o que fornece um controle de retroalimentação negativa para a hipófise relacionada à atividade secretória das células de Leydig. Nos túbulos seminíferos a testosterona atua no processo de espermatogênese. A estimulação das células de Sertoli pelo FSH secretado pela hipófise é necessária para a

maturação das células germinativas. Em resposta a este processo, as células de Sertoli secretam inibina no mecanismo de retroalimentação negativa direcionado à hipófise (figura 5) (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; PETERSEN; SODER, 2006; RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010).

A testosterona e o FSH possuem um papel importante na regulação da espermatogênese. Em roedores, o FSH tem ação principalmente no desenvolvimento espermatogonial, enquanto que a testosterona parece ter um efeito negativo na proliferação. A testosterona suporta parcialmente a maturação dos espermatócitos, porém em ratos é essencial na progressão de espermatídes redondas para alongadas. Tanto a testosterona como o FSH são necessários para a liberação das espermatídes das células de Sertoli (RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010; SHETTY et al., 2002).

**Figura 5:** Eixo hormonal reprodutivo masculino



Fonte: adaptado de HALL, 2011.

A regulação da espermatogênese não depende somente dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, mas também de diversas moléculas sintetizadas localmente pelas células somáticas e germinativas, como esteroides, fatores de crescimento e citocinas. Além dos andrógenos, o estrogênio tem um papel direto na regulação da espermatogênese, estimulando funções como motilidade, produção de lactato e metabolização de diversos substratos em espermatozóides. Outros fatores de crescimento também são liberados pelas células de Sertoli e diversos tipos de células germinativas, formando um complexo sistema de regulação das funções celulares e dos processos de desenvolvimento das células germinativas (ALVES et al., 2013).

## 1.2 Sinalização do cálcio

O cálcio é um dos principais íons envolvidos nos processos de sinalização intracelulares e participa como segundo mensageiro em diversos eventos celulares. Assim, o cálcio é capaz de converter estímulos externos, como a ação de hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento em ações específicas dentro das células. Algumas destas ações resultam em respostas biológicas fundamentais para o funcionamento das células, como a proliferação celular, modificações no citoesqueleto e reações do metabolismo intermediário (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; ZAMONER et al., 2005, 2007a).

A sinalização do cálcio é ativada pela entrada deste íon do meio extracelular para o meio intracelular, por meio de canais iônicos, ou pela liberação no citosol a partir de estoques intracelulares. Sendo assim, a concentração de cálcio livre é estritamente regulada. No meio intracelular, a concentração de cálcio livre em células em repouso é baixa, na faixa de concentração nanomolar. Já na região extracelular, o cálcio está presente na faixa de concentração milimolar. Embora as concentrações intracelulares de cálcio sejam baixas, as células possuem uma ampla capacidade de armazenamento em compartimentos citosólicos específicos. O retículo endoplasmático e a mitocôndria são as principais organelas que participam do processo de armazenamento e liberação no citoplasma (KRAUSS, 2003).

O controle da sinalização do cálcio nas células é extremamente importante para o metabolismo celular. Conforme a concentração de cálcio presente, este íon pode ser um sinal de vida ou morte. Altas concentrações de cálcio intracelulares ( $[Ca]_i$ ) ativam enzimas sensíveis a cálcio que atuam na digestão de proteínas, iniciando processos necróticos. A total depleção dos estoques de cálcio no retículo endoplasmático também pode gerar sinais

apoptóticos, pela sobrecarga de cálcio na mitocôndria. Por estes motivos, a sinalização do cálcio é ativada na forma de ondas ou gradientes que por sua vez ativam certos eventos celulares, como secreção celular através de vesículas ou a contração de células musculares. A manutenção da concentração de cálcio é então determinada pelo equilíbrio entre os sinais positivos que estimulam o aumento de  $[Ca]_i$  e os sinais negativos, que diminuem a concentração de cálcio no citosol pela ação combinada de tampões, bombas e trocadores (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003).

### 1.2.1 *Influxo de cálcio da região extracelular*

Um dos mecanismos para o aumento da concentração de  $[Ca]_i$  é a entrada de cálcio do meio extracelular para o citosol. Neste processo, canais presentes na membrana plasmática são ativados, onde ocorre o aumento a permeabilidade destes canais e conseqüentemente um aumento nas correntes de cálcio (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988). Os principais tipos de canais que participam deste processo são:

- Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC);
- Canais de cálcio dependentes de ligante;
- Canais de cálcio ativados por estímulos mecânicos;
- Canais de cálcio dependentes dos estoques (SOCs).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) são canais cuja ativação depende da despolarização ou alteração do potencial de membrana das células. Estes podem ser divididos de acordo com as características farmacológicas e/ou eletrofisiológicas em seis classes: L-, N-, P/Q-, R- e T- (HOFMANN; LACINOVÁ; KLUGBAUER, 1999; TSIEN; ELLINOR; HORNE, 1991). Estes canais também podem ser classificados de acordo com a estrutura da subunidade  $\alpha_1$  de cada canal. Assim, estes canais também podem ser divididos em três grandes famílias: Cav1, onde entram os VDCC do tipo L; Cav2, da qual fazem parte os canais do tipo N, P/Q e R; e Cav3, representada pelos canais do tipo T (CATTERALL, 2000).

Canais dependentes de ligantes são ativados pela ligação de um agonista no domínio extracelular do canal. Como exemplos podem ser citados o receptor de acetilcolina e os canais NMDA. Dentro desta classe também estão os canais TRP (canais iônicos receptores de potencial transiente, do inglês *transient receptor potencial channel*). Com base na estrutura, os canais TRP são subdivididos em 7 grupos: TRPC (Canônico) 1 a 7, TRPV (Vanilóide) 1 a 6, TRPM (Melastatina) 1 a 8, TRPP (Policistina) 2, 3 e 5, TRPML (Mucolipina) 1 a 3,

TRPA1 (Anquirina) e TRPN (Mecanoreceptores potencial C). Além de serem ativados por ligantes, os canais TRP também podem ser ativados por segundos mensageiros, como a proteína cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC), e também podem atuar como canais de cálcio dependentes do estoque (SOCs) (FLINIAUX et al., 2017). Os canais TRPV1 estão dentre os canais do tipo TRP mais estudados. Eles podem ser ativados pela ligação do vanilóide capsaicina, por altas temperaturas (acima de 43°C) e lipídios, dentre outros. Estes canais possuem diversos sítios de fosforilação na sua estrutura, podendo ser alvo de regulação da PKA, PKC e da proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII) (ROSENBAUM; SIMON, 2007).

Os SOCs são ativados em resposta à depleção dos estoques de  $[Ca]_i$ . Estes canais possuem uma relação muito próxima com o retículo endoplasmático. Os SOCs são responsáveis por fornecer cálcio para reabastecer o retículo endoplasmático depois que o cálcio presente neste for liberado (PRAKRIYA; LEWIS, 2015). Além de serem ativados pela depleção do cálcio do retículo, alguns estudos demonstram que estes canais também podem ser ativados pela atividade da PKC (GAO et al., 2012; MA; KUDLACEK; SANSOM, 2002; SALEH et al., 2008) e de receptores acoplados à proteína G (TOMINAGA; WADA; MASU, 2001).

### *1.2.2 Mobilização do cálcio de reservas intracelulares*

Como mencionado anteriormente, a mitocôndria e o retículo endoplasmático são as principais organelas envolvidas na manutenção das concentrações de cálcio e nos estoques intracelulares. Os estoques de cálcio na mitocôndria estão relacionados ao funcionamento do ciclo do ácido cítrico, onde a atividade de diversas enzimas como a piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutaramato desidrogenase são dependentes da presença de cálcio (RIZZUTO et al., 2012). O armazenamento de cálcio na mitocôndria restringe-se a momentos de altas concentrações de cálcio no citoplasma, através de sistemas de transporte de cálcio presentes na membrana mitocondrial interna (KRAUSS, 2003). O acúmulo excessivo de cálcio na mitocôndria, por sua vez, leva a diminuição do potencial de membrana e a produção de espécies reativas de oxigênio. O aumento de espécies reativas na mitocôndria causam o rompimento da membrana e a liberação de elementos do espaço intermembrana, como o citocromo c, que leva a ativação de processos apoptóticos (LA ROVERE et al., 2016).

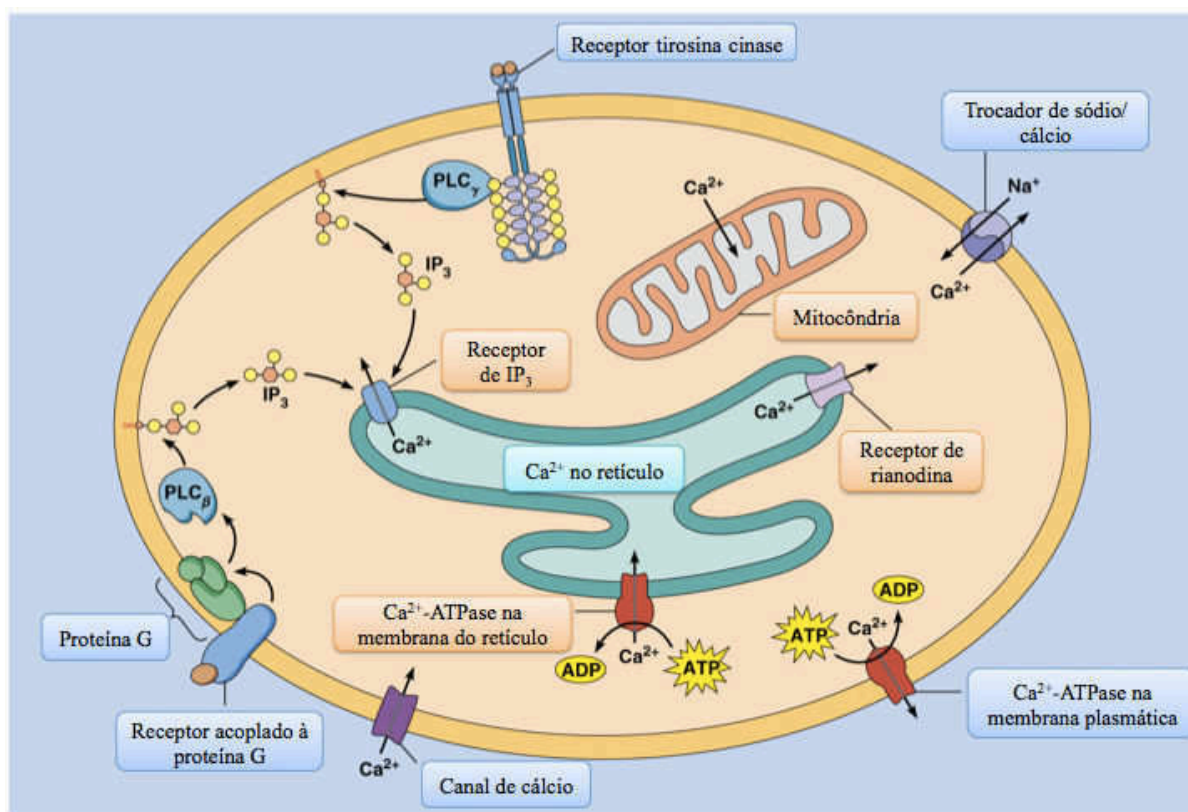
O retículo endoplasmático é a principal organela responsável pelos estoques de  $[Ca]_i$ . A concentração de cálcio no retículo endoplasmático é em torno de 1 mM, semelhante às concentrações extracelulares deste íon. Esta organela possui diferentes proteínas ligantes de cálcio que contribuem para o armazenamento e liberação do cálcio do retículo, como a calsequestrina, calreticulina e calnexina (CHEMALY; TRONCONE; LEBECHE, 2017). Estas proteínas tem como propriedades a ligação ao íon cálcio, regulação das bombas de cálcio e dos canais liberadores de cálcio, além de poderem atuar como chaperonas no dobramento de proteínas, demonstrando uma ligação importante entre as concentrações de cálcio e a função do retículo endoplasmático (BERRIDGE, 2002).

A liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático ocorre predominantemente pelos receptores de IP3 e pelos receptores de rianodina. Na liberação de cálcio mediada pelo IP3, a ativação da fosfolipase C (PLC) leva a liberação de IP3 a partir do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato na membrana plasmática, onde também é liberada uma molécula de diacilglicerol. O IP3 interage com os receptores na membrana do retículo endoplasmático, liberando assim cálcio no citosol (BERRIDGE, 2009). Os receptores de rianodina são semelhantes aos receptores de IP3 na estrutura e função. Ambos os canais são sensíveis às concentrações citosólicas de cálcio, embora os canais de rianodina geralmente sejam ativados e inibidos por concentrações maiores de cálcio (BOOTMAN et al., 2001).

Após o aumento da concentração de  $[Ca]_i$  resultante de um estímulo, a remoção do cálcio do citosol para o meio extracelular acontece através da  $Ca^{2+}$ -ATPase presente na membrana plasmática, assim como pelo trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX). O NCX realiza o transporte ativo de três  $Na^+$  e um  $Ca^{2+}$  utilizando a energia do gradiente de  $Na^+$  como força motriz. A função do NCX também está relacionada à bomba  $Na^+/K^+$ , onde a inibição da bomba  $Na^+/K^+$  pode levar ao acúmulo de  $Na^+$  dentro da célula, estimulando o NCX a realizar o transporte no sentido inverso retirando  $Na^+$  do citosol e transportando cálcio para dentro da célula (SHATTOCK et al., 2015). O cálcio livre em excesso também é sequestrado pelo retículo endoplasmático através da atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA). A SERCA é a única forma de transporte ativo do citosol para o retículo endoplasmático, onde há a troca de dois íons cálcio por molécula de ATP hidrolisada (figura 6) (CHEMALY; TRONCONE; LEBECHE, 2017; GWATHMEY; YEREVANIAN; HAJJAR, 2011).



**Figura 6:** Representação esquemática da sinalização do cálcio.



Fonte: adaptado de [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14\\_12.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14_12.jpg)

### 1.2.3 Importância do cálcio para a função reprodutiva

Além de possuir um papel extremamente importante como segundo mensageiro, o cálcio também possui papel fundamental na função reprodutiva masculina. O cálcio participa de vários processos no sistema reprodutor, desde a esteroidogênese até a fecundação do ovócito no sistema reprodutor feminino. Na esteroidogênese o cálcio é um fator essencial para a síntese de testosterona e estradiol. Em células de Leydig, o LH estimula o aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  através de canais VDCC tipo T e canais de rianodina, sendo este aumento essencial para a secreção de testosterona (COSTA; VARANDA, 2007; COSTA; VARANDA; FRANCI, 2010). Enzimas como a StAR respondem ao aumento dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  que ocorre no início da esteroidogênese (CHERRADI et al., 1997).

O cálcio também participa na homeostasia da BHT. Nas células de Sertoli, o retículo endoplasmático está ligado com filamentos de actina. Estes filamentos estão posicionados próximo a membrana plasmática em regiões relacionadas com a adesão intercelular e movimentação das células germinativas. Sendo assim, é possível que a sinalização do cálcio possa estar envolvida com a regulação do citoesqueleto nesta região, considerando o papel do

retículo endoplasmático na homeostase do cálcio (GROVE; VOGL, 1989). Além disso, proteínas envolvidas na sinalização do cálcio aparentam possuir um papel importante nas junções intercelulares e estruturas relacionadas à translocação das células germinativas através da BHT, e também na liberação das células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos. Porém o papel do cálcio na BHT ainda não está totalmente claro (LI et al., 2010; LYON et al., 2017; VOGL et al., 2017).

No espermatozóide, o cálcio é crucial para a reação acrossômica e para a mobilidade. O cálcio também participa da quimiotaxia e do processo de capacitação – todos estes processos necessários para o espermatozóide chegar até o ovócito e ocorrer a fusão das duas células (BREITBART, 2002; CORREIA; MICHELANGELI; PUBLICOVER, 2015; PUBLICOVER; HARPER; BARRATT, 2007). A presença da sinalização do cálcio nestes processos enfatiza a importância da sinalização deste íon para a função reprodutiva como um todo.

### **1.3 1 $\alpha$ ,25-diidroxitamina D3**

1 $\alpha$ ,25-diidroxitamina D3 (1,25-D<sub>3</sub>), também conhecida como calcitriol, é a forma ativa da vitamina D<sub>3</sub>. Esta molécula chave do sistema endócrino da vitamina D possui efeitos biológicos em cerca de 37 alvos celulares. A 1,25-D<sub>3</sub> está envolvida em uma série de processos celulares como homeostasia do cálcio, diferenciação celular, respostas imunológicas e regulação da expressão gênica (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995; MIZWICKI; NORMAN, 2009).

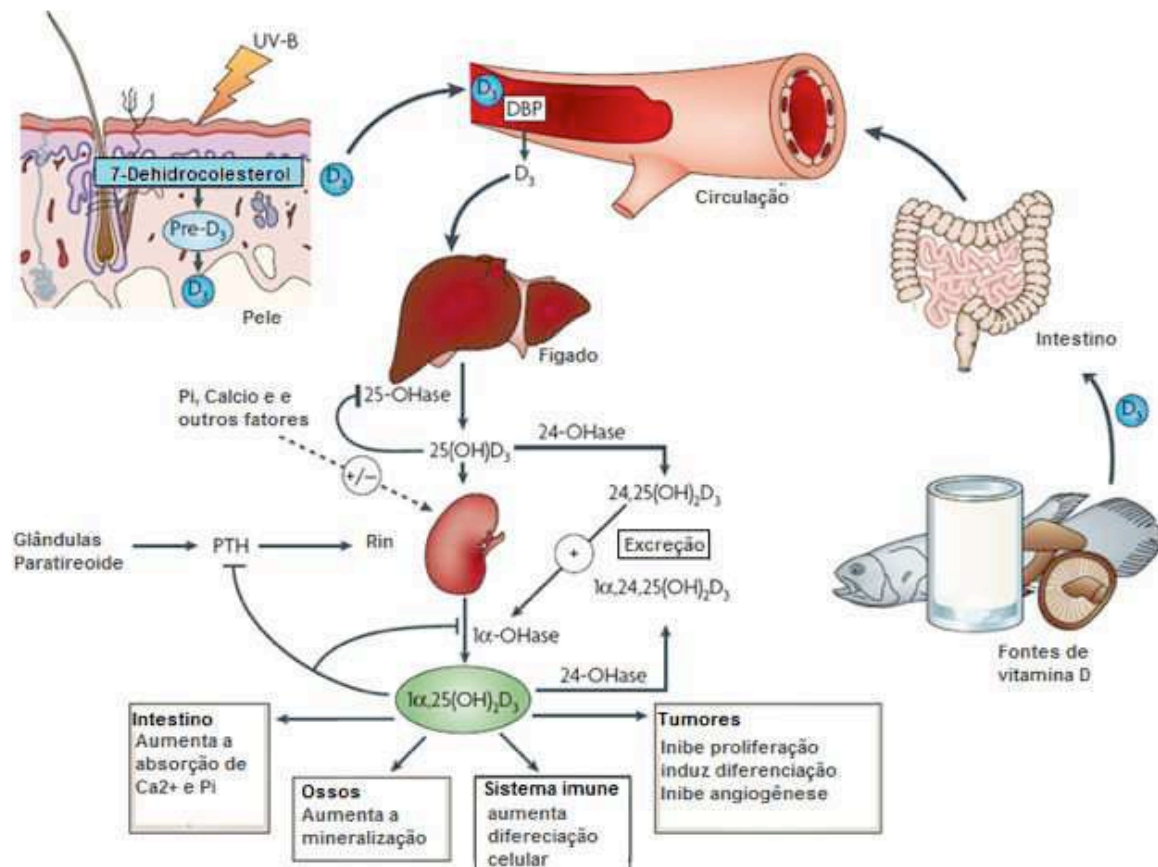
#### *1.3.1 Metabolismo da vitamina D*

A Vitamina D pode ser obtida a partir da dieta ou através de síntese endógena, desencadeada pela exposição à luz solar. A maior fonte de vitamina D em humanos e na maioria dos vertebrados é a exposição aos raios UVB solares, o que os torna dependentes da luz solar para a síntese dos níveis requeridos de Vitamina D no organismo (HOLICK; CHEN, 2008).

A síntese endógena da vitamina D inicia com a exposição da pele aos raios solares, o que induz a conversão fotolítica do 7-deidrocolesterol a pré-vitamina D<sub>3</sub>, seguida pela isomerização térmica à vitamina D<sub>3</sub>. A vitamina D<sub>3</sub> é então transportada para o fígado pela circulação através da proteína sérica ligadora de vitamina D (DBP). No fígado, a vitamina D<sub>3</sub>

é hidroxilada enzimaticamente a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> pela enzima 25-hidroxilase. A 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> é a forma da vitamina D presente em maior concentração no sangue, sendo alvo da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase no rim para a formação da 1 $\alpha$ ,25-diidroxivitamina D<sub>3</sub>, forma ativa da vitamina D<sub>3</sub> (figura 7) (MIZWICKI; NORMAN, 2009; NORMAN, 2008). A 1,25-D<sub>3</sub> pode ainda ser inativada através da ação da enzima 24-hidroxilase (DUSSO, 2005).

**Figura 7:** Metabolismo da vitamina D



Fonte: adaptado de DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007.

A hidroxilação na posição 25 pode ser realizada por duas enzimas diferentes. Uma delas está localizada na mitocôndria, sendo identificada como esteroide 27-hidroxilase, codificada pelo gene CYP27A1. Uma segunda enzima, de localização microsossomal, também realiza esta mesma função, sendo um produto do gene CYP2R1 (CHENG et al., 2003). Ambas as enzimas fazem parte da família do citocromo P450. A enzima mais importante para o metabolismo da vitamina D é a CYP2R1, como é demonstrado nos trabalhos de Cheng e Dong (CHENG et al., 2004; DONG; MILLER, 2004). A mutação desta enzima em humanos pode levar ao desenvolvimento de raquitismo dependente de vitamina D. Um modelo de

CYP2R1 knockout em camundongos elaborado por Zhu e colaboradores (ZHU et al., 2013) demonstra que esta enzima é a forma fisiologicamente mais relevante para o metabolismo da vitamina D, mas o organismo possui outras formas, ainda desconhecidas, para compensar a deleção deste gene.

A CYP27A1 foi a primeira forma da enzima 25-hidroxilase clonada. Apesar desta enzima ser capaz de hidroxilar a vitamina D na posição 25, sua mutação leva ao desenvolvimento de xantomatose cerebrotendinosa, uma patologia relacionada ao metabolismo de ácidos biliares (CALI et al., 1991; MILLER, 2013). A atividade da CYP27A1 parece estar mais relacionada com o metabolismo de ácidos biliares esteroides. Um possível papel para a CYP27A1 no metabolismo da vitamina D seria uma forma de 25-hidroxilase farmacologicamente relevante para análogos  $1\alpha$ -hidroxilados da vitamina D (como a  $1\alpha$ -hidroxivitamina D<sub>3</sub>), utilizados como pró-fármacos no tratamento da osteoporose e doenças metabólicas ósseas (JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014).

A enzima  $1\alpha$ -hidroxilase é codificada pelo gene CYP27B1. Esta enzima é um ponto chave na regulação da homeostasia do cálcio e do fósforo, sendo regulada pelo hormônio da paratireoide (PTH),  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  (OMDAHL et al., 1972; TANAKA; DELUCA, 1973). Ao contrário da 25-hidroxilase, a CYP27B1 parece ser a única forma responsável pela hidroxilação na posição  $1\alpha$  da 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014). A CYP27B1 é encontrada principalmente nos rins, porém já foi descrita em diversos outros tecidos e células como: osso, placenta, próstata, testículos, queratinócitos, macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e várias células cancerosas (p.e. do pulmão, próstata e pele) (BLOMBERG JENSEN et al., 2010; DUSSO, 2005; ZEHNDER et al., 2001).

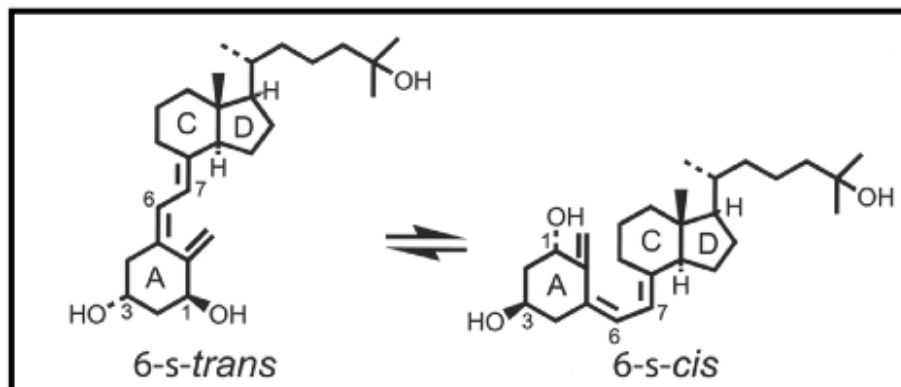
A enzima 24-hidroxilase, responsável pela inativação da 1,25-D<sub>3</sub>, é codificada pelo gene CYP24A1. Além da hidroxilação na posição 24, vários trabalhos já demonstram que a CYP24A1 é capaz de catalisar a hidroxilação em diversas posições de ambas 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> e 1,25-D<sub>3</sub>, formando o metabólito biliar ácido calcitróico e 1,25-diidroxi D<sub>3</sub>-26,23-lactona, dentre outros (SAKAKI et al., 2000).

### 1.3.2 Mecanismo de ação da 1,25-D<sub>3</sub>

A 1,25-D<sub>3</sub> é um hormônio seco esteroide e possui uma estrutura conformacional dinâmica e flexível, permitindo que as respostas fisiológicas geradas nos tecidos alvos sejam resultantes tanto da ativação de mecanismos de ação genômicos quanto não-genômicos. A 1,25-D<sub>3</sub> pode mudar sua conformação da forma *cis* para a forma *trans*, sendo a forma *cis*

mais relacionada a eventos de membrana e a forma *trans* associada a efeitos nucleares (figura 8) (NORMAN, 2006; NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004).

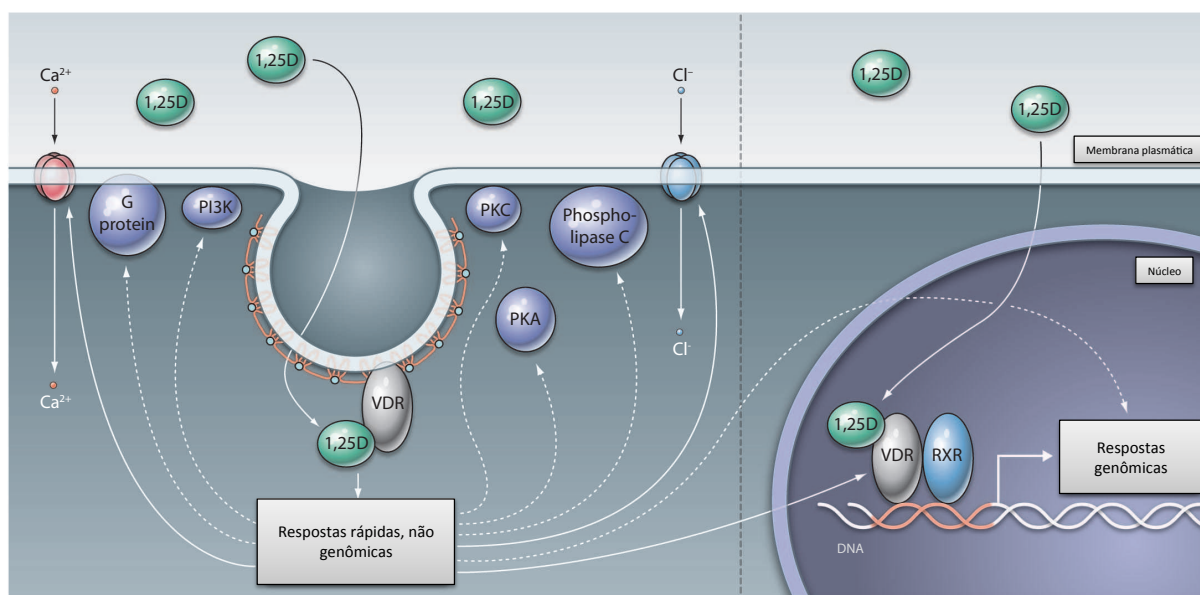
**Figura 8:** Mudanças conformacionais da estrutura da 1,25-D<sub>3</sub>.



Fonte: adaptado de NORMAN; ISHIZUKA; OKAMURA, 2001.

A maior parte dos efeitos biológicos conhecidos da 1,25-D<sub>3</sub> são mediados pelo receptor de vitamina D<sub>3</sub> (VDR) presente no núcleo, que na presença do hormônio sofre mudanças conformacionais que resultam na heterodimerização com o receptor retinóide (RXR), interagindo com o DNA de forma a modular a expressão gênica. Estas ações podem perdurar por horas ou dias e são conhecidas como respostas genômicas (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995). Por outro lado, a 1,25-D<sub>3</sub> também pode exercer funções através do mesmo receptor VDR localizado na membrana plasmática, o que resulta na ativação de segundos mensageiros citosólicos, proteínas cinases e fosfatases assim como a abertura de canais iônicos. Estes efeitos geralmente ocorrem em segundos ou minutos e são reconhecidos como respostas não-genômicas, não sendo dependentes de transcrição gênica (figura 9) (DE BOLAND; NEMERE, 1992; NORMAN et al., 2002). Dentre estes efeitos mediados pelo VDR na membrana plasmática estão a ativação de proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC), abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> ou Cl<sup>-</sup>, ativação da adenilato ciclase, aumento da concentração de [Ca]<sup>i</sup> e a ativação das vias Raf e MAPK (MIZWICKI; NORMAN, 2009; ZANATTA et al., 2011b).

**Figura 9:** Mecanismos de ação da 1,25-D<sub>3</sub>.



Fonte: adaptado de MIZWICKI; NORMAN, 2009.

### 1.3.3 VDR e PDIA3 como receptores da vitamina D

O receptor VDR é o receptor clássico pelo qual a vitamina D exerce suas funções nas células alvo. É através dele que são desencadeadas as respostas genômicas e também as respostas rápidas. O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares, da qual também fazem parte os receptores de ácido retinóico, hormônios da tireoide, estradiol e testosterona (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995; DUSSO, 2005). Vários estudos *in silico* foram realizados para verificar como a ligação da 1,25-D<sub>3</sub> seria responsável por ambas respostas rápidas e genômicas. Através de estudos de cristalografia, a equipe do Prof. Norman (MENEGAZ et al., 2011; MIZWICKI; NORMAN, 2009; NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004) demonstrou que além do sítio de ligação genômico, o VDR possui também um sítio alternativo de ligação. Correspondendo às ações genômicas e rápidas, o sítio genômico tem maior afinidade de ligação com a 1,25-D<sub>3</sub> na forma *trans*, enquanto que o sítio alternativo tem maior afinidade para o hormônio na forma *cis*. Esta teoria reforça a ideia de ambas respostas rápidas e genômicas partirem do mesmo receptor. Além disso, já foi demonstrado que a deleção do receptor nuclear também acarreta no desaparecimento das respostas rápidas (ZANELLO; NORMAN, 2004), e que o VDR pode se deslocar entre o núcleo e a membrana plasmática (CAPIATI; BENASSATI; BOLAND, 2002).

Um segundo receptor para a 1,25-D<sub>3</sub> localizado na membrana plasmática é o PDIA3 (protein disulfide isomerase family A, member 3), que também é capaz de desencadear

respostas rápidas frente a ligação com o hormônio. Esta proteína também é conhecida como ERp60, ERp57, Grp58 e 1,25-MARRS (CHEN et al., 2013). O PDIA3 foi primeiramente isolado da membrana basal lateral de células epiteliais do intestino de pintos, onde demonstrou alta afinidade pela 1,25-D<sub>3</sub> (NEMERE et al., 1994). Inicialmente esta proteína foi chamada de *1,25-D<sub>3</sub> membrane associated rapid response to steroids*, 1,25-MARRS, devido a participação no transporte de cálcio e fósforo através da membrana estimulado pela 1,25-D<sub>3</sub>, assim como a ativação da PKC em condrócitos e osteoblastos (NEMERE et al., 1998, 2004). Posteriormente foi demonstrado que as estruturas destas proteínas são idênticas (KHANAL; NEMERE, 2007). A PDIA3 é uma proteína da família das disulfuro isomerases, originalmente conhecida como um componente do complexo chaperona calnexina-calreticulina que promove o controle do dobramento e qualidade de glicoproteínas no retículo endoplasmático. Através de diversos estudos foi reconhecido que a PDIA3 é uma proteína multifuncional que participa em diversos processos metabólicos (ZHAO et al., 2013). Assim como o VDR, a PDIA3 também está presente no caveolae, interagindo com a proteína estrutural caveolina-1 (BUITRAGO; BOLAND, 2010; CHEN et al., 2010). Caveolae são invaginações esféricas ou em forma de balão (*flask-shaped*) da membrana plasmática ricas em esfingolípídeos e colesterol, conhecidos como microambientes de membrana, que se formam em regiões específicas da membrana plasmática (STAN, 2002).

#### 1.3.4 1,25-D<sub>3</sub> e a função reprodutora

Diversas evidências na literatura demonstram que a 1,25-D<sub>3</sub> é crítica para a manutenção da reprodução, porém o papel deste hormônio e do VDR no sistema reprodutor masculino ainda não é completamente entendido. Em ratos machos deficientes em vitamina D a redução da fertilidade foi relatada (KWIECINSKI; PETRIE; DELUCA, 1989), e em camundongos deficientes em vitamina D e do receptor VDR (VDRKO) foram observadas insuficiências gonadais com contagem de espermatozóides diminuída e anormalidades histológicas no testículo (KINUTA et al., 2000).

O VDR e as enzimas que participam do metabolismo da 1,25-D<sub>3</sub> são expressos amplamente no sistema reprodutor masculino. Diversos trabalhos já demonstraram que o VDR e estas enzimas são expressos concomitantemente em células de Sertoli, Leydig e germinativas, e também em células epiteliais do trato reprodutivo masculino (JENSEN, 2014). Em humanos, esta co-localização já foi demonstrada para as células de Leydig, espermatogônias, espermátides redondas e alongadas. Isto também foi demonstrado em

espermatozoides maduros, epidídimo, próstata e vesícula seminal (BLOMBERG JENSEN et al., 2010). Em ratos, o VDR foi encontrado em espermatogônias, espermátocitos, células de Sertoli e espermatozoides, e também no epidídimo, vesícula seminal e próstata (JOHNSON et al., 1996; MERKE et al., 1983).

A 1,25-D<sub>3</sub> é capaz de gerar efeitos genômicos e não-genômicos no testículo. Em camundongos com criptorquidia, este hormônio é capaz de estimular a expressão de até 19 dos 2483 genes específicos do testículo (HIRAI et al., 2009). Entre eles estão os genes ABCA1, vimentina, inibidor de CDK 2 e tirosina cinase não receptora 2 (TNK2). A 1,25-D<sub>3</sub> também estimula o acúmulo do amino ácido não metabólico, MeAIB (MENEGAZ et al., 2009), utilizado em estudos de efeitos associados à membrana. Além disso, o hormônio também estimula o influxo de cálcio em testículos (ZANATTA et al., 2011c) e células de Sertoli de ratos (ROSSO et al., 2012; ZANATTA et al., 2011d).

#### **1.4 Estradiol e o sistema reprodutor masculino**

O estradiol (E2) é um estrógeno esteroide que geralmente é considerado um hormônio feminino, porém a presença de estrógenos no sistema reprodutor masculino já foi descrita há mais de 50 anos (JAYLE et al., 1962). Além disso, a presença de receptores de estrógenos no trato genital masculino levou a uma reavaliação do papel destes hormônios no sistema reprodutor masculino.

Os estrógenos são encontrados em alta concentração na rede testicular, e na cauda epididimal de ratos estes níveis podem ser 25 vezes mais altos que os níveis plasmáticos (O'DONNELL et al., 2001). Estudos com camundongos *knockout* para os receptores de estrógenos demonstraram uma alteração no desenvolvimento normal e completo da onda espermatogênica, com poucas células germinativas presentes e/ou células germinativas com baixa atividade funcional (CARREAU; HESS, 2010; LUBAHN et al., 1993).

##### *1.4.1 Aromatase e a síntese do estradiol*

O estradiol é sintetizado através da esteroidogênese, uma sucessão de reações enzimáticas onde o colesterol é convertido primeiramente em andrógenos, como a testosterona e 4-androstenediona. Através da ação da enzima aromatase, estes andrógenos são convertidos irreversivelmente a estrógenos, como estrona e estradiol.



A aromatase é um complexo enzimático microsossomal composto por duas proteínas: uma glicoproteína específica, o citocromo P450 aromatase, que está associado a uma proteína redutase, a NADPH citocromo P450 redutase. Codificada pelo gene CYP19A1, esta enzima está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada no cérebro, ovários, tecido adiposo, placenta, osso, pele e testículos esta enzima está presente no sistema reprodutor masculino (BLAKEMORE; NAFTOLIN, 2016). Em ratos imaturos a aromatase é encontrada nas células de Sertoli, enquanto que no adulto a maior fonte de estrógenos são as células de Leydig e germinativas (CARREAU et al., 2011).

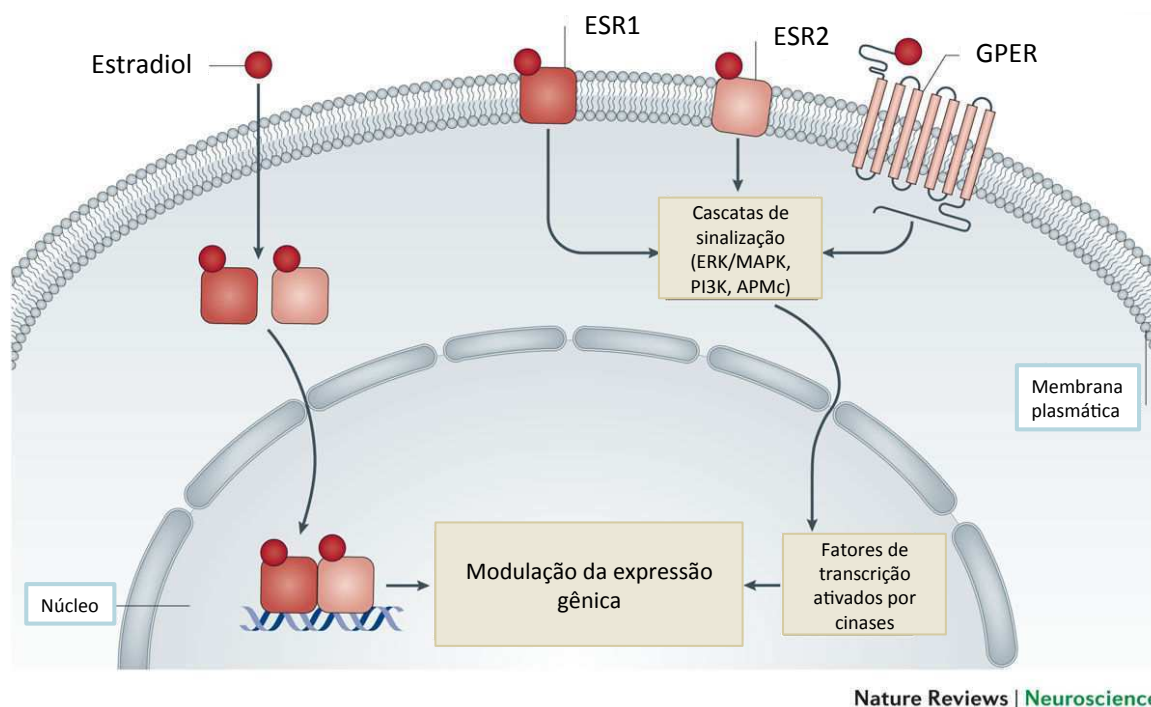
#### *1.4.2 Receptores do estradiol*

Assim como a 1,25-D<sub>3</sub>, o E2 também possui mecanismos de ação genômicos e não-genômicos. A ligação do hormônio com um receptor nuclear leva a regulação da transcrição gênica, e quando o E2 interage com um receptor na membrana plasmática ações rápidas são desencadeadas, como ativação de vias de sinalização e modulação de canais iônicos. Dois receptores clássicos são descritos para os hormônios estrógenos, os receptores de estrógenos 1 e 2 (ESR1 e ESR2, ou ainda ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) que podem ser encontrados no núcleo ou na membrana plasmática (O'DONNELL et al., 2001). Um terceiro receptor localizado na membrana das células foi descrito que também é capaz de interagir com os estrógenos, o receptor de estrógenos associado à proteína G (GPER) (figura 10) (PROSSNITZ; MAGGIOLINI, 2009).

Os ESRs pertencem a super família dos receptores nucleares, juntamente com os demais receptores esteroides (como os de andrógenos, progesterona e glicocorticoides), receptores dos hormônios tireoidianos, do ácido retinóico e da vitamina D (VDR). Estes receptores podem exercer efeitos genômicos direta ou indiretamente. No caso de uma ação direta, a ligação de um estrógeno ao receptor desencadeia modificações conformacionais, onde o receptor pode formar homodímeros (ESR1/ESR1 ou ESR2/ESR2) ou heterodímeros (ESR1/ESR2). Os dímeros são então translocados para o núcleo onde se fixam em elementos responsivos a estrógenos (ERE) encontrados nas regiões promotoras dos genes alvo. Em uma ação indireta, os receptores translocados para o núcleo recrutam fatores de transcrição, regulando a expressão de genes sem ERE. Os efeitos rápidos resultam da ligação dos hormônios aos receptores presentes na membrana plasmática, o que gera efeitos em diversas vias de sinalização. Assim, ESRs podem modular a concentração de mensageiros secundários, a atividade de vias de sinalização como a via da MAPK e da PI3k/Akt/PKB

(para revisão ver (HELDRING et al., 2007). No testículo, os receptores ESR1 e ESR2 são encontrados nas células de Leydig, Sertoli e células germinativas em humanos e roedores (CARREAU et al., 2011; CARREAU; HESS, 2010; O'DONNELL et al., 2001).

**Figura 10:** Mecanismos de ação do E2.



Fonte: adaptado de AREVALO; AZCOITIA; GARCIA-SEGURA, 2014.

O GPER é um receptor transmembrana acoplado à proteína G capaz de ativar algumas vias de sinalização celulares. Também conhecido como GPR30, este receptor é encontrado em células mamárias, cardíacas, leucócitos, no cérebro e no endotélio vascular. Através de estudos de ativação de vias de sinalização com agonistas e antagonistas dos ERs, e também com E2, foi possível identificar que algumas ações não-genômicas dos estrógenos ocorrem através da ligação com o GPER (FILARDO, 2002). Assim como os ERs, o GPER é encontrado em células de Leydig, células de Sertoli e germinativas (CHIMENTO, 2014).

### 1.4.3 Efeitos dos estrógenos na reprodução masculina

A influência dos estrógenos na reprodução masculina foi colocada em evidência com a descoberta de níveis elevados destes hormônios no sistema reprodutor. Aliado a este fato, a presença dos ERs nas células testiculares, e também da enzima aromatase tornaram evidente a importância dos estrógenos para a função sexual masculina.

O papel dos estrógenos é reforçado através de dados obtidos com modelos *knockouts* (KO) descritos na literatura. Em camundongos, a deleção do gene *ESR1* gera uma má formação dos túbulos seminíferos, espermatozóides com mobilidade reduzida e incapazes de fecundar ovócitos *in vitro* (EDDY et al., 1996). Efeitos da deleção do gene *ESR2* ainda são discutidos. Enquanto um trabalho mostra animais férteis sem alterações histológicas do testículo (KREGGE et al., 1998), um segundo estudo utilizando uma técnica diferente de invalidação descreve animais inférteis, com histologia e motilidade normais, de modo que a infertilidade pode ser resultado de um defeito na fecundação (ANTAL et al., 2008). A deleção dos dois receptores acarreta em animais estéreis com o fenótipo próximo ao encontrado em animais *ESR1KO* (DUPONT et al., 2000).

Em relação a enzima aromatase, animais KO para o gene *CYP19* possuem um fenótipo testicular normal até 4 meses de idade, onde alguns animais começam a demonstrar alterações na espermatogênese, túbulos seminíferos dismórficos e uma redução na mobilidade dos espermatozóides. Após 1 ano, há uma diminuição no peso testicular, associado à uma diminuição do número de células germinativas, o que conduz a infertilidade (ROBERTSON et al., 1999). A partir do mesmo modelo animal, uma suplementação com fitoestrógenos na dieta foi capaz de prevenir parcialmente os efeitos danosos da deficiência da aromatase, o que demonstra o envolvimento dos estrógenos na espermatogênese (ROBERTSON et al., 2002).

### **1.5 Perturbadores endócrinos com atividade estrogênica: o Bisfenol A**

Os perturbadores endócrinos são moléculas capazes de interagir com o sistema endócrino e alterar a regulação. Eles podem agir diretamente, pela ligação com receptores hormonais, ativando ou inibindo as vias de sinalização correspondentes. Estas moléculas também podem agir indiretamente, modificando a atividade de proteínas específicas da síntese, secreção ou degradação dos hormônios. Estes compostos são amplamente encontrados no meio ambiente, estando presentes na água e também em recipientes alimentares, pesticidas, inseticidas, produtos de higiene e brinquedos (BERGMAN; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

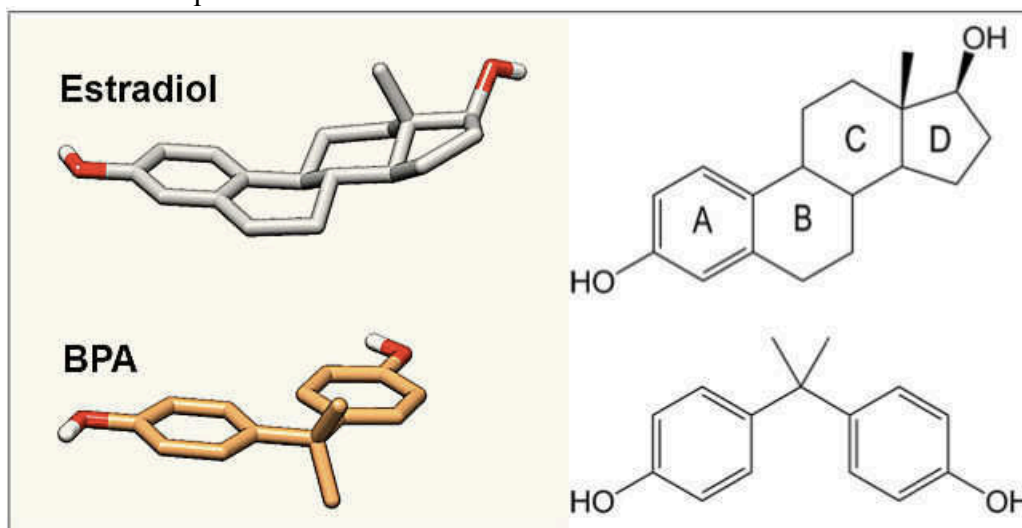
Os xenoestrógenos são perturbadores endócrinos que possuem atividade estrogênica, provindos da indústria ou de compostos naturais, como os fitoestrógenos. Com uma estrutura

próxima a do E2, estes compostos podem interagir com os ERs e induzir respostas celulares relacionadas à estes receptores. Como exemplos de xenoestrógenos, podem ser citados os pesticidas e inseticidas organoclorados, bifenilos policlorados (PCB), plastificantes e fitoestrógenos (TOPPARI et al., 1996).

O bisfenol A (BPA) é um composto químico utilizado na fabricação de plásticos policarbonados (HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013). No cotidiano, o BPA pode ser encontrado em garrafas plásticas, na tubulação de água, no revestimento de latas de conserva, brinquedos, notas fiscais e aparelhos dentários.

O BPA é considerado um xenoestrógeno em função da sua atividade estrogênica, devido à proximidade da sua estrutura química à do E2 (figura 11) (ALONSO-MAGDALENA et al., 2012). O BPA é capaz de se ligar aos ERs e ao GPER, e possui atividade estrogênica mesmo em doses muito baixas (BOUSKINE et al., 2009; FENICHEL; CHEVALIER; BRUCKER-DAVIS, 2013; GAIDO et al., 1997). O BPA também pode interagir com outros receptores, como os receptores de andrógenos (MOLINA-MOLINA et al., 2013) e pelo receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ) (RIU et al., 2011a, 2011b).

**Figura 11:** Estrutura química e conformacional do E2 e do BPA.



Fonte: adaptado de [http://ucsdnews.ucsd.edu/pressrelease/bpas\\_real\\_threat\\_may\\_be\\_after\\_it\\_has\\_metabolized](http://ucsdnews.ucsd.edu/pressrelease/bpas_real_threat_may_be_after_it_has_metabolized)

No homem, a primeira fonte de exposição ao BPA é a ingestão através dos alimentos e absorção pela pele, e a segunda fonte por inalação (VANDENBERG et al., 2007; ZALCO et al., 2011). O BPA é liberado nos alimentos a partir das resinas utilizadas nas latas e embalagens de alimentos de plástico policarbonado (BROTONS et al., 1995; WAGNER;

OEHLMANN, 2009). Uma análise de mais de 260 produtos alimentares nos Estados Unidos demonstrou a presença do BPA e análogos (BPS e BPF) em 75% dos produtos testados (LIAO; KANNAN, 2013). Além disso, a presença do BPA já foi verificada em fluidos biológicos humanos (COVACI et al., 2015; VANDENBERG et al., 2012).

### *1.5.1 BPA na reprodução masculina*

Diversos estudos realizados com modelos animais já demonstram possíveis efeitos danosos que o BPA possui na função reprodutora. Em camundongos, a exposição ao BPA durante a gestação e lactação diminui a taxa de espermatozoides normais, a integridade da membrana, mobilidade e capacidade de fusão com o ovócito (VILELA et al., 2014). A exposição durante o mesmo período também aumenta a expressão de GnRH e LH, afetando as enzimas da esteroidogênese de modo a diminuir a concentração plasmática de testosterona (XI et al., 2011).

Em ratos, a exposição ao BPA durante a gestação e lactação estimulou a divisão celular em células de Leydig e o aumento do número total de células na idade adulta. Apesar disso, a atividade destas células é diminuída, com a supressão do receptor de LH e a enzima  $17\beta$ -HSD, o que diminuiu a secreção de andrógenos pelas células de Leydig (NANJAPPA; SIMON; AKINGBEMI, 2012). Na idade pré-púbere, a exposição a uma forte dose de BPA (50 mg/kg) aumenta a apoptose e inibe a proliferação das células testiculares (URRIOLA-MUÑOZ; LAGOS-CABRÉ; MORENO, 2014). Em adultos, a exposição a doses considerada seguras leva a diminuição da concentração plasmática de FSH, LH e testosterona, associada ao aumento de E2 e diminuição da qualidade e quantidade de espermatozoides (WISNIEWSKI et al., 2015).

Em estudos *in vitro*, o tratamento de túbulos seminíferos de ratos com BPA ( $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M) inibe a progressão da meiose nas células germinativas (ALI et al., 2014). A exposição a doses similares de BPA ( $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  M) em espermatogônias, por sua vez, estimula a proliferação destas células aumentando a expressão do receptor GPER (SHENG et al., 2013; SHENG; ZHU, 2011). O BPA também foi capaz de diminuir a atividade das enzimas da esteroidogênese, associada a uma diminuição da produção da testosterona, em microsomas de testículos de ratos e humanos (YE et al., 2011).

A BHT também é um sítio de ação para o BPA. Uma exposição neonatal ao BPA em ratos altera o estabelecimento da BHT, modificando a localização de proteínas que fazem parte da barreira. Isto leva a diminuição do número e alteração da mobilidade dos

espermatozoides (SALIAN; DOSHI; VANAGE, 2009). Na idade pré-púbere, a exposição ao BPA diminui a permeabilidade e a expressão das proteínas da BHT (LI et al., 2009).

## 1.6 Evidências de interações entre as vias da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2

Estudos que demonstram uma ligação entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2 vem crescendo no mundo científico. Kinuta e colaboradores (KINUTA et al., 2000) demonstraram que em camundongos VDRKO há uma diminuição na expressão e na atividade da enzima aromatase. Além disso, os animais apresentaram diminuição do número e da motilidade dos espermatozoides, com anomalias histológicas no testículo. As concentrações plasmáticas de LH e FSH também estavam elevadas nestes animais. A suplementação com estrógenos foi capaz de reverter quase totalmente estes efeitos. Também foi realizada uma suplementação com cálcio para corrigir a hipocalcemia nos animais VDRKO, o que levou ao aumento da expressão e da atividade da aromatase, porém não teve efeitos nos outros parâmetros estudados.

Em um segundo modelo de animais VDRKO (BLOMBERG JENSEN et al., 2013) não houve alteração nos níveis de gonadotrofinas no soro, porém a expressão do receptor ESR1 foi alterada. Embora contrastantes, os dois modelos evidenciam um papel importante da 1,25-D<sub>3</sub> na sinalização estrogênica no testículo.

A relação entre a 1,25-D<sub>3</sub> e o E2 no sistema reprodutor masculino também foi avaliada através de um modelo de camundongos deficientes em 1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1KO) (SUN et al., 2015). Neste modelo, os animais CYP27B1KO são inférteis, com diminuição das concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e E2, com aumento nas concentrações dos hormônios FSH e LH.

Efeitos da 1,25-D<sub>3</sub> na aromatase também foram demonstrados em outros tecidos, como osteoblastos (TANAKA et al., 1996), células de glioma (YAGUE; GARCIA-SEGURA; AZCOITIA, 2009) e células tronco mesenquimais (PINO et al., 2006). Em células de Sertoli de ratos, a 1,25-D<sub>3</sub> também foi capaz de estimular a expressão da aromatase, possivelmente envolvendo um mecanismo de ativação inicial não genômico através da PKA (ZANATTA et al., 2011a). Em cultura de túbulos seminíferos, o tratamento com a 1,25-D<sub>3</sub> foi capaz de estimular a expressão da aromatase, além de diminuir a expressão dos receptores ESR1 e ESR2 (ZANATTA, 2015).

Levando em consideração os trabalhos citados acima, é evidente que há uma interação entre o metabolismo e as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2. Desse modo, o intuito deste

trabalho foi estudar alguns pontos regulatórios dos dois hormônios no sistema reprodutor masculino, assim como a influência do BPA nestes mecanismos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as interações (*cross talk*) no metabolismo e nas vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do estradiol, bem como a influência do BPA em células testiculares.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do E2 e do BPA na expressão de genes envolvidos no metabolismo da 1,25-D<sub>3</sub>, como VDR, PDIA3 e CYP27A1, em testículos de ratos de diferentes idades tratados *in vivo*;

- Estudar o efeito do E2 e do BPA na expressão da proteína VDR e CYP27A1 em testículos de ratos de diferentes idades tratados *in vivo*;

- Estudar o efeito e o mecanismo de ação do BPA no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em testículos de ratos pré-púberes tratados *in vitro*.

- Estudar o efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, do E2 e do BPA na expressão de genes envolvidos no metabolismo da 1,25-D<sub>3</sub>, como CYP27A1, CYP2R1, VDR e PDIA3 em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*;

- Estudar o efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, do E2 e do BPA na expressão de genes envolvidos no metabolismo do E2, como ESR1 e aromatase (CYP19), em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*;

- Estudar o efeito e o mecanismo de ação da 1,25-D<sub>3</sub>, do E2 e do BPA no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Desenho experimental

Visando estudar diferentes pontos de interação entre a 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA, optamos por desenvolver 3 linhas de trabalho. Primeiramente, foram utilizados tratamentos *in vivo* com ratos de diferentes idades para verificar o efeito da exposição ao E2 e BPA no metabolismo de ativação da vitamina D pela expressão da enzima 25-hidroxilase (CYP27A1) e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> através dos receptores VDR e PDIA3. Para isso foram utilizados ratos de 15 e 60 dias de idade, que correspondem ao início da primeira onda espermatogênica e ao alcance da maturidade sexual, respectivamente.

Como uma segunda abordagem foram utilizados testículos de ratos pré-púberes de 30 dias de idade para a verificação de possíveis efeitos rápidos / de membrana gerados pelo BPA através da técnica de influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. Nesta idade, os túbulos seminíferos estão no final da primeira onda espermatogênica, com a presença de espermátides redondas; os primeiros espermatozóides aparecem somente a partir do 36<sup>o</sup> dia pós natal. Além disso, nesta idade as células de Sertoli são capazes de sintetizar E2.

Em uma terceira linha de trabalho, tratamentos *in vitro* com 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA foram realizados em células de Leydig de ratos adultos, já que estas células são o principal sítio de produção de E2 no rato adulto. Foram estudados efeitos genômicos através da expressão dos genes CYP27A1, CYP2R1, VDR e PDIA3 (relacionados ao metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub>) e os genes ESR1 e aromatase (CYP19) (relacionados ao metabolismo e sinalização do E2). Efeitos não genômicos também foram estudados através da técnica de influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>.

#### 3.2 Animais

Ratos Wistar machos de 30 e 70 dias de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas, com ciclo claro/escuro (12/12 h), em sala climatizada com temperatura controlada (21 ± 1°C), ração padronizada e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Comitê de Ética do uso de Animais, protocolo PP00862/CEUA/UFSC.

Ratos Wistar machos de 70 dias e ratos Sprague-Dawley de 15 e 60 dias obtidos no Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France, foram mantidos em condições padrão, ciclo 12 h claro/12 h escuro, temperatura ambiente ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as Regulamentações do Governo Francês (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture).

### 3.3 Tratamentos *in vivo*

Os animais foram tratados com E2, BPA ou as duas moléculas juntas. Para cada experiência, quatro grupos de oito animais foram estabelecidos:

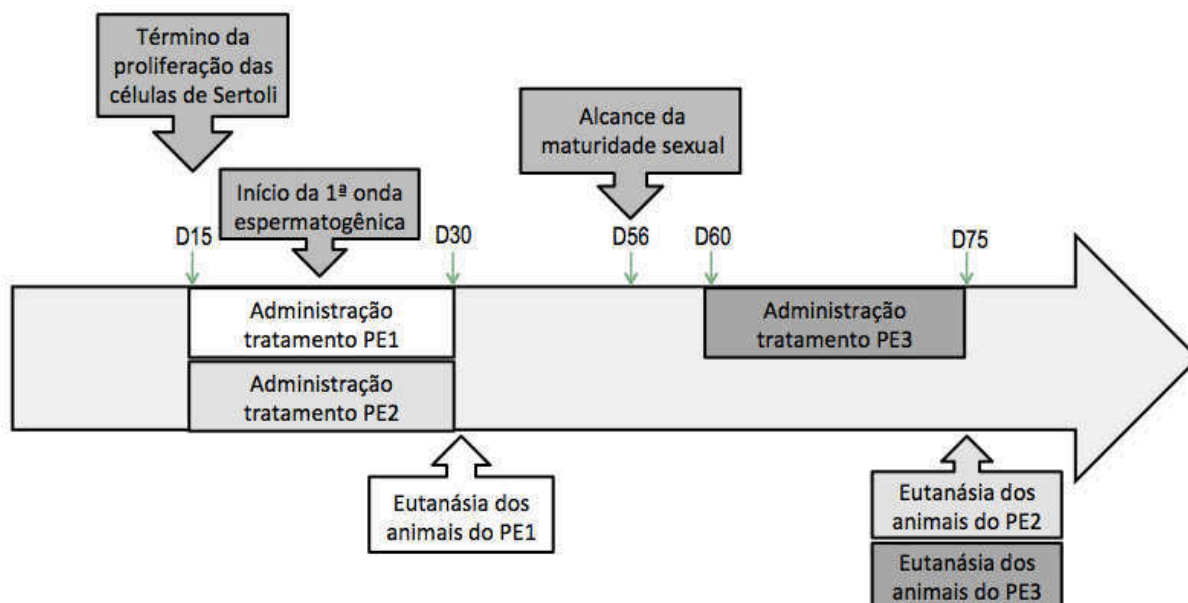
- grupo controle tratado com DMSO 0,7%;
- grupo E2 tratado com  $17\beta$ -estradiol 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia;
- grupo BPA tratado com BPA 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia;
- grupo E2 + BPA tratado com  $17\beta$ -estradiol 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia e BPA 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia.

Os animais foram pesados diariamente para o ajuste do volume da solução, e o tratamento foi realizado por via subcutânea. Os compostos foram diluídos em DMSO, sendo em seguida diluídos em uma solução salina NaCl 0,9% para a administração. Com o intuito de limitar a exposição dos animais a estrógenos ambientais, os animais foram alimentados com uma ração pobre em fitoestrógenos (SDS Dietex©) a partir do desmame (21º dia).

Três experiências foram conduzidas, com foco em duas faixas de idade: a idade pré-púbere e a idade adulta. O período pré-púbere escolhido, de 15 a 30 dias após o parto, engloba a iniciação da primeira onda da espermatogênese, a diferenciação das células de Sertoli e o estabelecimento da BHT. O período da idade adulta escolhido foi de 60 a 75 dias após o parto. No protocolo experimental 1 (PE1), os ratos pré-púberes foram tratados com E2 e BPA do dia 15 ao dia 30, sendo eutanasiados no dia seguinte à última dose. No protocolo experimental 2 (PE2), os animais foram tratados do dia 15 ao dia 30, e eutanasiados no dia 75. No protocolo experimental 3 (PE3), os ratos foram tratados do dia 60 ao dia 75 e eutanasiados após a última dose (Figura 12). Após a eutanásia, os testículos foram retirados e congelados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de RNA, seguida de RT e PCR tempo real, como

descrito nos itens 3.4 e 3.5. Uma parte do tecido também foi utilizada para extração de proteínas e realização de Western Blot.

**Figura 12:** Esquema demonstrativo dos tratamentos em cada experiência realizada.



Fonte: criado pela própria autora.

### 3.4 Cultura de células de Leydig

As células de Leydig foram isoladas como descrito anteriormente (MURUGESAN et al., 2008; SCHUMACHER et al., 1978). Testículos de ratos de 70 dias foram decapsulados e incubados em meio Ham's F12/DMEM (1:1) contendo 0,25 mg/mL da enzima Colagenase por 15 min, a 34°C sob agitação. Foram feitas então duas sedimentações gravitacionais, onde foi retirado o sobrenadante contendo as células de Leydig. O sobrenadante foi então filtrado em malha de nylon e centrifugado a 2500 g por 10 min. O precipitado foi recuperado e as células foram depositadas sobre um gradiente de Percoll para purificar as células de Leydig. As células recuperadas do gradiente foram lavadas e centrifugadas para a retirada completa do Percoll. As células foram então contadas e cultivadas em placas de 6 poços (2.000.000 células / poço) em meio Ham's F12 / DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com antibióticos (Penicilina / Streptomina 50 U / mL) e soro bovino fetal a 10% a 34°C numa atmosfera 5% CO<sub>2</sub> / 95% O<sub>2</sub> por 24 h. Após este período, os tratamentos com 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA foram realizados. Nos estudos de expressão gênica, foram realizadas curvas de dose e de tempo para estudar o efeito dos compostos estudados nas células de Leydig. Nas curvas de

dose, as células foram tratadas com 1,25-D<sub>3</sub>, E2, BPA e 1,25-D<sub>3</sub> + E2, nas doses 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-7</sup> M (para todos os compostos) por 6 h. Nas curvas de tempo, as células foram tratadas com 1,25-D<sub>3</sub>, E2, BPA e 1,25-D<sub>3</sub> + E2, na dose de 10<sup>-7</sup> M, por 3, 6, 10 e 24 h. Após as incubações, o meio de cultura foi retirado e as células congeladas a -80°C. A partir das células congeladas, foi realizada a extração de RNA seguida pelas reações de RT-PCR tempo real como descritas a seguir (itens 3.4 e 3.5). Nos estudos de resposta rápida através do influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, as células foram tratadas conforme descrito no item 3.8.

### 3.5 Extração e Quantificação do RNA total

Os ácidos ribonucleicos (RNAs) foram isolados com o kit TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) e a quantidade de RNA extraída das amostras foi calculada a partir da densidade óptica a 260 nm (DO<sub>260</sub> nm), segundo a fórmula:  $[ARN\ total] = DO_{260\ nm} \times \text{fator de diluição} \times 40$  (1 DO = 40 µg/mL). A verificação da qualidade dos RNAs extraídos foi realizada pelo cálculo da razão das densidades ópticas a 260 e 280 nm (260/280).

### 3.6 Amplificação dos transcritos dos genes

#### 3.6.1 Transcrição Reversa (RT)

250 ng (testículos) ou 500 ng (células de Leydig) de RNA total foram utilizados para esta etapa. A síntese do DNA complementar (DNAc) foi efetuada em um volume final de 20 µL com adição de 100 ng de *random primers*, 200 nM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeo), 12 U de RNAsin e 200 U de M-MLV RT (*Moloney Murin Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) em um tampão de reação (Promega). A mistura foi incubada por 1 h e 30 min a 37 °C e por mais 5 min a 70 °C.

#### 3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR tempo real)

A PCR em tempo real foi realizada em um volume final de 20 µL contendo: 5 µL de DNAc diluído 10 vezes, 10 µL de tampão de reação SYBR green mix (Bio-Rad) e 0,3 µM de cada *primer* (Tabela 1). A reação de amplificação consistiu de uma etapa inicial a 95 °C por 3 min, 45 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 2 min (anelamento e extensão) e por fim 80 ciclos de 55 °C por 10 s com um aumento de 0,5 °C por ciclo, a partir do segundo

ciclo, a fim de estabelecer uma curva de ponto de fusão. Os níveis de expressão dos genes pesquisados (VDR, PDIA3, CYP2R1, CYP27A1, CYP19, ESR1) foram normalizados com o do gene controle L19 através do cálculo:  $2^{(Ct\ L19 - Ct\ gene\ pesquisado)}$ . A caracterização dos produtos da PCR foi obtida através do sequenciamento (GENOME express, Meylan, France) e alinhamento com sequências descritas na literatura.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados no PCR em tempo real

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto de amplificação (pb)
<i>L19</i> <sup>A</sup> (NM_031103.1)	<b>F:</b> GGAATCTAAGAAGATTGACCGTC <b>R:</b> GCCTTGTCTGCCTTCAGTTT	120 pb
<i>VDR</i> <sup>B</sup> (NM_017058)	<b>F:</b> TGACCCACCTACGCTGACT <b>R:</b> CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT	79 pb
<i>PDIA3</i> <sup>A</sup> (NM_017319.1)	<b>F:</b> TAAAGATGCCTCGGTGGTGG <b>R:</b> ACGTTGGTGTGTGCAAATCG	114 PB
<i>Cyp2r1</i> <sup>A</sup> (NM_001108499.1)	<b>F:</b> CCCACGTCTACATGAGGAAGC <b>R:</b> CACCCACTCCCATTTTTGTCAT	92 pb
<i>Cyp27a1</i> <sup>A</sup> (NM_178847.3)	<b>F:</b> AACAGGTCAAGACCGACCGC <b>R:</b> CCGTACTTGGCCTTGTTTCAGC	141 pb
<i>Cyp27b1</i> <sup>A</sup> (NM_053763.1)	<b>F:</b> TACCCCTGCTAAAGGCTGTGA <b>R:</b> TGGCATAGTGACAGAGGGAAAC	144 pb
<i>Cyp19</i> <sup>A</sup> (M33986.1)	<b>F:</b> CGTCATGTTGCTTCTCATCG <b>R:</b> TACCGCAGGCTCTCGTTAAT	150pb
<i>ESR1</i> <sup>C</sup> (X61098)	<b>F:</b> AATTCTGACAATCGACGCCAG <b>R:</b> GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	345 pb

<sup>A</sup> Sequências Genbank.

<sup>B</sup> O desenho foi baseado em ZANATTA et al., 2011a.

<sup>C</sup> O desenho foi baseado em CHIMENTO et al., 2010.

### 3.7 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada a partir de amostras de testículo congeladas a -80°C. Foi adicionado às amostras tampão RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM,

Triton 1%, SDS 1%) contendo inibidores de proteases (1/100) (Sigma), seguido de uma incubação de 10 min em gelo, onde a amostra foi agitada regularmente. As amostras foram então centrifugadas por 10 min à 4500g a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas foi recuperado e a determinação da concentração de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford.

### 3.8 Western Blot

Foram utilizados 30 µg de proteínas totais em cada poço para a eletroforese. As proteínas totais diluídas em tampão RIPA com inibidores de proteases foram desnaturadas por 5 min à 100°C em presença de um tampão de carga (Tris-HCl 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 1%, EDTA 12,5 mM, azul de bromofenol 0,02%). As amostras foram então adicionadas em gel de poliacrilamida 10%, onde as proteínas foram separadas em função do peso molecular por eletroforese. A migração das proteínas foi realizada em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) durante 1:30 – 2h à 120 V.

Após a migração, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) pela ação de um campo elétrico de 100 V por 1 h em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 191 mM, etanol 20%, SDS 0,1%, pH 8,3). A transferência das proteínas para a membrana foi confirmada através da coloração com vermelho de Ponceau (vermelho de ponceau 0,1%, ácido acético 5%). A membrana foi então lavada com TBS (Tris 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4), seguida pelo bloqueio de sítios não específicos com TBS-T/leite 5% (TBS Tween-20 0,01%, leite 5%) por 1 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário VDR (1:5000) (C-20, Santa Cruz Biotechnology), CYP27A1 (1:1000) (K16 - Santa Cruz Biotechnology) ou PDIA3/ERp57 (1:1000) (sc-23886 - Santa Cruz Biotechnology) por 12 h à 4°C. Em seguida a membrana foi lavada com TBS-T e incubada com anticorpo secundário (1:5000) correspondente por 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi então lavada com TBS-T e a revelação das proteínas foi realizada pela adição de ECL (Promega) sobre a membrana por 1 min, seguida pela exposição a um filme auto-radiográfico. A quantificação das proteínas foi realizada através do programa ImageJ comparando a intensidade do sinal da proteína de interesse com a intensidade do sinal da proteína de referência (actina B – anticorpo C4, Millipore).

### 3.9 Tratamentos *in vitro* – Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Testículos de ratos de 30 dias de idade ou células de Leydig foram pré-incubados em tampão Krebs Ringer bicarbonato (KRb) (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) durante 15 min. Em seguida o meio de incubação foi substituído por um KRb fresco contendo 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , onde o tecido e/ou células (1.000.000 células por amostra) foram incubado por mais 1 h em atmosfera carbogênica ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5 v/v), pH 7,4; a 34 °C, para alcançar o equilíbrio intra e extracelular de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (ZAMONER et al., 2007b). Então, as amostras foram incubadas por diferentes períodos e concentrações de 1,25- $\text{D}_3$ , E2 e BPA. Os inibidores, quando utilizados, foram adicionados 15 min antes dos tratamentos. Para finalizar a incubação foi adicionada uma solução de cloreto de lantânio (127,5 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM HEPES, 11 mM glicose, 10 mM  $\text{LaCl}_3$ ), pH 7,3 a 2 °C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA; SJÖGREN, 1983). Após 30 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra, sendo homogeneizadas neste tampão. Uma alíquota do homogenato foi utilizada para a contagem da radioatividade por cintilação líquida. Uma segunda alíquota da amostra foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em pmoles de cálcio por  $\mu\text{g}$  de proteína ou em % do controle.

### 3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) por  $\mu\text{g}$  de proteína ou em % do controle de determinações realizadas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, quando necessário. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um *p* igual ou menor que 0,05.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão deste trabalho, os resultados apresentados nesta tese estão divididos em três partes:

- Parte I - Efeitos genômicos do tratamento *in vivo* de E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> em testículo de ratos de diferentes idades.
- Parte II - Estudo dos efeitos não genômicos *in vitro* do BPA em testículos de ratos pré-púberes.
- Parte III - Efeitos da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e E2 em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*.



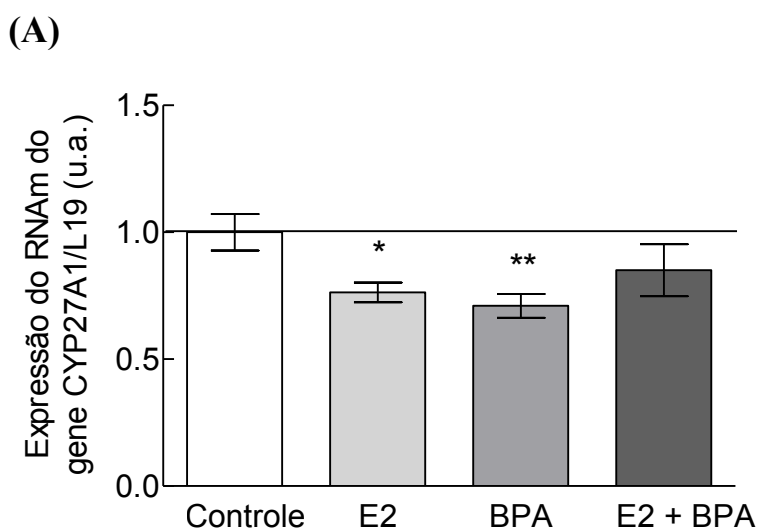
#### 4.1 Parte I: Efeitos genômicos do tratamento *in vivo* de E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> em testículo de ratos de diferentes idades

##### 4.1.1 Resultados

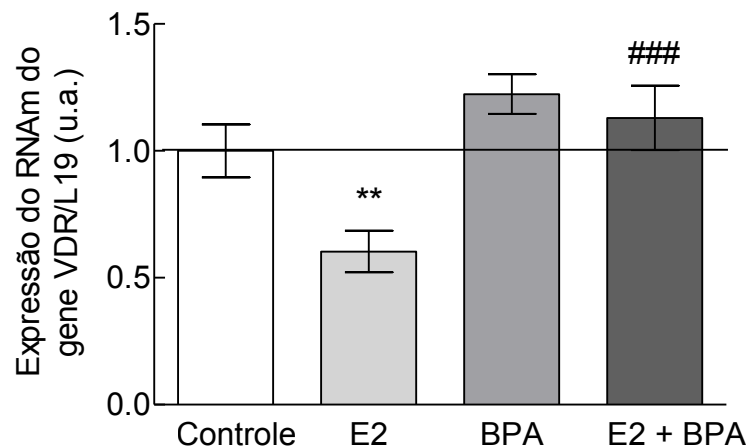
*Efeito do tratamento com E2 e BPA in vivo na expressão dos genes e das proteínas VDR, PDIA3, CYP27A1 em testículos de ratos pré-púberes (PE1)*

Para estudar a influência do E2 e do BPA na sinalização da 1,25-D<sub>3</sub>, a expressão dos genes dos receptores da 1,25-D<sub>3</sub>, VDR e PDIA3, e da enzima 25-hidroxilase, CYP27A1, foram analisados em ratos tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA (PE1). Como demonstrado na figura 13, no grupo E2 houve uma diminuição na expressão dos genes VDR e CYP27A1. No grupo BPA, somente a expressão do gene CYP27A1 foi alterada. Já no grupo E2 + BPA, não houve alteração na expressão de nenhum dos genes estudados. Quando o E2 foi utilizado combinado com o BPA o efeito do E2 sobre a expressão do gene VDR foi abolido (figura 13). Também foi verificada a expressão dos genes CYP2R1 e CYP27B1, porém os níveis de expressão destes genes nas amostras deste estudo foram muito baixos, não possibilitando a quantificação.

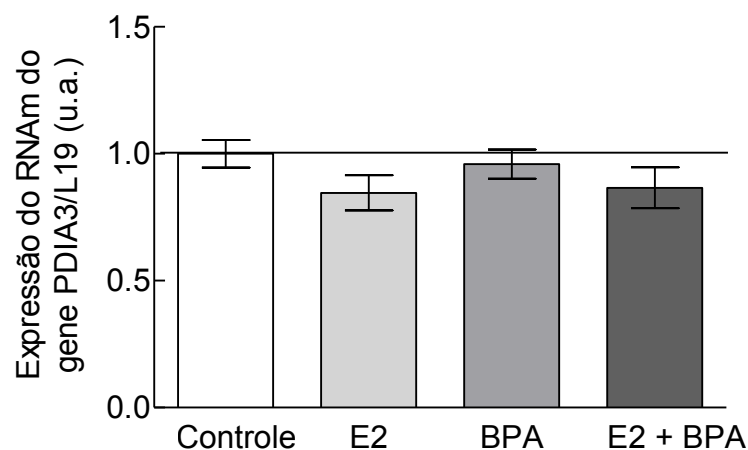
**Figura 13:** Efeito do tratamento *in vivo* com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos pré-púberes.



(B)



(C)

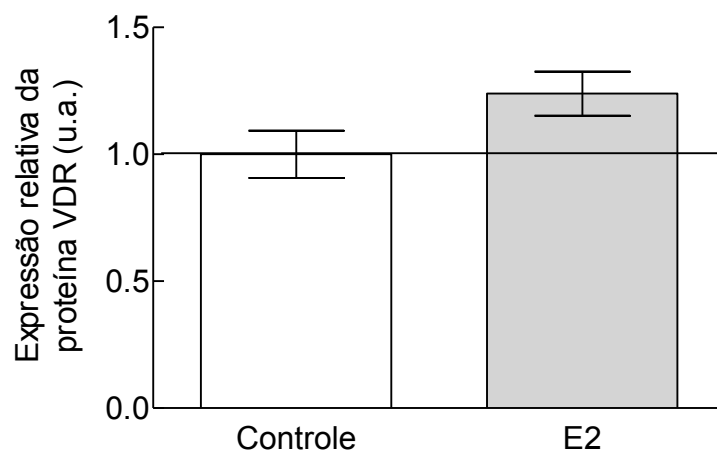


Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm dos genes CYP27A1 (A), VDR (B) e PDIA3 (C) em testículos de ratos de 30 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 15 ao dia 30. A quantidade relativa dos genes de interesse foi normalizada pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle; ###  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo E2.

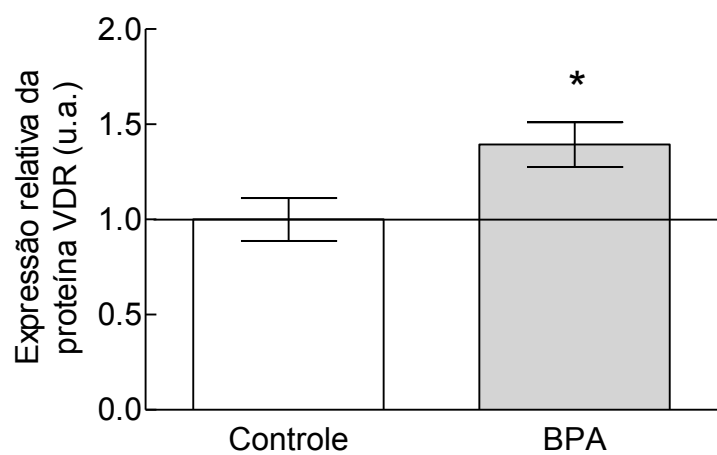
Quando os níveis de expressão proteica foram analisados através da técnica de Western Blot, o tratamento com E2 não modificou a expressão do gene VDR. No grupo BPA houve um aumento da expressão da VDR, embora este grupo não demonstre alterações na expressão do gene (figura 14).

**Figura 14:** Efeito do tratamento *in vivo* com E2 e BPA na expressão da proteína VDR em testículos de ratos pré-púberes.

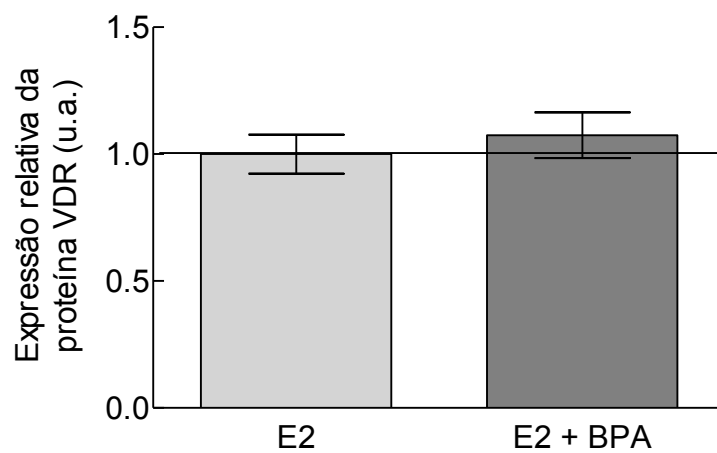
(A)



(B)



(C)

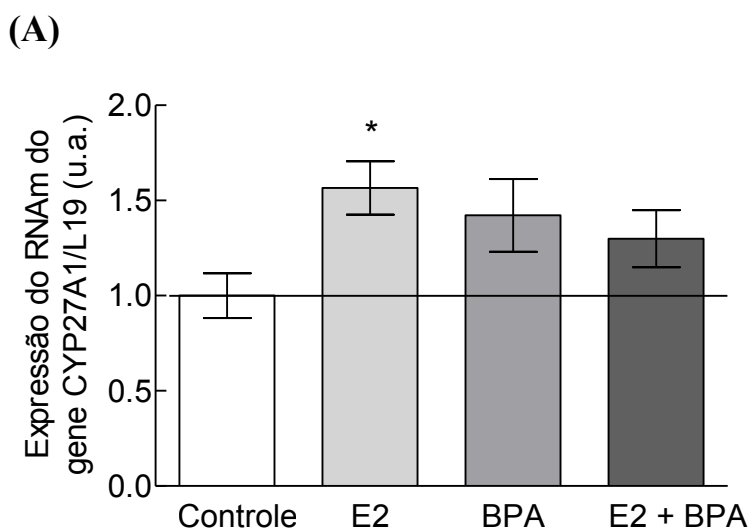


Análise e quantificação da expressão proteica através da técnica de Western blot das proteínas VDR em testículos de 30 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 15 ao dia 30. A quantidade relativa de VDR foi normalizada pelos níveis da proteína actina, e os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

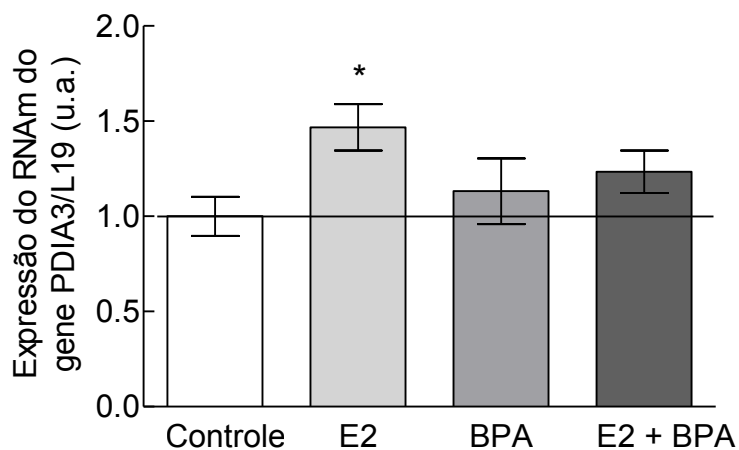
*Efeito do tratamento pré-púbere com E2 e BPA in vivo na expressão dos genes e das proteínas VDR, PDIA3 e CYP27A1 em testículos de ratos adultos (PE2)*

Para verificar se os efeitos do tratamento com E2 e BPA na idade pré-púbere são reversíveis, os animais foram tratados no mesmo período e mantidos sob condições normais até a idade adulta, onde foram eutanasiados e a expressão gênica e proteica nos testículos foi analisada (PE2). Ao contrário da experiência 1, o grupo E2 aumentou a expressão de todos os genes estudados, enquanto os outros grupos não apresentaram nenhum efeito detectável na expressão gênica (Figura 15).

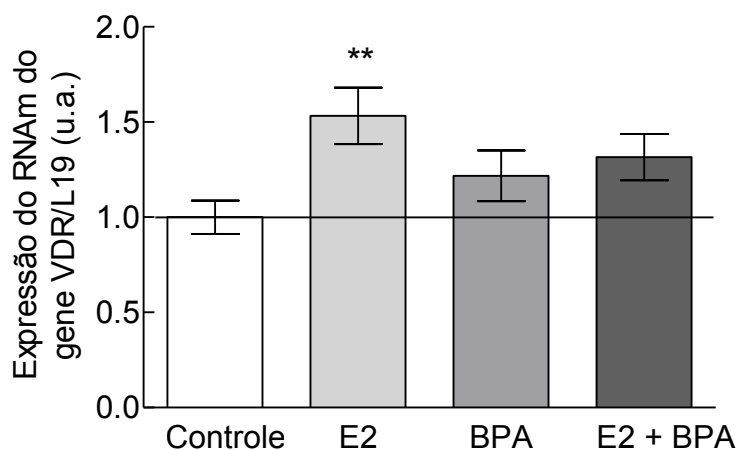
**Figura 15:** Efeito do tratamento *in vivo* na idade pré-púbere com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos adultos tratados na idade pré-púbere.



(B)



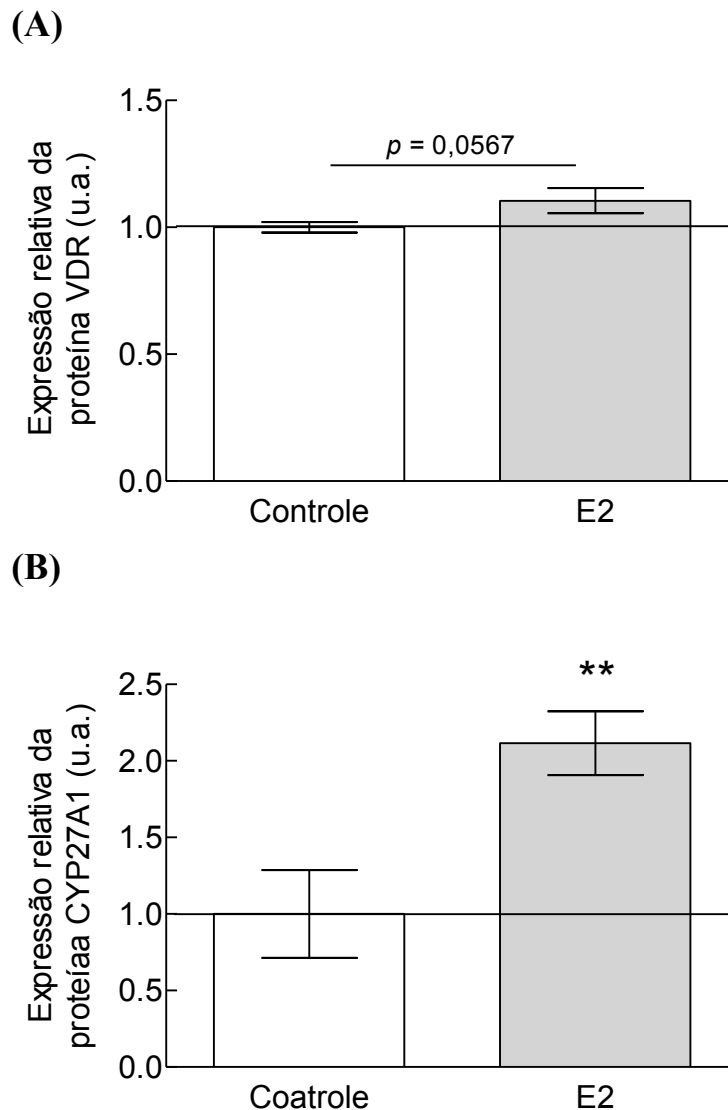
(C)



Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm dos genes CYP27A1 (A), VDR (B) e PDIA3 (C) em testículos de ratos de 75 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 15 ao dia 30. A quantidade relativa dos genes de interesse foi normalizada pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

A expressão das proteínas VDR e do CYP27A1 foi analisada para o grupo E2 (Figura 11). Embora o tratamento com E2 tenha aumentado a expressão do gene VDR, somente uma tendência a um aumento da expressão da proteína foi verificado. O tratamento com E2 aumentou significativamente a expressão da proteína CYP27A1.

**Figura 16:** Efeito do tratamento *in vivo* na idade pré-púbere com E2 e BPA na expressão da proteína VDR em testículos de ratos adultos tratados na idade pré-púbere.



Análise e quantificação da expressão proteica através da técnica de Western blot das proteínas VDR (A) e CYP27A1 (B) em testículos de 75 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 15 ao dia 30. A quantidade relativa de VDR e CYP27A1 foi normalizada pelos níveis da proteína actina, e os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

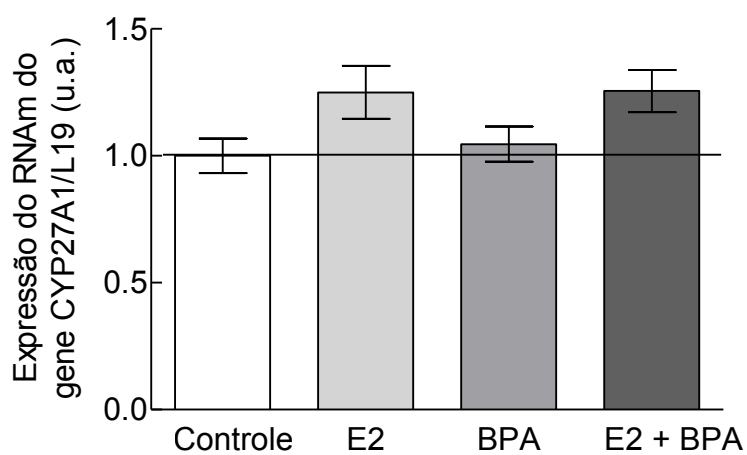
*Efeito do tratamento com E2 e BPA in vivo na expressão dos genes VDR, PDIA3 e CYP27A1 e proteína PDIA3 em testículos de ratos adultos (PE3)*

Os tratamentos com E2 e BPA *in vivo* também foi realizado na idade adulta (PE3), com o intuito de verificar se a exposição a estes compostos na idade adulta também é capaz

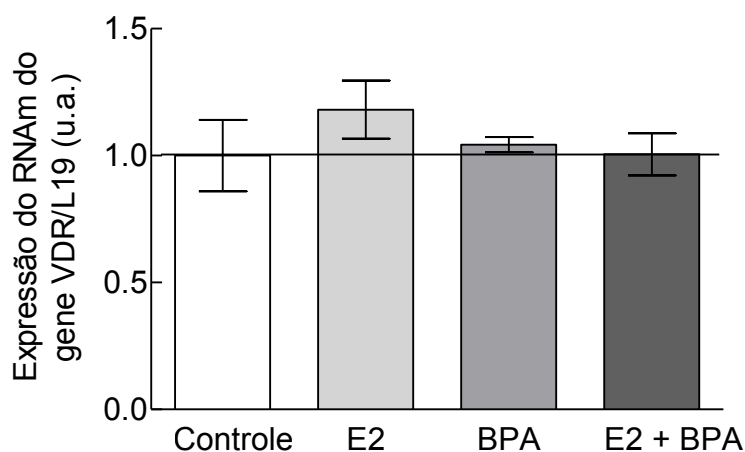
de alterar a sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> (figura 17). Diferente das experiências anteriores, o tratamento com o E2 e BPA não teve efeito na expressão dos genes estudados. O único efeito observado foi um aumento na expressão do gene PDIA3 pelo grupo E2 + BPA, que não foi observado quando analisada a expressão da proteína PDIA3.

**Figura 17:** Efeito do tratamento *in vivo* com E2 e BPA na expressão do RNAm dos genes CYP27A1, VDR e PDIA3 em testículos de ratos adultos.

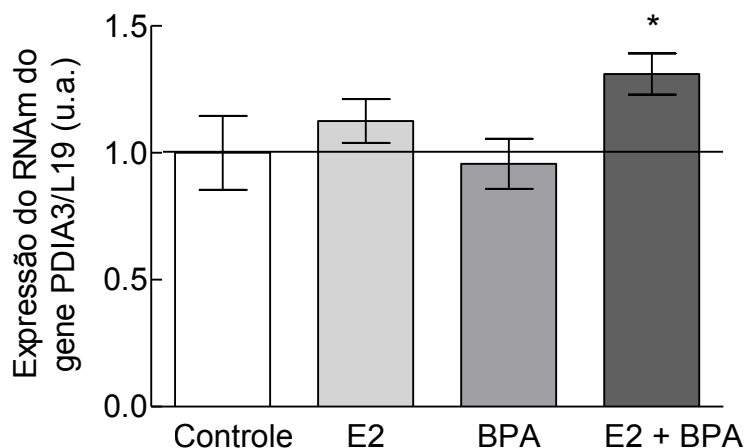
(A)



(B)

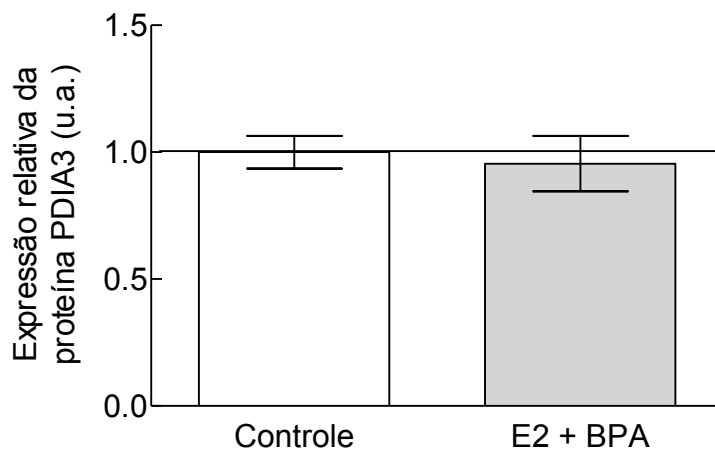


(C)



Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm dos genes CYP27A1 (A), VDR (B) e PDIA3 (C) em testículos de ratos de 75 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 60 ao dia 75. A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

**Figura 18:** Efeito do tratamento *in vivo* com E2 e BPA na expressão da proteína PDIA3 em testículos de ratos adultos.



Análise e quantificação da expressão proteica através da técnica de Western blot da proteína PDIA3 em testículos de 75 dias tratados *in vivo* com E2 e/ou BPA do dia 60 ao dia 75. A quantidade relativa de PDIA3 foi normalizada pelos níveis da proteína actina, e os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle. Os dados estão representados como a média  $\pm$  E.P.M. de oito animais.



#### 4.1.2 Discussão

Evidências da interação entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2 são descritas na literatura (JENSEN, 2014; ZANATTA et al., 2017), porém como interagem estes dois hormônios ainda não está claro. Assim como a 1,25-D<sub>3</sub> é capaz de modular a expressão da enzima aromatase em células de Sertoli (ZANATTA et al., 2011a), camundongos VDRKO apresentam diminuição da expressão e atividade desta enzima (KINUTA et al., 2000). Além disso, estes animais apresentam diminuição da contagem e mobilidade dos espermatozóides e níveis plasmáticos elevados de LH, FSH e estradiol. Nestes animais, a suplementação com estrógenos foi capaz de reverter todas as alterações causadas pela deficiência do VDR: a motilidade e contagem dos espermatozóides foi elevada e os níveis plasmáticos dos hormônios se tornaram semelhantes aos animais controle. Modelos de animais VDRKO também apresentam características em comum com modelos ESR1KO com relação à fertilidade (EDDY et al., 1996; HESS et al., 1997).

Neste trabalho são demonstrados efeitos da exposição ao E2 e BPA *in vivo* em alguns pontos da sinalização da 1,25-D<sub>3</sub>, como os receptores da 1,25-D<sub>3</sub> e a enzima 25-hidroxilase (CYP27A1) utilizando o mesmo modelo animal descrito por (BROUARD et al., 2016). Para o tratamento, foram escolhidas doses baixas do E2 (20 µg/kg por peso corporal/dia) e de BPA (50 µg/kg por peso corporal/dia). A dose de E2 foi escolhida a partir do trabalho de (D'SOUZA et al., 2005), que demonstra que esta dose do hormônio possui um efeito deletério na espermatogênese no adulto. A dose utilizada do BPA foi escolhida por representar uma dose 100 vezes inferior ao nível de efeito adverso não observável (NOAEL) de 5 mg/kg/dia fixada na Europa em 2007 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2007), embora a dose de Ingestão Diária Aceitável (TDI) tenha sido alterada para 4 µg/kg/dia em 2015 (EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF), 2015). Além do grupo controle, um quarto grupo também foi utilizado onde os animais receberam os dois compostos em conjunto, para verificar possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas entre o E2 e BPA. Análises imediatamente após a exposição na idade pré-púbere e adulta foram realizadas, e os tratamentos demonstraram resultados diferentes dependendo da idade da exposição.

No PE1, a diminuição da expressão gênica do VDR pelo E2 não foi visualizada na expressão proteica. A expressão do gene VDR foi diminuída no grupo E2, enquanto que os níveis de expressão da proteína VDR no mesmo grupo foram semelhantes ao controle. A diferença entre a expressão gênica e proteica pode estar relacionada a modificações pós-

transcricionais nas células testiculares. Na maioria das células somáticas, a transcrição e tradução do mRNA são intimamente interligadas, fazendo da detecção do mRNA um forte indicador da expressão proteica. Entretanto, as células testiculares dependem fortemente de mecanismos de regulação pós-transcricionais (IGUCHI; TOBIAS; HECHT, 2006). Além disso, um atraso pode ser observado entre a transcrição e a tradução (CALVEL et al., 2010). Quando a análise foi realizada nos 30 dias de idade, os túbulos seminíferos apresentam uma condição homogênea com as células germinativas engajadas na meiose, sendo o estado mais diferenciado caracterizado pelas primeiras espermátides alongadas. O efeito contrário observado entre o RNAm e a proteína VDR poderia ser explicado por este atraso entre a transcrição e a tradução. Nos 30 dias de idade, o estudo dos níveis de RNAm poderiam revelar o mecanismo relacionado à expressão gênica ocorrendo imediatamente neste momento, enquanto que o estudo dos níveis proteicos poderiam revelar a situação ocorrida alguns dias atrás. Outra explicação seria a existência de mecanismos regulatórios pós-transcricionais.

O tratamento com E2 e BPA também diminuiu a expressão do gene CYP27A1. A diminuição da expressão gênica pode indicar uma inibição do E2 e do BPA em mecanismos de síntese da 1,25-D<sub>3</sub>, assim como a 1,25-D<sub>3</sub> demonstra efeitos na expressão da aromatase e dos ERs. Por outro lado, a enzima codificada pelo gene CYP27A1 também participa no metabolismo do colesterol e de intermediários de ácidos biliares (PIKULEVA, 2006). Esta enzima é capaz de converter colesterol em 27-hidroxicolesterol, e a deficiência desta enzima leva ao desenvolvimento de xantomatose cerebrotendinosa, um distúrbio caracterizado pela deposição anormal de colesterol em diversos tecidos (CALI et al., 1991). O 27-hidroxicolesterol é considerado um modulador seletivo de ERs (SERM – *selective estrogen receptor modulator*), agindo sobre os dois ERs, ESR1 e ESR2, como agonista (DUSELL et al., 2008) ou antagonista (UMETANI et al., 2007), demonstrando uma ação tecido-específica. A ação do E2 e do BPA nesta enzima também pode indicar um mecanismo de retroalimentação negativa, devido aos efeitos do 27-hidroxicolesterol nos ERs, porém não foram encontrados dados na literatura sobre a ação deste derivado do colesterol no testículo.

No PE2, o tratamento com E2 e BPA foi realizado na idade pré-púbere e os efeitos deste tratamento foram analisados na idade adulta. O tratamento com E2 na idade pré-púbere aumentou a expressão de todos os genes estudados. Este efeito é inverso ao observado no PE1, onde a expressão gênica foi avaliada ainda na idade pré-púbere. É possível que o efeito observado seja um mecanismo de compensação pelo efeito inibitório do tratamento com E2, já que neste caso houve um intervalo de 45 dias entre o fim do tratamento e a eutanásia dos

animais. Já no PE3 o único tratamento que apresentou algum efeito foi quando os dois compostos (E2 e BPA) foram administrados concomitantemente, aumentando a expressão do gene PDIA3. Porém, este efeito não foi visualizado quando a expressão da proteína PDIA3 foi analisada.

Comparando os resultados das três experiências, podemos concluir que o tratamento com E2 e BPA causou mais alterações quando administrado na idade pré-púbere, enquanto que os animais tratados na idade adulta não apresentaram nenhuma alteração na expressão dos genes estudados. O período pré-púbere, entre 15 e 30 dias no rato, é extremamente importante para o desenvolvimento sexual, já que engloba o estabelecimento da BHT, a diferenciação das células de Sertoli e a iniciação da primeira onda espermatogênica. As células de Sertoli são responsáveis por fornecer suporte energético e nutricional para as células germinativas em desenvolvimento. Durante a espermatogênese, as células de Sertoli oferecem suporte físico e metabólico, sem o qual os processos de diferenciação, meiose e espermiogênese não ocorreriam (RATO et al., 2012; SHARPE et al., 2003). A BHT é formada por junções intercelulares entre as células de Sertoli, formando um ambiente específico e necessário para o crescimento e a diferenciação das células germinativas (PETERSEN; SODER, 2006). Esta barreira controla a passagem de moléculas do compartimento basal para o compartimento adluminal, protegendo as células germinativas. Assim, esta idade aparenta ser mais susceptível a possíveis efeitos adversos resultantes da exposição a compostos exógenos.

Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com E2 alterou a expressão gênica do receptor da 1,25-D<sub>3</sub>, o VDR, e a enzima 25-hidroxilase, CYP27A1. Desta forma, podemos concluir que de fato possa haver uma inter-relação entre a ação destes dois hormônios. Estes resultados reforçam a teoria de que existe uma interação entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2.

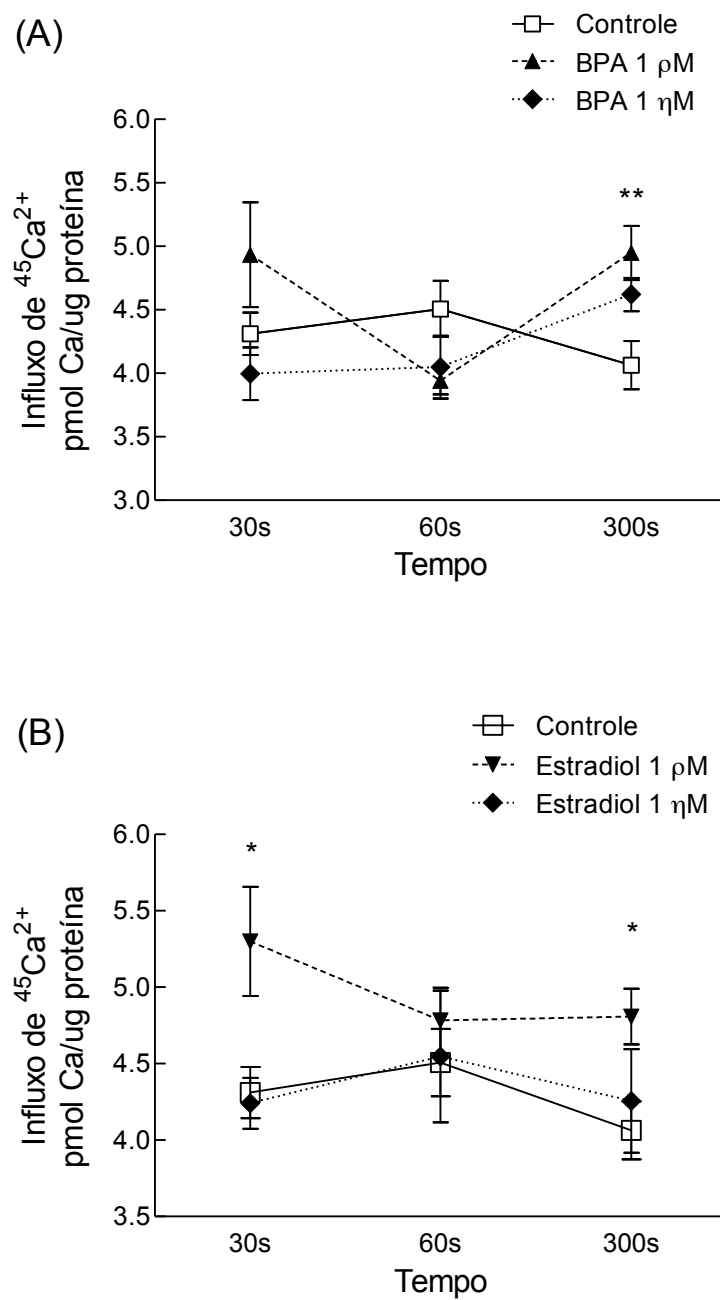
## 4.2 Parte II: Estudo dos efeitos não genômicos in vitro do BPA em testículos de ratos pré-púberes

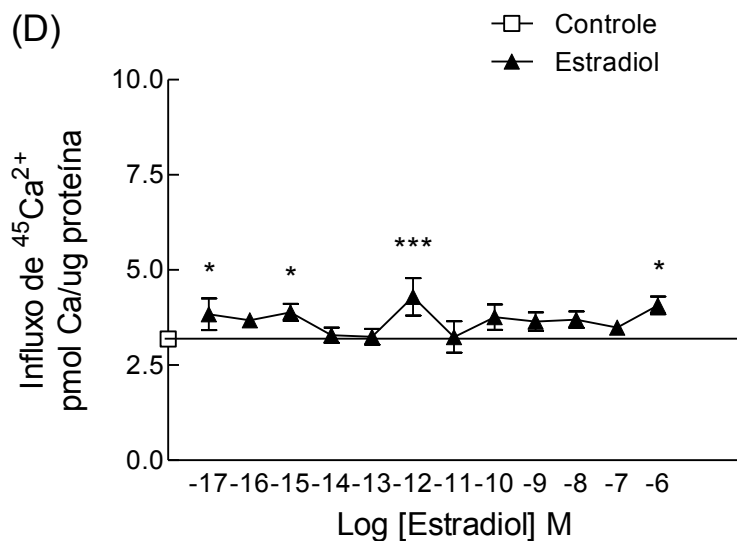
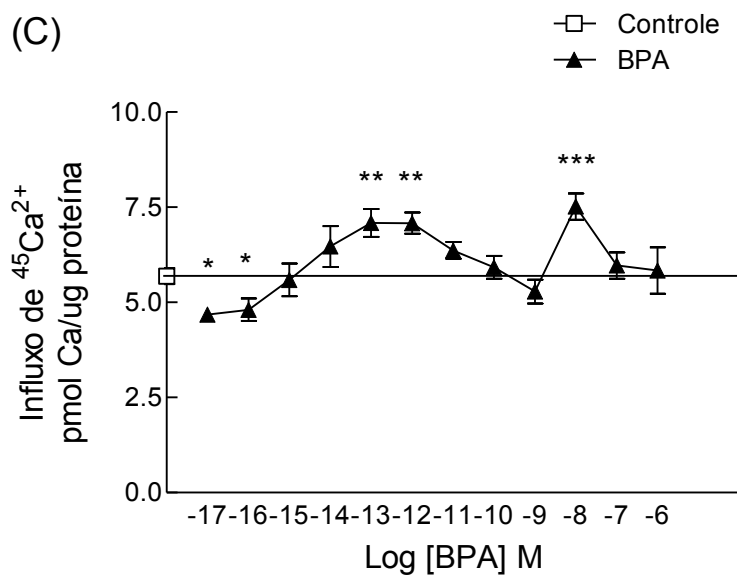
### 4.2.1 Resultados

*BPA é capaz de aumentar o influxo de cálcio em baixas concentrações, de maneira similar aos efeitos do E2*

Para estudar os efeitos do BPA em respostas rápidas de membrana em testículos de ratos de 30 dias, o BPA foi utilizado em baixas concentrações (1 pM e 1 nM) e diferentes tempos de incubação (30, 60 e 300 s). Como demonstrado na figura 19A, o BPA na concentração de 1 pM aumentou o influxo de cálcio em 300s. Para analisar estes efeitos mais a fundo, foi realizada uma curva dose-resposta com concentrações de BPA partindo de 1  $\mu$ M até 0,01 fM. O BPA foi capaz de aumentar o influxo de cálcio nas concentrações de 1 e 0,1 pM e 10 nM. Curvas de tempo e de dose também foram realizadas com o E2 para comparar os efeitos de rápida resposta do hormônio e do xenoestrógeno (figura 19B, D), e ambos exibiram respostas similares. O BPA, nas concentrações de 0,1 e 0,01 fM inibiu o influxo de cálcio, o que indica que o BPA possui um efeito trifásico dependente da dose. Assim, a concentração de 1 pM e o tempo de incubação de 300 s foram escolhidos para os estudos subsequentes devido à similaridade dos efeitos com aqueles do E2.

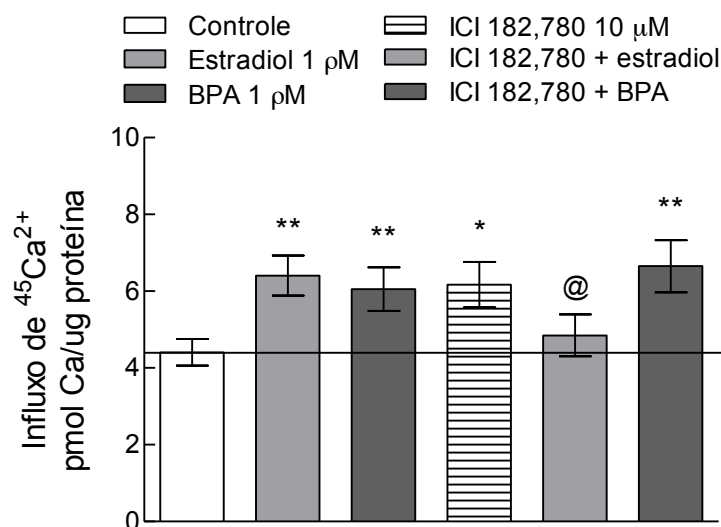
Como o BPA pode se ligar aos ERs da mesma maneira que o E2, o envolvimento destes receptores foi analisado no efeito estimulatório do BPA no influxo de cálcio. Como demonstrado na figura 20, o antagonista dos ERs clássicos ICI 162,780 não alterou os efeitos do BPA, indicando que os efeitos do xenoestrógeno não são mediados pelos ERs clássicos, ao menos na concentração e tempo de incubação utilizados nesta abordagem experimental.

**Figura 19:** Efeitos do BPA e do E2 no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.



Análise dos efeitos do BPA e do E2 no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias tratados *in vitro*. Curvas de tempo e dose do BPA (A, C) e E2 (B, D) foram realizadas. Tempo de incubação: 5 min (C, D). Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparado ao grupo controle.

**Figura 20:** Envolvimento dos receptores ERs no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  estimulado pelo BPA e E2 em testículos de ratos de 30 dias.

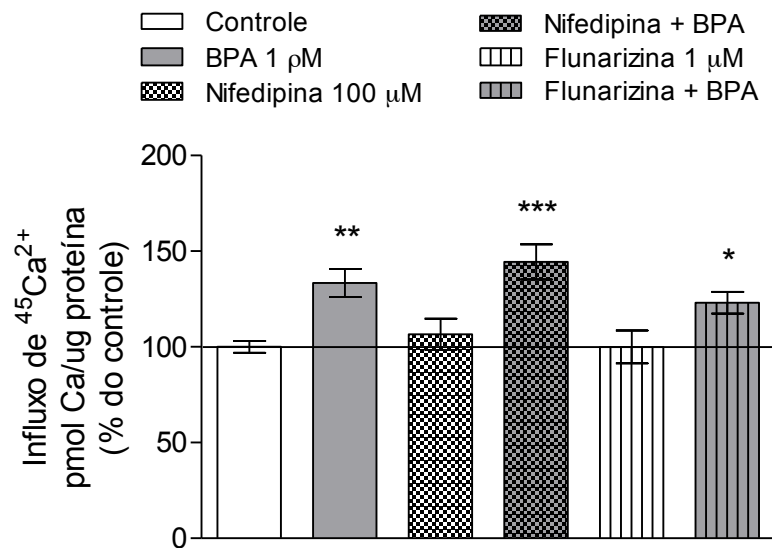


Análise do envolvimento dos receptores ESR1 e ESR2 no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  estimulado pelo BPA e pelo E2 em testículos de ratos de 30 dias. O antagonista dos receptores de estrógenos clássicos, ICI 182,780 foi adicionado 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle; @  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo E2.

*BPA aumenta o influxo de cálcio pela abertura dos canais receptores de potencial transiente vanilóides (canais TRPV1)*

Para analisar o mecanismo pelo qual o BPA modula o influxo de cálcio nos testículos de ratos imaturos, alguns alvos na membrana plasmática foram estudados. Dentre eles foram estudados os canais VDCC utilizando os antagonistas nifedipina e flunarizina. Ambos os antagonistas não alteraram o efeito do BPA, indicando que os canais VDCC não estão envolvidos no efeito estimulatório promovido pelo BPA no influxo de cálcio (figura 21). Também foi estudado o envolvimento dos canais de  $\text{K}^+$  dependentes de ATP. O BPA demonstrou efeito similar ao da glibenclamida, um antagonista clássico deste tipo de canal (figura 22). Este resultado indica que ambos os compostos provavelmente possuem mecanismos de ação semelhantes.

**Figura 21:** Envolvimento dos canais VDCC nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.

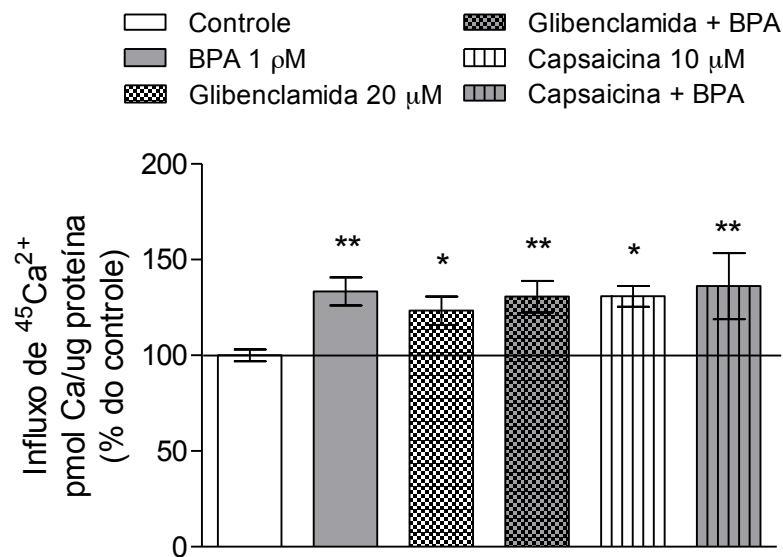


Análise do envolvimento dos canais VDCC nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. Os antagonistas dos canais VDCC do tipo L (Nifedipina) e do tipo T (Flunarizina) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

O envolvimento dos canais TRP também foi analisado (figura 22). Neste estudo foi utilizado a capsaicina, um agonista dos receptores TRPV1. Como esperado, a capsaicina foi capaz de estimular o influxo de cálcio por si só. Quando o BPA foi utilizado juntamente com a capsaicina, não houve alteração no efeito da co-incubação em relação ao efeito dos compostos separados, indicando que o BPA e a capsaicina possuem mecanismos de ação semelhantes no influxo de cálcio em testículo de ratos.



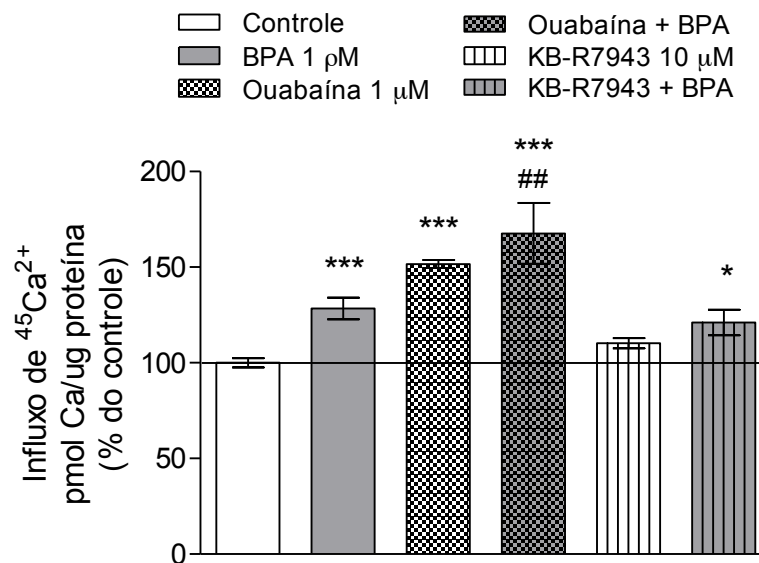
**Figura 22:** Envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP e dos canais TRPV1 nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.



Análise do envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP e dos canais TRPV1 nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. O antagonista dos canais de potássio dependentes de ATP (Glibenclamida) e o agonista dos canais TRPV1 (Capsaicina) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle.

Outros possíveis alvos para a ação do BPA na membrana plasmática também foram estudados. Para verificar o envolvimento da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  no efeito estimulatório do BPA, o inibidor ouabaína foi utilizado. A ouabaína por si só foi capaz de estimular o influxo de cálcio (figura 23), já que a inibição da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ativa o trocador de  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ . Curiosamente, a co-incubação do BPA e da ouabaína causou uma amplificação no efeito quando comparado aos compostos isolados, indicando que o BPA e a ouabaína possuem mecanismos de ação diferentes. Quando foi utilizado o KB-R7943, um inibidor do trocador de  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ , o efeito do BPA não foi alterado. Estes resultados indicam que o BPA não modula a atividade da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  nem do trocador de  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  para estimular o influxo de cálcio observado na concentração e no tempo de incubação utilizados.

**Figura 23:** Envolvimento da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e do trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.



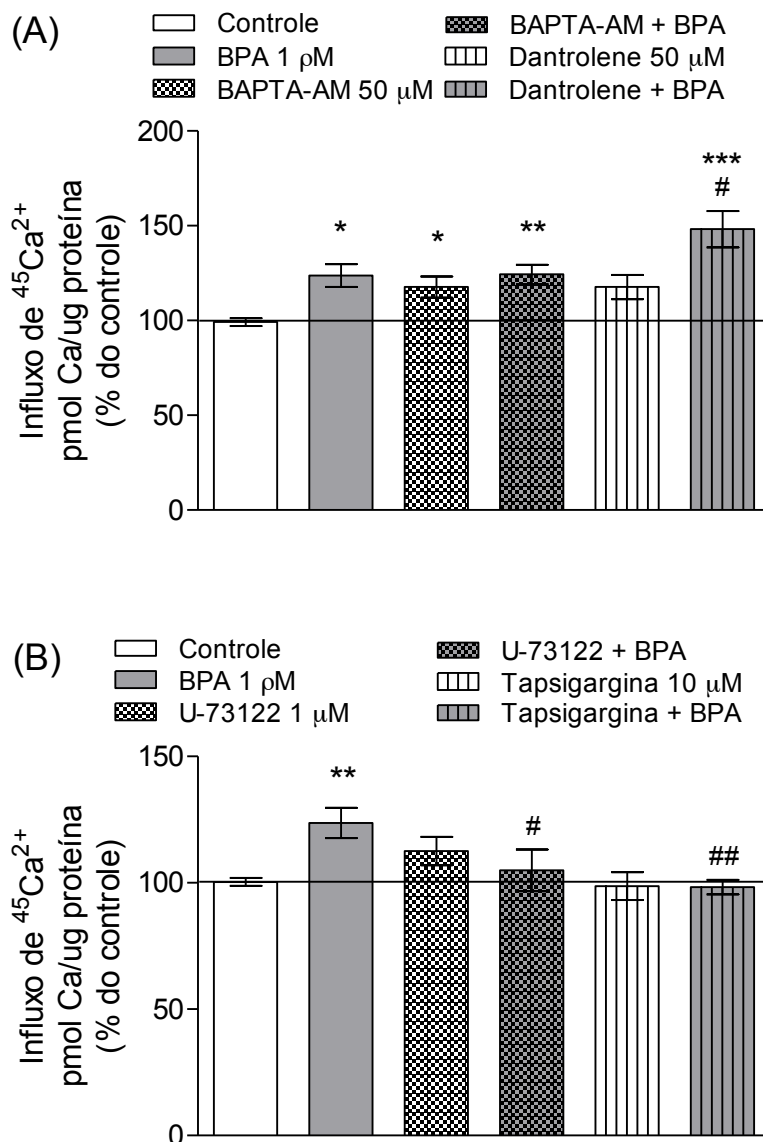
Análise do envolvimento da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e do trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. Os inibidores da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Ouabaína) e do trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (KB-R7943) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo BPA.

*BPA ativa canais dependentes dos estoques (SOCs) através da ativação da fosfolipase C (PLC) e inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*

Já foi demonstrado que o BPA pode agir como um inibidor fraco da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) no retículo sarco/endoplasmático (WOESTE et al., 2013). Desta forma, o envolvimento do cálcio intracelular ( $[\text{Ca}]_i$ ) foi analisado. Inicialmente foi utilizado um quelante de  $[\text{Ca}]_i$ , o BAPTA-AM. Como pode ser observado na figura 24A, o BAPTA-AM por si só estimulou o influxo de cálcio. Quando o BAPTA-AM e o BPA foram utilizados em conjunto, não houve alteração no efeito de ambos os compostos, indicando que estes possam estar agindo através do mesmo mecanismo. Para estudar este efeito mais a fundo, isto é, o controle do  $[\text{Ca}]_i$  através dos estoques de cálcio no retículo endoplasmático, foi analisado o envolvimento dos receptores do tipo rianodina, receptores de  $\text{IP}_3$  e a atividade da SERCA no efeito estimulatório do BPA no influxo de cálcio. Interessantemente, quando o antagonista dos receptores rianodina dantrolene foi utilizado, houve um aumento no efeito do BPA no

influxo de cálcio. A inibição da PLC pelo inibidor U-73122 aboliu o efeito estimulatório do BPA (figura 24B). Como esperado, quando a SERCA foi inibida pelo inibidor tapsigargina o BPA não foi capaz de estimular o influxo de cálcio.

**Figura 24:** Envolvimento do [Ca]i nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.

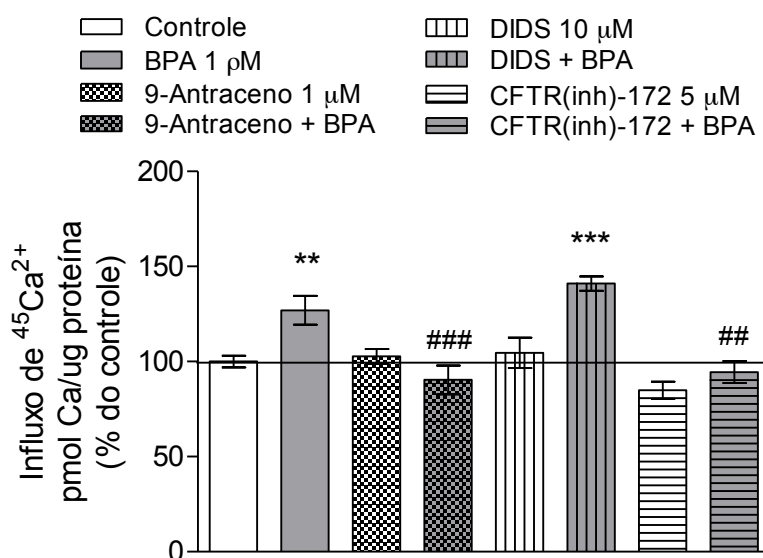


Análise do envolvimento do [Ca]i nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. O quelante de [Ca]i (BAPTA-AM) e o antagonista dos receptores de rianodina (Dantrolene) (figura A) e os inibidores da PLC (U-73122) e da SERCA (Tapsigargina) (figura B) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo BPA.

*O estímulo da sinalização do cálcio pelo BPA envolve canais de cloreto na membrana plasmática*

O envolvimento dos canais de cloreto nos efeitos do BPA também foi analisado. Para isto, foram utilizados antagonistas de canais de cloreto como o 9-Antraceno (antagonista de canais de cloreto dependentes de cálcio), DIDS (antagonista de canais de cloreto dependentes de voltagem) e CFTR(inh)-172 (inibidor dos canais CFTR). Como demonstrado na figura 25, a utilização do 9-Antraceno e do CFTR(inh)-172 inibiu o efeito do BPA no influxo de cálcio, indicando que os canais de cloreto dependentes de cálcio e do tipo CFTR estão envolvidos neste efeito. Quando os canais de cloreto dependentes de voltagem foram bloqueados com DIDS não houve alteração no efeito estimulatório do BPA no influxo de cálcio.

**Figura 25:** Envolvimento dos canais de cloreto nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.

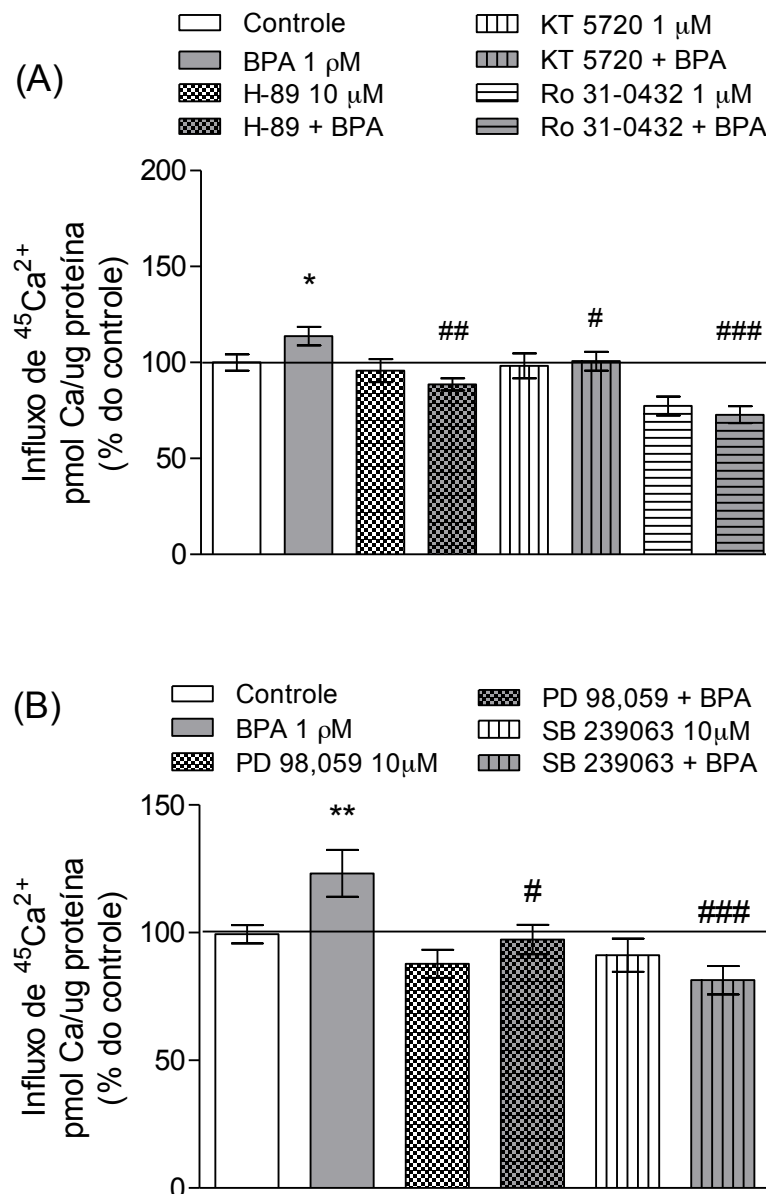


Análise do envolvimento dos canais de cloreto nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. Os antagonistas dos canais de cloreto dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (9-Antraceno), canais de cloreto dependentes de voltagem (DIDS) e dos canais CFTR (CFTR(inh)-172) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo BPA.

*Proteínas cinases como a PKA, PKC, MAP kinase kinase (MEK) e p38 MAPK estão envolvidas no efeito do BPA*

Alvos intracelulares que possam estar mediando o efeito do BPA no influxo de cálcio em testículos de ratos de 30 dias também foram estudados (figura 26). Quando os inibidores H-89 e KT 5720 (inibidores da PKA) e Ro 31-0432 (inibidor da PKC) foram utilizados, o efeito do BPA foi anulado, indicando que a atividade da PKA e PKC estão envolvidas neste efeito. Além disso, a inibição da MEK e da p38 MAPK pelos inibidores PD 98,059 e SB 239063, respectivamente, também anulou o efeito do BPA no influxo de cálcio.

**Figura 26:** Envolvimento de proteínas cinases nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias.



Análise do envolvimento de proteínas cinases nos efeitos do BPA no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos de 30 dias. Os inibidores da PKA (H-89 e KT 5720), da PKC (Ro-31-0432) (figura A) e os inibidores da MEK (PD 98,059) e p38<sup>MAPK</sup> (SB 239063) (figura B) foram adicionados 15 min antes do tratamento. Tempo de incubação: 5 min. Valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo por experimento. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo BPA.

#### 4.2.2 Discussão

A ação do BPA como xenoestrógeno é amplamente discutida na comunidade científica. Diversos estudos já demonstraram efeitos do BPA em diferentes concentrações em vários tecidos, levando a alterações no metabolismo e até ao desenvolvimento de câncer (REZG et al., 2014). Camundongos tratados com BPA em doses baixas por períodos crônicos apresentaram distúrbios na função reprodutiva devido a alterações em comportamentos que são essenciais para o sucesso da reprodução (JASAREVIC et al., 2011). Aliado a este fato, lesões severas na mobilidade de espermatozóides e na função das células testiculares podem ser observadas quando BPA é co-administrado com dietilstilbestrol, mesmo em doses baixas (JIANG et al., 2016).

Alterações histológicas e metabólicas no sistema reprodutor após a exposição ao BPA já foram descritas. Em túbulos seminíferos, baixas concentrações de BPA inibem a progressão da meiose (ALI et al., 2014), estimulam a proliferação de espermatogônias e a expressão do GPER (SHENG et al., 2013; SHENG; ZHU, 2011). Em ratos machos imaturos a exposição ao BPA altera a formação da barreira hemato-testicular (BHT) pela modificação da expressão e localização de proteínas chave na estrutura da BHT (BROUARD et al., 2016; LI et al., 2009; SALIAN; DOSHI; VANAGE, 2009). Neste estudo nós demonstramos pela primeira vez que o BPA em concentrações muito baixas (1 picomolar) é capaz de desencadear respostas rápidas e modificar o equilíbrio do cálcio pela alteração da atividade de canais iônicos e de proteínas cinases em testículos de ratos de 30 dias. Um efeito similar foi observado em neurônios hipocámpais de ratos, onde o BPA foi capaz de induzir respostas rápidas na sinalização do cálcio por vias não genômicas (TANABE; KIMOTO; KAWATO, 2006). Além disso, quando comparado ao E2, o BPA teve efeitos similares no influxo de cálcio. Outros estudos já demonstraram anteriormente que o BPA possui um efeito trifásico como o observado no presente trabalho, onde o BPA demonstra efeitos estimulatórios ou inibitórios dependendo da concentração utilizada (CHEN et al., 2017; WANG et al., 2015b). Curiosamente, concentrações extremamente baixas de BPA foram capazes de inibir o influxo

de cálcio; em geral hormônios são mais propensos a ter um efeito em concentrações muito baixas, como o T3 reverso (ZANATTA et al., 2013).

O BPA, por ser um xenoestrógeno, pode agir através dos receptores clássicos dos estrógenos, ESR1 e ESR2, e também através do GPER localizado na membrana plasmática (BOUSKINE et al., 2009; FENICHEL; CHEVALIER; BRUCKER-DAVIS, 2013; GAIDO et al., 1997). Os efeitos não genômicos no presente trabalho aparentam não envolver os receptores clássicos de estrógenos, já que a inibição de ambos os receptores não alterou os efeitos do BPA. O efeito observado com a utilização do inibidor dos ERs ICI 182,780 sozinho é provavelmente relacionado ao fato de que o ICI pode agir como um agonista do receptor GPER (THOMAS et al., 2005). A ativação do GPER pode levar ao aumento do influxo de cálcio, como foi demonstrado em células endoteliais microvasculares de cérebro de rato (RBMVEC) (ALTMANN et al., 2015). A interação entre o GPER e a  $Ca^{2+}$ -ATPase na membrana plasmática também já foi demonstrada por Tran e colaboradores (TRAN et al., 2015). Como não houve diferença entre os efeitos do ICI e BPA, provavelmente estes estão agindo pelo mesmo mecanismo. Isto indica que o BPA pode atuar através do receptor GPER, iniciando uma via de sinalização na membrana plasmática. O envolvimento da PLC no efeito do BPA reforça o papel de uma proteína G nesta via, porém mais estudos são necessários para elucidar esta teoria.

Uma relação entre o BPA e o cálcio já foi demonstrada em ilhotas pancreáticas (ALONSO-MAGDALENA et al., 2005; SORIANO et al., 2012), no sistema nervoso central (LEE et al., 2008; WANG et al., 2013), no sistema cardíaco (POSNACK et al., 2015; YAN et al., 2011) e em outros sistemas. Foi observado que o BPA estimula a apoptose envolvendo a sinalização do cálcio em uma linhagem celular de espermatozoides (QIAN et al., 2015). Em células de Sertoli, o BPA causa lesão celular pela disfunção mitocondrial e sobrecarga de cálcio (WANG et al., 2017). Nesta ampla gama de concentrações foi observado um efeito trifásico do BPA no influxo de cálcio. As oscilações nas concentrações de  $[Ca]_i$ , que regulam diversos processos celulares, podem refletir a modulação do cálcio a partir de diversas fontes: pela ativação de trocadores, bombas de cálcio e canais iônicos. Deste modo, foram utilizadas diferentes ferramentas farmacológicas para investigar as vias de sinalização do cálcio e algumas proteínas *downstream* da membrana plasmática que possam estar envolvidas na sinalização celular desencadeada pelo cálcio extracelular. Primeiramente, alguns alvos envolvidos na sinalização do cálcio na membrana plasmática, como canais iônicos, foram estudados. Uma relação entre o BPA e VDCC já foi demonstrada *in vitro*, onde o BPA foi capaz de inibir estes canais em células endócrinas, cardíacas e neuronais de camundongos

(DEUTSCHMANN et al., 2013). Excepcionalmente no testículo de camundongos o BPA parece ser capaz de modular a expressão de VDCC do tipo T em períodos prolongados de exposição *in vivo* através de vias genômicas envolvendo os ERs (WANG et al., 2015a). Os resultados do presente trabalho indicam que os VDCC não participam do efeito não genômico do BPA, ao menos nas condições experimentais utilizadas.

Apesar dos canais VDCC, a princípio, não participarem no efeito do BPA observado neste trabalho, o BPA demonstrou efeitos similares ao da glibenclamida, um conhecido antagonista de canais de  $K^+$  dependentes de ATP, cuja ação acarreta na despolarização da membrana. Um efeito semelhante foi observado em ilhotas pancreáticas de camundongos e humanos, onde o BPA demonstrou um efeito insulínico (SORIANO et al., 2012). Alguns estudos mostram que o BPA e o GPER podem ter um efeito hiperpolarizante na membrana plasmática (ALTMANN et al., 2015; ZHANG; PESSAH, 2017), porém mais estudos são necessários para elucidar o efeito do BPA no potencial da membrana plasmática. Um mecanismo pelo qual o BPA possa estimular o influxo de cálcio é através dos canais TRPV1, já que o BPA demonstrou efeitos similares ao da capsaicina, um agonista conhecido destes canais. Canais TRP fazem parte de uma família com mais de 30 membros subdivididos em sete classes. O TRPV1 é um canal iônico não seletivo sensível ao calor presente em neurônios sensoriais primários (VAY; GU; MCNAUGHTON, 2012). A presença deste receptor em tecidos não-neuronais, incluindo células de Sertoli e espermatozoides, já foi relatada (DE TONI et al., 2016; ROSSI et al., 2007) assim como seu envolvimento com o transporte de cálcio (BERNABÒ et al., 2010; DE TONI et al., 2016). Apesar de serem canais sensíveis ao calor, canais TRPV1 podem ser ativados através de receptores acoplados à proteína G e proteínas cinases, como PKA e PKC (ROSENBAUM; SIMON, 2007), que podem levar à abertura do canal mesmo em temperaturas corporais normais (TOMINAGA; WADA; MASU, 2001; VELLANI et al., 2001). Da mesma forma, o BPA poderia promover o influxo de cálcio através dos canais TRPV1 pela ativação do GPER, da PKA e/ou PKC.

O efeito do BPA na sinalização do  $[Ca]_i$  também foi estudado. O BPA aumentou o influxo de cálcio em baixas concentrações com efeitos similares ao BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular e à tapsigargina, um inibidor da SERCA. Woeste e colaboradores demonstraram que o BPA pode agir como um inibidor fraco da SERCA em tecido de coelhos (WOESTE et al., 2013). Ademais, o influxo de cálcio provocado pelo BPA aparenta envolver a ativação da PLC, que leva à síntese de  $IP_3$  e poderia resultar na ativação dos receptores de  $IP_3$  no retículo endoplasmático. A inibição da SERCA e a possível ativação dos receptores de  $IP_3$  poderia estar levando à depleção dos estoques intracelulares de cálcio.



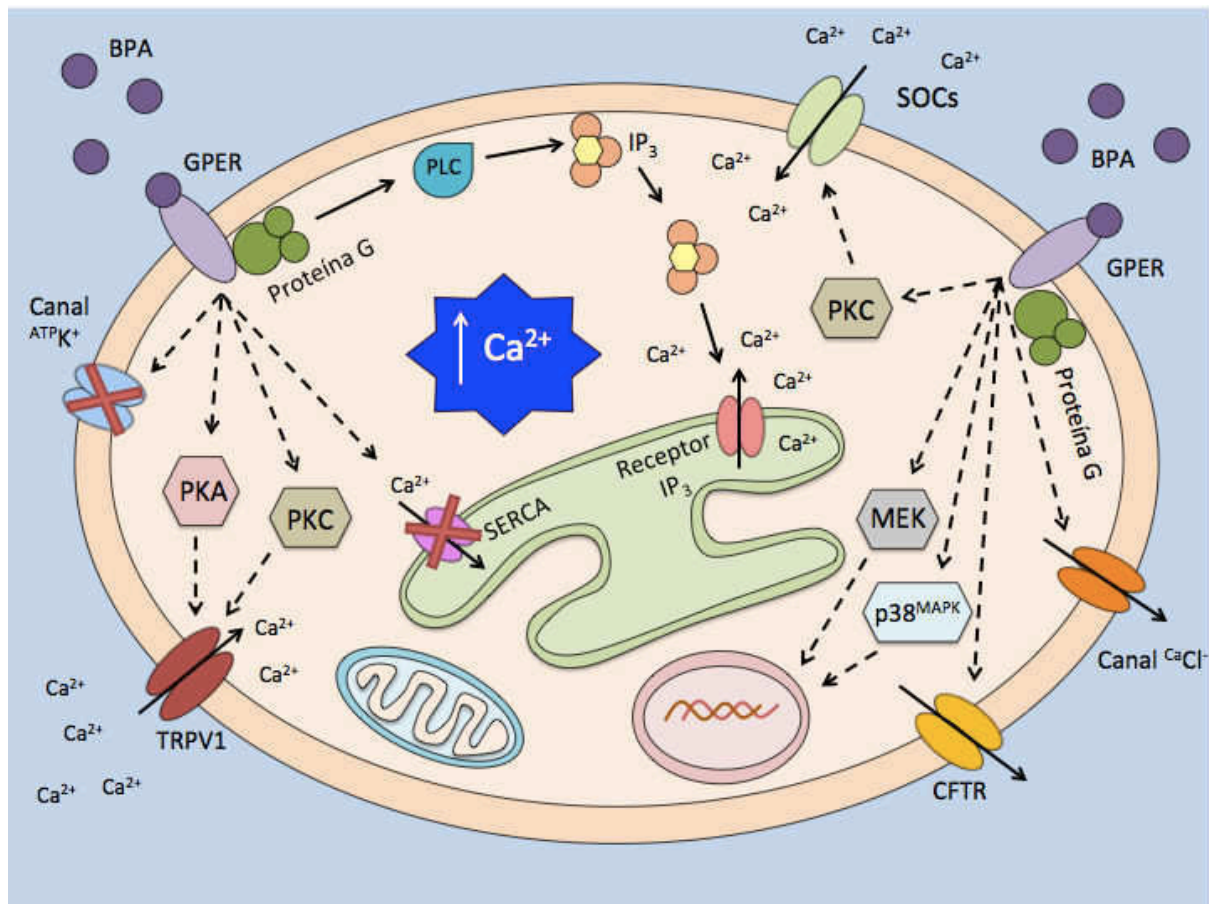
A depleção destes estoques no retículo endoplasmático leva à ativação dos SOCs na membrana plasmática, estimulando assim o influxo de cálcio. SOCs são canais iônicos localizados na membrana plasmática da maioria das células não excitáveis (PRAKRIYA; LEWIS, 2015). Estes canais são ativados pela depleção do  $[Ca]_i$  no retículo endoplasmático. Os SOCs também podem ser ativados pela PKC, que como foi demonstrado também participa no efeito do BPA. O envolvimento dos SOCs nos efeitos do BPA já foi verificado em outros tecidos, onde o BPA estimula a migração de células cancerosas da próstata pela sinalização do cálcio através dos SOCs (DEROUICHE et al., 2013). Além disso, no coração de ratas o BPA promove arritmias alterando a utilização do cálcio no retículo endoplasmático (GAO et al., 2013).

Íons  $Cl^-$  no citosol melhoram a atividade secretória dependente de cálcio em diversos tipos de células endócrinas (TURNER; SEDEJ; RUPNIK, 2005). A participação de canais de cloreto dependentes de cálcio na modulação de VDCC no testículo e em células de Sertoli foi relatada na atividade secretória estimulada por hormônios tireoidianos (T4 e T3 reverso) e 1,25-D<sub>3</sub> (ROSSO et al., 2012; ZANATTA et al., 2013, 2011c). Ainda, correntes de cloreto ativadas por cálcio presentes nas células de Sertoli estão envolvidas no efeito hiperpolarizante do AMPc e na liberação de um fluido rico em bicarbonato e com baixa concentração de cloreto (LALEVÉE; JOFFRE, 1999). Neste trabalho, é demonstrado pela primeira vez que a ação aguda do BPA no testículo desencadeia o influxo de cálcio envolvendo canais de cloreto dependentes de cálcio. Estes dados sugerem que mesmo em baixas concentrações o BPA pode influenciar a atividade secretória no testículo. Os canais de cloreto do tipo CFTR também são expressos nas células de Sertoli. Estes canais são reguladores transmembrana que modulam o pH intracelular e do lúmen pela troca de  $Cl^-/HCO_3^-$  (FOK et al., 2014). No testículo, o CFTR é expresso de acordo com o ciclo da espermatogênese e parece contribuir para a fertilidade masculina. Embora a presença dos CFTR no testículo tenha sido demonstrada em 1991, há poucos dados na literatura sobre a contribuição destes canais para a produção de fluidos e transporte de eletrólitos no testículo e na expressão de proteínas nas células de Sertoli (RATO et al., 2010; TREZÍSE; BUCHWALD, 1991; ZHANG et al., 2016). Neste trabalho foi demonstrado que o bloqueio dos canais CFTR inibiu o efeito estimulatório do BPA no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos. Em conjunto estes resultados reforçam o efeito agudo do BPA em respostas dinâmicas rápidas de cálcio, mediadas por canais de cloreto dependentes de cálcio e canais CFTR.

Respostas não genômicas são classificadas como efeitos que começam na membrana plasmática e que ocorrem dentro de segundos a minutos. Uma resposta não genômica também pode resultar em uma modulação genômica em períodos prolongados (ZANATTA et al., 2011a). Proteínas cinases, como a MEK e p38<sup>MAPK</sup> participam de vias de sinalização nucleares. O envolvimento destas enzimas nos efeitos do BPA indica que o xenoestrógeno pode induzir respostas não genômicas que por sua vez modulem efeitos genômicos em períodos prolongados. Já foi demonstrado anteriormente que o BPA afeta a transdução de sinal celular estimulando o influxo de cálcio e a fosforilação de diversas cinases, e também induz a apoptose em células HT-22 (LEE et al., 2008). No presente trabalho, o inibidor PD 98,059 anulou os efeitos do BPA, demonstrando o papel da MEK na ação estimulatória do BPA no influxo de cálcio. Além disso, o influxo de cálcio, juntamente com a PKC e a p38<sup>MAPK</sup> indicam uma interação entre efeitos de iniciação não genômicos que poderiam convergir com efeitos genômicos, já que ambas as cinases podem induzir a transcrição genômica (WATSON; JENG; GUPTARAK, 2011). Ademais, o efeito modulatório do BPA sobre vias genômicas mediado pela ativação de fatores de transcrição e pela transcrição gênica aponta claramente para a participação da via de sinalização da p38<sup>MAPK</sup> na regulação de KRT1, KRT10, IVL e FGL em queratinócitos orais (EHRENMANN et al., 2017). Corroborando com este fato, os dados demonstrados no presente trabalho demonstram uma associação entre o influxo de cálcio e a ativação da PKC e p38<sup>MAPK</sup>, que poderia regular respostas genômicas. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer este ponto na ação do BPA.

Desta maneira, os resultados deste trabalho demonstram que o BPA é capaz de estimular o influxo de cálcio independente dos ERs clássicos, de maneira consistente com a ativação de um receptor acoplado à proteína G, possivelmente o GPER. Este efeito envolve a modulação de canais iônicos como canais de K<sup>+</sup>, TRPV1 e canais de cloreto. Ainda, o BPA pode modular estoques intracelulares de cálcio pela inibição da SERCA e ativação de receptores de IP<sub>3</sub> no retículo endoplasmático. Ele também modula a ativação de enzimas cinases como a PKA e PKC. As respostas rápidas do BPA no influxo de cálcio poderiam, por sua vez, desencadear uma inter-relação através da ativação da MEK e p38<sup>MAPK</sup> e mediar respostas genômicas (figura 27).

**Figura 27:** Representação esquemática das vias de sinalização do cálcio induzidas pelo BPA em testículos de ratos de 30 dias.



O BPA se liga ao GPER e ativa a PLC, que catalisa a hidrólise do inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol. O  $IP_3$  então age no retículo endoplasmático abrindo os receptores de  $IP_3$  e estimulando a liberação de cálcio do retículo. O BPA também é capaz de inibir a SERCA, aumentando assim a concentração de  $[Ca]_i$ . A depleção do cálcio no retículo endoplasmático estimula a abertura de canais dependentes do estoque (SOCs). Diversos canais iônicos presentes na membrana plasmática aparentam estar envolvidos nos efeitos do BPA no influxo de cálcio, como os canais TRPV1, canais de cloreto dependentes de cálcio (canais  $CaCl$ ), canais de potássio dependentes de ATP (canais  $ATPK^+$ ) e canais CFTR. Alguns destes canais podem ser modulados pela ativação de proteínas cinases como PKA e PKC, que também participam do efeito do BPA. Outras enzimas também parecem estar envolvidas nos efeitos do BPA, como a MEK e a  $p38^{MAPK}$ , o que poderia indicar uma interação entre efeitos iniciais não genômicos que podem convergir com efeitos genômicos. Linhas cheias correspondem a vias diretas; linhas pontilhadas correspondem a vias de várias etapas.

Fonte: criado pela própria autora.

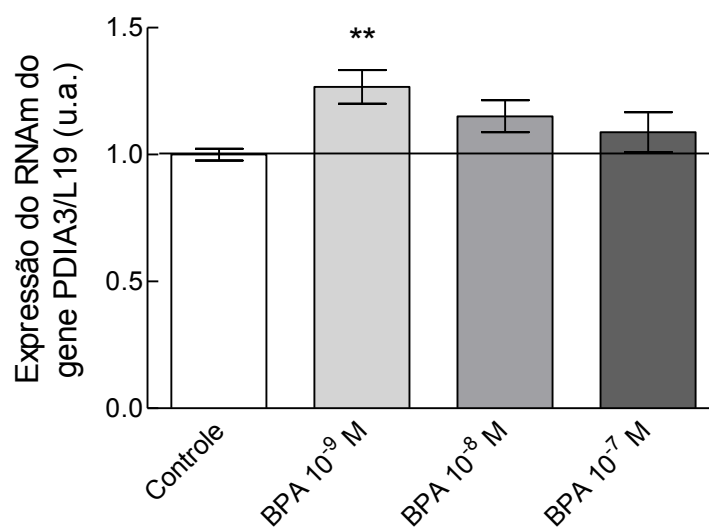
### 4.3 Parte III: Efeitos da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA no metabolismo e sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e E2 em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*

#### 4.3.1 Resultados

##### *Efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA na expressão de genes relacionados a via de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> em células de Leydig*

Após o tratamento das células com 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA, foi analisada a expressão dos genes CYP27A1, CYP2R1, VDR e PDIA3. Os tratamentos não alteraram a expressão dos genes VDR e CYP2R1 nas curvas de dose e de tempo (dados não mostrados). Dentre os tratamentos utilizados, somente o BPA na dose de 10<sup>-9</sup> M foi capaz de aumentar a expressão do gene PDIA3 (figura 28).

**Figura 28:** Efeito do BPA na expressão do RNAm do gene PDIA3 em células de Leydig de ratos adultos.

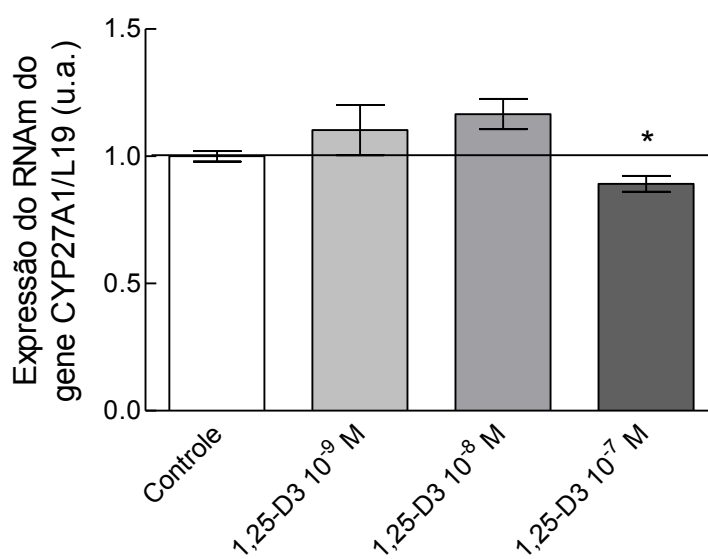


Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos tratadas com BPA *in vitro*. Tempo de incubação: 6 h. A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle de quatro experimentos independentes. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

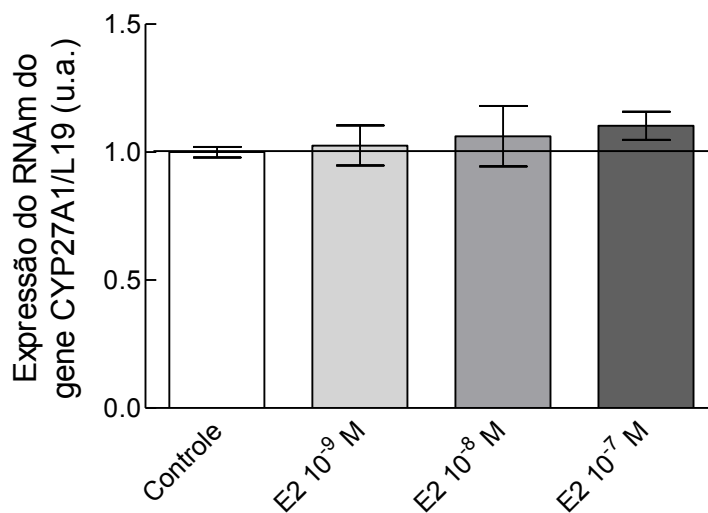
A 1,25-D<sub>3</sub> e 1,25-D<sub>3</sub> + E2 foram capazes de diminuir a expressão do gene CYP27A1 (figura 29). Para verificar se estes hormônios atuam em períodos mais longos, foram realizadas curvas de tempo nos períodos de 3, 6, 10 e 24 h. Como pode ser observado na figura 30, a 1,25-D<sub>3</sub> e 1,25-D<sub>3</sub> + E2 tiveram efeito somente nos tempos mais curtos de incubação, sugerindo um possível efeito de ação rápida nestas células.

**Figura 29:** Efeito da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2 na expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos

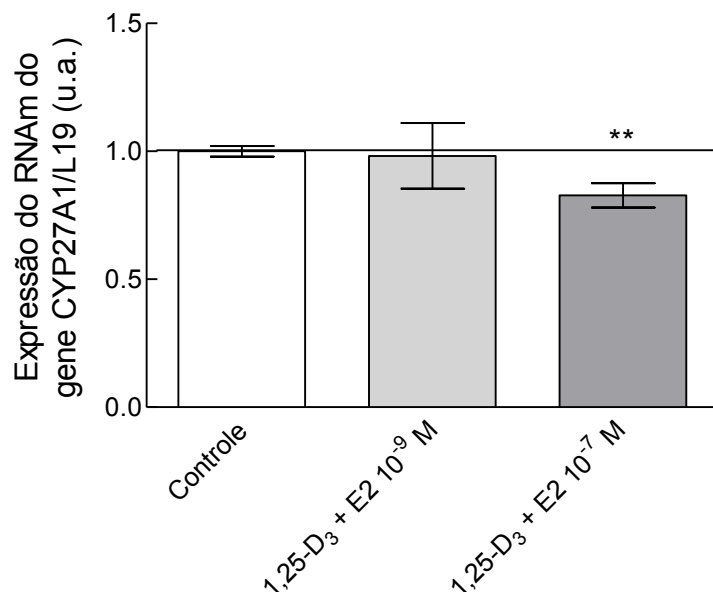
(A)



(B)



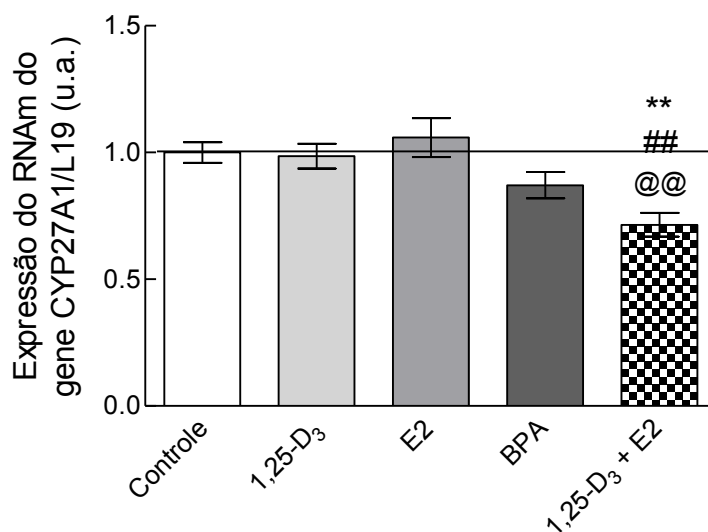
(C)

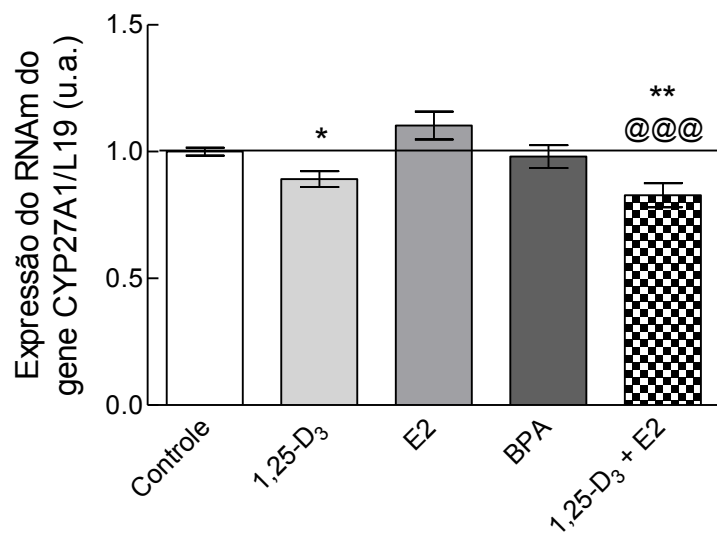
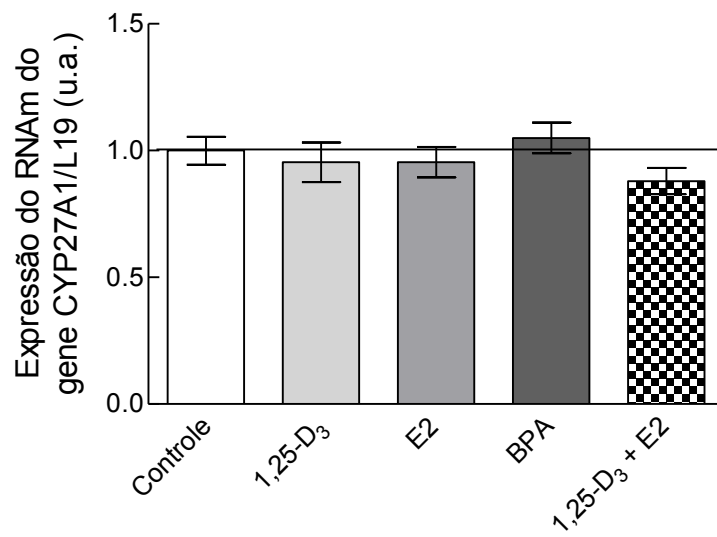


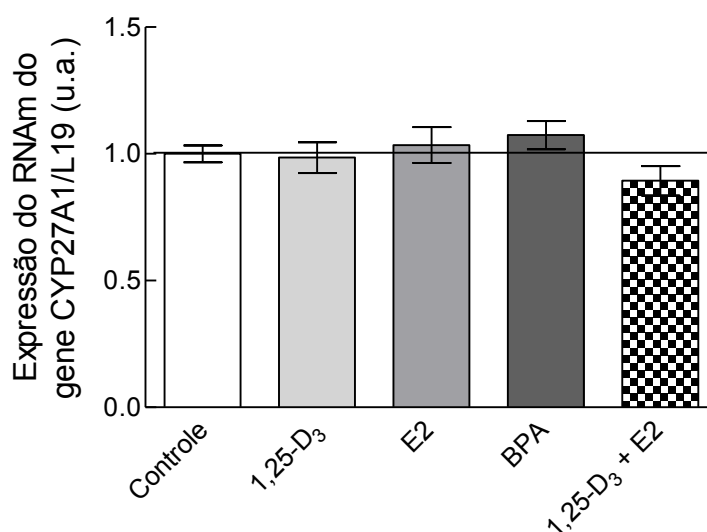
Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos tratadas com 1,25-D<sub>3</sub> e/ou E2 *in vitro*. Tempo de incubação: 6 h. A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle de quatro experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

**Figura 30:** Efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA na expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos

(A) 3 h



**(B) 6 h****(C) 10 h**

**(D) 24 h**

Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm do gene CYP27A1 em células de Leydig de ratos adultos tratadas com 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA (todos os compostos na concentração de 10<sup>-7</sup> M) *in vitro*. Tempo de incubação: 3 h (A), 6 h (B), 10 h (C), 24 h (D). A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle de quatro experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle; ##  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo 1,25-D<sub>3</sub>; @@  $p < 0,01$ ; @@@  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo E2.

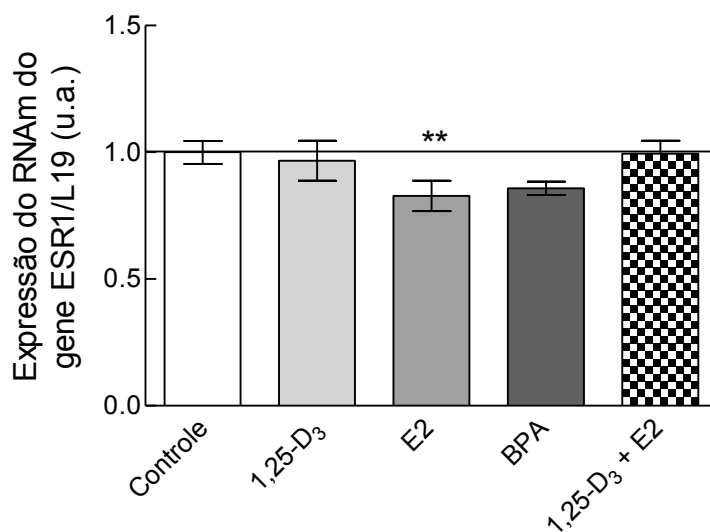
*Efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA na expressão de genes relacionados a via de sinalização do E2 em células de Leydig*

Na análise da expressão dos genes relacionados a sinalização do E2, foram analisadas as expressões gênicas do receptor ESR1 e a enzima aromatase. Dentre os tratamentos utilizados, somente o E2 na dose de 10<sup>-7</sup> M teve efeito na expressão destes genes (figura 31 e 32).

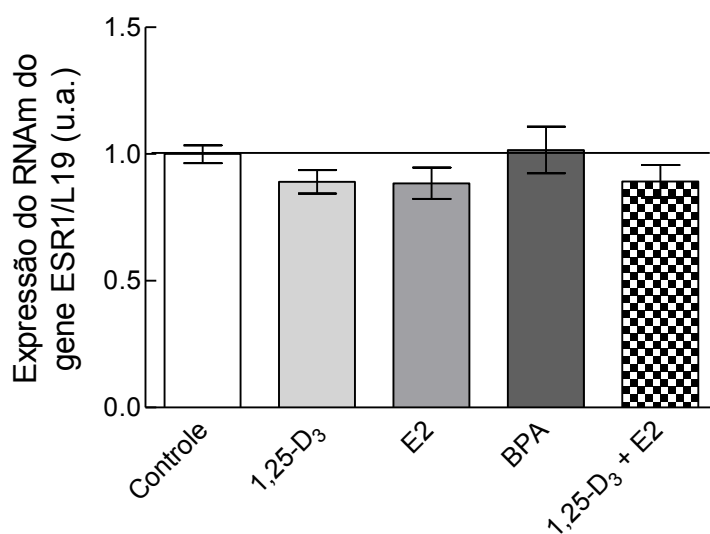


**Figura 31:** Efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA na expressão do RNAm do gene ESR1 em células de Leydig de ratos adultos

**(A) 3 h**



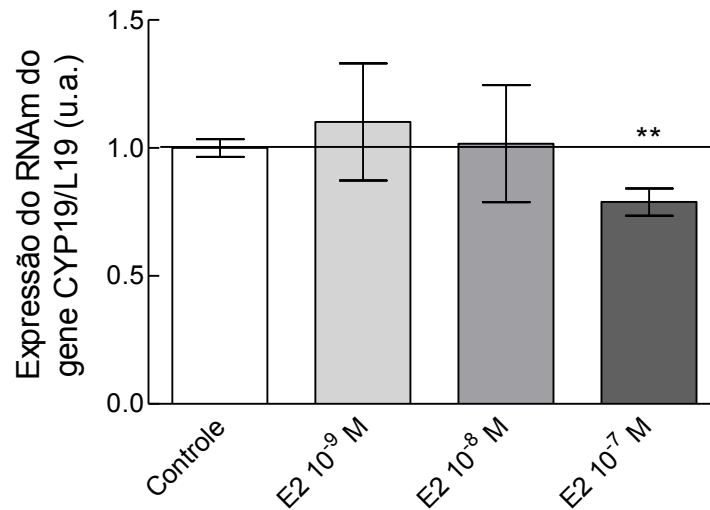
**(B) 6 h**



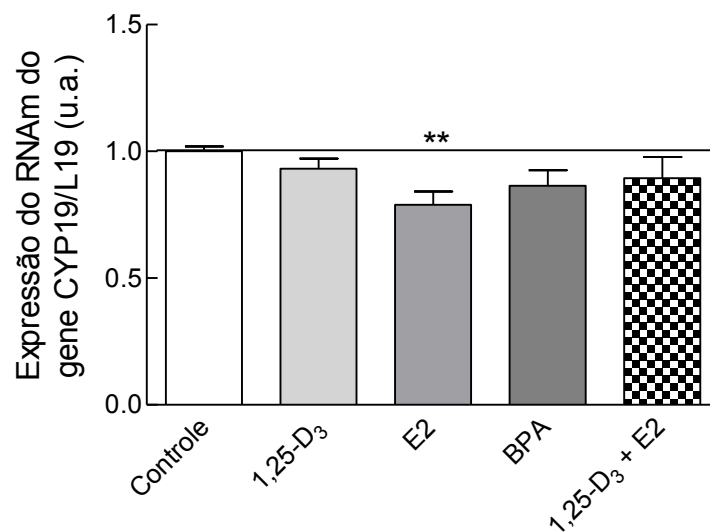
Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm do gene ESR1 em células de Leydig de ratos adultos tratadas com 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA (todos os compostos na concentração de 10<sup>-7</sup> M) *in vitro*. Tempo de incubação: 3 h (A), 6 h (B), 10 h. A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle de quatro experimentos independentes. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

**Figura 32:** Efeito da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA na expressão do RNAm do gene da enzima aromatase (CYP19) em células de Leydig de ratos adultos

(A)



(B)

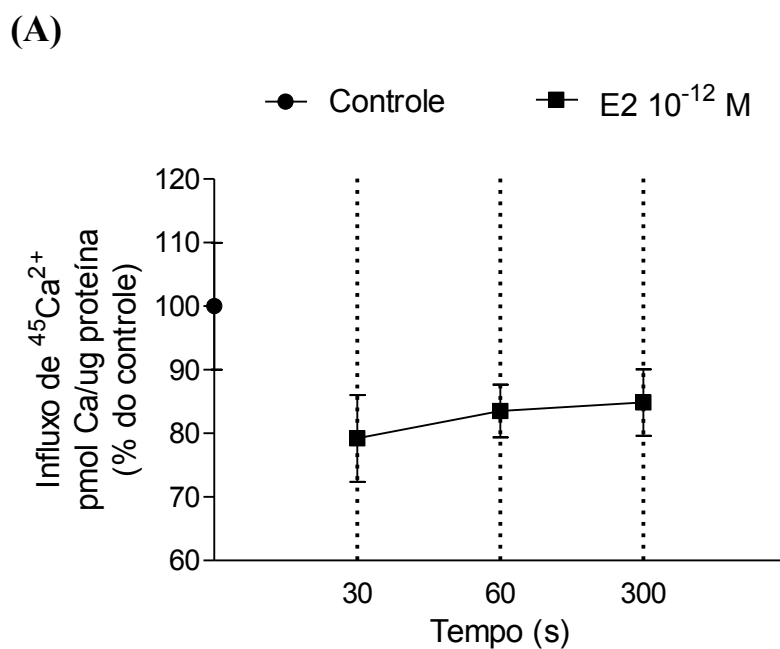


Análise semi-quantitativa através de RT-PCR em tempo real da expressão do RNAm do gene da enzima aromatase (CYP19) em células de Leydig de ratos adultos tratadas com E2 (figura A) e 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA (todos os compostos na concentração de 10<sup>-7</sup> M) (figura B) *in vitro*. Tempo de incubação: 6 h (A, B). A quantidade relativa dos genes de interesse foram normalizados pelo gene de referência (proteína ribossomal L19). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias em comparação com o controle de quatro experimentos independentes. \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.

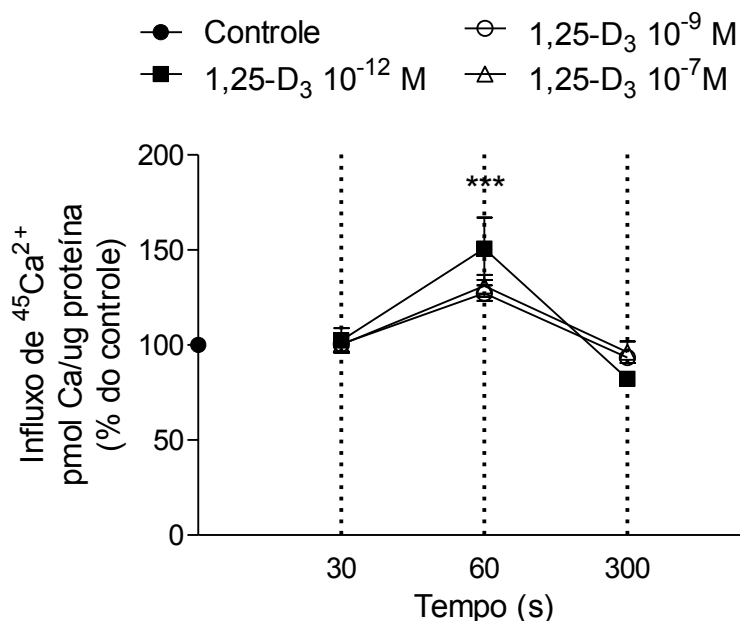
*Efeitos da 1,25-D<sub>3</sub>, do E2 e do BPA no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em células de Leydig de ratos adultos.*

Para estudar o papel da 1,25-D<sub>3</sub>, do E2 e do BPA em respostas rápidas, as células de Leydig foram incubadas com <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> e então tratadas com os compostos (nas doses de 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-9</sup> e 10<sup>-7</sup> M) por períodos curtos de incubação (30, 60 e 300 s). Como pode ser observado na figura 33A, o E2 aparenta ter um efeito inibitório no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, enquanto o tratamento com BPA não demonstrou alterações (dados não mostrados). Já a 1,25-D<sub>3</sub> estimulou o influxo de cálcio na dose de 10<sup>-12</sup> M em 60 s (figura 33B).

**Figura 33:** Efeitos do E2 e da 1,25-D<sub>3</sub> no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em células de Leydig de ratos adultos.



(B)



Análise dos efeitos do E2 e da 1,25-D<sub>3</sub> no influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em células de Leydig de ratos adultos tratadas *in vitro*. Foi realizada uma curva de tempo do E2 na dose de 10<sup>-12</sup> M (figura A) e curvas de tempo e dose da 1,25-D<sub>3</sub> (figura B). Valores correspondem à média ± E.P.M. de dois experimentos independentes. \*\*\*p < 0.001 comparado ao grupo controle.

#### 4.3.2 Discussão

Uma das principais funções das células de Leydig no testículo é a síntese de testosterona. Este hormônio é sintetizado a partir do colesterol, em uma série de reações catalisadas por enzimas específicas localizadas nas membranas mitocondrial e microsomal das células de Leydig, num processo conhecido como esteroidogênese (AZHAR; REAVEN, 2007). Ao final deste processo, a testosterona produzida pode ser convertida a E2, através da atividade da enzima aromatase. As células de Leydig, juntamente com as células germinativas, são a maior fonte de produção de estrógenos no testículo do rato adulto. A presença da expressão e atividade da enzima aromatase, juntamente com a expressão dos ERs nestas células demonstram a importância dos estrógenos para a regulação do desenvolvimento e da função reprodutiva (O'DONNELL et al., 2001).

Os estrógenos são capazes de regular diversas funções das células de Leydig. A exposição a estrógenos em animais imaturos inibe a proliferação e diferenciação das células de Leydig (ABNEY, 1999). A produção de testosterona também é alterada (BARTKE; WILLIAMS; DALTERIO, 1977) através da inibição das enzimas que participam da

esteroidogênese nestas células (BRINKMANN et al., 1980; HSUEH; DUFAU; CATT, 1978; STRAUSS et al., 2009). Os andrógenos produzidos nas células de Leydig, por sua vez, são capazes de controlar o metabolismo e inativação dos estrógenos, modulando a produção da enzima estrógeno sulfotransferase (QIAN; SONG, 1999). Considerando estes fatores, fica evidente que os estrógenos possam ter uma ação parácrina no testículo controlando o desenvolvimento das células de Leydig.

Neste trabalho demonstramos que o tratamento das células com E2 em doses altas ( $10^{-7}$  M) inibe a expressão da enzima aromatase e do receptor ESR1 em tempos curtos. Este efeito pode ser consequência da ação inibitória dos estrógenos no metabolismo das células de Leydig e também no metabolismo do próprio hormônio (ABNEY, 1999; O'DONNELL et al., 2001). Embora já tenha sido demonstrado que o E2 aumenta a expressão e atividade da aromatase nestas células em longos períodos, é evidente que este efeito é tempo e dose dependente (BOURGUIBA et al., 2003; GENISSEL; LEVALLET; CARREAU, 2001). Em cultura de túbulos seminíferos, também já foi demonstrado um efeito inibidor do E2 sobre o seu metabolismo (ZANATTA, 2015)

A 1,25-D<sub>3</sub> e o E2 também diminuíram a expressão do gene CYP27A1 em curtos períodos de incubação. O efeito da 1,25-D<sub>3</sub> em seu próprio metabolismo indica um mecanismo de retroalimentação negativa, como já é descrito na literatura (JENSEN, 2014). Os resultados demonstram que há uma potencialização no efeito dos dois hormônios sobre a expressão do CYP27A1 num curto tempo nestas células. A 1,25-D<sub>3</sub> parece ter efeitos importantes nas células de Leydig. Animais VDRKO tem a expressão e atividade da aromatase diminuída, com níveis plasmáticos LH e FSH aumentados (KINUTA et al., 2000) e ESR diminuídos no testículo (BLOMBERG JENSEN et al., 2013).

A esteroidogênese nas células de Leydig é controlada principalmente pelo LH através do eixo HPG. A hipófise, quando estimulada pelo GnRH produzido pelo hipotálamo, libera FSH e LH na circulação. Enquanto o FSH age nas células de Sertoli, o LH estimula as células de Leydig a produzir testosterona. A testosterona, por sua vez, age no hipotálamo e na hipófise inibindo a secreção de GnRH e gonadotrofinas, num mecanismo de retroalimentação negativa. O estradiol também é capaz de modular a secreção de hormônios pelo eixo HPG (CHIMENTO et al., 2014). Há evidências que a 1,25-D<sub>3</sub> também possa ter efeitos regulatórios no mecanismo de secreção hormonal da hipófise, pela expressão do VDR neste tecido (WANG; ZHU; DELUCA, 2012). A 1,25-D<sub>3</sub> estimula a esteroidogênese e a síntese de testosterona em células testiculares humanas (HOFER et al., 2014) apresentando um efeito sinérgico com o LH. Além disso, já foi demonstrado que o tratamento com gonadotrofinas

coriônica humana (hCG) aumenta a expressão proteica de CYP2R1 em células de Leydig de linhagem MA-10 (FORESTA et al., 2013). Já que o hCG e o LH compartilham o mesmo receptor, isto poderia indicar que o LH é capaz de regular o metabolismo da 1,25-D<sub>3</sub> em células de Leydig, demonstrando que a 1,25-D<sub>3</sub> possui um papel importante nestas células. Há trabalhos que sugerem que os estrógenos são capazes de modular os receptores de LH nas células de Leydig, alterando a responsividade das células ao hormônio. Já foi relatado o aumento da responsividade destas células ao LH em macacos tratados com um inibidor da aromatase (O'DONNELL et al., 2001; SHETTY et al., 1998).

Diversos trabalhos na literatura demonstram que a regulação hormonal nas células de Leydig também é controlada por diversas vias de sinalização, como a PKA, AKT, PI3K, PKC, MAPKs e proteínas sinalizadoras de cálcio intracelulares (AZHAR; REAVEN, 2007). A ligação do LH nas células de Leydig leva à ativação da adenilato ciclase, aumentando a concentração de AMPc. A estimulação do receptor de LH também ativa a PLC, aumentando os níveis de IP3 e diacilglicerol. Ambos processos são capazes de alterar a concentração citosólica de cálcio. Além de participar em mecanismos de secreção celular, o cálcio também é essencial para a esteroidogênese (COSTA; VARANDA; FRANCI, 2010). Apesar da importância deste íon, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo de ação do cálcio nas células de Leydig. Considerando a influência da 1,25-D<sub>3</sub> no metabolismo e sinalização envolvendo o cálcio, é possível que este hormônio também possua ações regulatórias importantes para o metabolismo nas células de Leydig.

No presente trabalho também foi demonstrado que o E2 inibe o influxo de cálcio em células de Leydig em períodos curtos relacionados a respostas rápidas na membrana plasmática. Considerando a importância do cálcio para a esteroidogênese, este efeito poderia estar relacionado a retroalimentação negativa provocada pelo E2 nas células de Leydig. A 1,25-D<sub>3</sub>, por sua vez, aumentou o influxo de cálcio nestas células em concentrações baixas, efeito que já foi demonstrado em testículos de ratos imaturos e células de Sertoli (ROSSO et al., 2012; ZANATTA et al., 2011c, 2011d). Levando em consideração a influência da 1,25-D<sub>3</sub> no metabolismo e sinalização do cálcio, é possível que este hormônio possa ter ações regulatórias importantes no metabolismo das células de Leydig e na esteroidogênese.

Desta forma, foi demonstrado que a 1,25-D<sub>3</sub> e o E2 poderiam agir inibindo o próprio metabolismo através de um efeito de retroalimentação negativa em células de Leydig de ratos adultos. Também foi demonstrado que o E2 inibe o influxo de cálcio de maneira não genômica. Por outro lado, a 1,25-D<sub>3</sub> foi capaz de aumentar o influxo de cálcio nestas células. Assim, pode-se concluir que estes hormônios aparentam ter um papel importante no

metabolismo das células de Leydig e no processo da esteroidogênese, porém mais estudos são necessários para esclarecer estes efeitos.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo estudar possíveis vias de interação na sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e o E2 em células testiculares de ratos de diferentes idades. Como citado anteriormente existem indícios de que estes dois hormônios compartilham algumas vias de sinalização, como demonstram os estudos de Kinuta e colaboradores, Blomberg Jensen e colaboradores, e mais recentemente Sun e colaboradores (BLOMBERG JENSEN et al., 2013; KINUTA et al., 2000; SUN et al., 2015). Além disso, também foi analisada a influência do BPA nestes mecanismos. Sendo assim, optamos por estudar diferentes aspectos de interação a partir de três abordagens diferentes:

- Tratamentos *in vivo* com E2 e BPA em ratos de diferentes idades;
- Tratamentos *in vitro* onde foram analisados efeitos não genômicos do BPA em testículos de ratos de 30 dias;
- Tratamentos *in vitro* com a 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA para a análise de efeitos genômicos e não genômicos em células de Leydig de ratos adultos.

No primeiro estudo foram analisados a expressão gênica e proteica dos receptores da 1,25-D<sub>3</sub>, VDR e PDIA3, além da enzima 25-hidroxilase (CYP27A1) em testículos de ratos após o tratamento *in vivo* com E2 ou BPA. Os tratamentos e seus efeitos foram realizados em diferentes idades (idade pré-púbere e idade adulta). Os principais resultados observados neste estudo foram relativos aos tratamentos realizados nos animais pré-púberes, onde a análise logo após o tratamento demonstrou uma diminuição nos níveis dos genes e proteínas estudados. Quando os animais foram analisados 60 dias após o término do tratamento, foi observado o efeito contrário, um aumento na expressão dos genes e proteínas alvo. Isto demonstra que a idade pré-púbere parece ser a idade mais susceptível à exposição de estrógenos, provavelmente devido ao estágio evolutivo correspondente ao início da primeira onda espermatogênica, à formação da BHT e à maturação das células de Sertoli. Considerando os efeitos do tratamento com E2 nos receptores da 1,25-D<sub>3</sub> e da enzima 25-hidroxilase fica claro a presença de interações entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2, e que estes dois hormônios podem regular o metabolismo e a sinalização um do outro.

No segundo estudo foram analisados possíveis efeitos rápidos / de membrana gerados pelo BPA em testículos de ratos de 30 dias, por essa idade demonstrar ser a mais susceptível a exposição de agentes externos. Efeitos rápidos de membrana da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2 já foram demonstrados em testículos de ratos imaturos em estudos de influxo de cálcio e captação de



aminoácidos (MENEGAZ et al., 2009; ZANATTA, 2015; ZANATTA et al., 2011c). Considerando os efeitos do BPA como xenoestrógeno, seus efeitos foram analisados em efeitos rápidos de membrana através da técnica de influxo de cálcio com tratamento *in vitro*. Foi observado que o BPA é capaz de modular diversos canais iônicos em concentrações muito baixas, com mecanismos de certa forma semelhantes aos da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2, como o envolvimento de canais de cloreto dependentes de cálcio, a modulação do [Ca]<sup>2+</sup><sub>i</sub> e atividade de enzimas cinases como PKA, PKC e MEK. A sinalização do cálcio é extremamente importante no sistema reprodutor, desde a síntese de testosterona, o funcionamento da BHT até a reação acrossômica no espermatozóide. A influência do BPA sobre os mecanismos de sinalização e homeostasia do cálcio nas células testiculares pode ser um dos fatores que levam às diversas alterações na função reprodutiva já relatadas em outros estudos.

No terceiro estudo, foram utilizadas células de Leydig isoladas de ratos adultos para verificar possíveis efeitos genômicos e não genômicos da 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e do BPA. Estas células foram escolhidas por serem o principal sítio de síntese do E2 nos animais adultos. A expressão dos genes VDR, PDIA3, CYP27A1, aromatase (CYP19) e ESR1 foram analisadas em tratamentos curtos e prolongados (de 3 a 10 h de incubação). Foi observado que os tratamentos demonstraram efeitos em períodos curtos (de 3 a 6 h), e que a 1,25-D<sub>3</sub> e o E2 poderiam estar atuando por mecanismos de retroalimentação negativa nestas células, já que a 1,25-D<sub>3</sub> inibiu a expressão da 25-hidroxilase e o E2 inibiu a expressão da aromatase e do ESR1. Também foram realizados ensaios de influxo de cálcio para estudar respostas não genômicas. Nestes ensaios, o E2 e o BPA inibiram o influxo de cálcio nas células de Leydig, o que corrobora com o mecanismo de retroalimentação negativa visto na expressão gênica, já que o cálcio é necessário para a esteroidogênese e, conseqüentemente, para a síntese do E2 através da aromatase. Já a 1,25-D<sub>3</sub> estimulou o influxo de cálcio, demonstrando que este hormônio talvez possa modular o metabolismo e a homeostasia do cálcio nestas células.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível observar efeitos de tratamentos *in vivo* e *in vitro* com a 1,25-D<sub>3</sub>, E2 e BPA em vias de sinalização em células testiculares. No tratamento *in vivo* com E2 e BPA na idade pré-púbere, foi observado um efeito inibitório nos genes VDR e CYP27A1, sendo que o mesmo efeito não foi observado na expressão da proteína VDR. Estes efeitos não foram observados nos animais adultos que receberam o tratamento quando ainda imaturos, que demonstraram um aumento na expressão dos três genes estudados, VDR, PDIA3 e CYP27A1. O tratamento, quando administrado na idade adulta, não teve nenhum efeito, o que demonstra que a idade pré-púbere é mais susceptível a exposição de estrógenos.

Em testículos de ratos pré-púberes, o E2 e o BPA estimularam o influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, demonstrando um efeito não-genômico neste tecido. Com o uso de inibidores, foi verificado o envolvimento de canais iônicos nos efeitos do BPA, como os canais TRPV1, SOCs, canais de K<sup>+</sup> dependentes de ATP, canais de Cl<sup>-</sup> dependentes de Ca<sup>2+</sup> e canais CFTR. Além disso, o BPA também se demonstrou capaz de alterar a sinalização do [Ca]<sub>i</sub>, modulando canais de IP3 e a atividade da SERCA. Também participam deste efeito proteínas cinases como a PKA e PKC. As respostas rápidas do BPA observadas neste estudo também podem estar ligadas a ativação de respostas genômicas, já que as enzimas MEK e p38MAPK também participam do efeito do BPA.

Nas células de Leydig de ratos adultos, o tratamento com 1,25-D<sub>3</sub> teve um efeito inibitório na expressão do gene CYP27A1 em tempos curtos. O mesmo foi observado na expressão dos genes ESR1 e CYP19A1 com o tratamento com E2. Um efeito sinérgico inibitório da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2 na expressão do gene CYP27A1 também foi observado. No influxo de cálcio, o E2 e o BPA demonstraram efeitos inibitórios, enquanto que a 1,25-D<sub>3</sub> estimulou o influxo de cálcio nestas células.

Diante destes resultados, podemos afirmar que a 1,25-D<sub>3</sub>, o E2 e o BPA possuem efeitos moleculares importantes no sistema reprodutor masculino, através da expressão gênica de receptores e enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios esteroides 1,25-D<sub>3</sub> e E2. Além disso, os resultados obtidos reforçam a teoria de que há uma relação entre as vias de sinalização da 1,25-D<sub>3</sub> e do E2. Assim como a 1,25-D<sub>3</sub> e o E2, o BPA também estimula efeitos não-genômicos envolvidos na sinalização do cálcio.

## 7 REFERÊNCIAS

ABNEY, T. O. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v. 64, n. 9, p. 610–617, set. 1999.

ALI, S. et al. Exposure to Low-Dose Bisphenol A Impairs Meiosis in the Rat Seminiferous Tubule Culture Model: A Physiotoxicogenomic Approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106245, 2 set. 2014.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 969–977, ago. 2005.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 201–207, maio 2012.

ALTMANN, J. B. et al. G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 629–639, jun. 2015.

ALVES, M. G. et al. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 70, n. 5, p. 777–793, mar. 2013.

ANTAL, M. C. et al. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER $\beta$ -null mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2433–2438, 2008.

AREVALO, M.-A.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 17–29, 26 nov. 2014.

AZHAR, S.; REAVEN, E. Regulation of Leydig Cell Cholesterol Metabolism. In: **The Leydig cell in health and disease**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007. p. 135–148.

BARTKE, A.; WILLIAMS, K. I.; DALTERIO, S. Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 645–649, dez. 1977.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 32, n. 4, p. 315–319, 24 jan. 1983.

BELLVÉ, A. R. et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 25, n. 7, p. 480–494, jul. 1977.

BERGMAN, Å.; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 an assessment of the state of the science of endocrine disruptors**. Geneva: WHO ; UNEP, 2013.

- BERNABÒ, N. et al. Role of TRPV1 channels in boar spermatozoa acquisition of fertilizing ability. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 2, p. 224–231, jul. 2010.
- BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium**, v. 32, n. 5–6, p. 235–249, nov. 2002.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 933–940, jun. 2009.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium - a life and death signal. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 645–648, out. 1998.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 517–529, jul. 2003.
- BITTMAN, E. L. Timing in the Testis. **Journal of biological rhythms**, p. 0748730415618297, 2015.
- BLAKEMORE, J.; NAFTOLIN, F. Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. **Physiology**, v. 31, n. 4, p. 258–269, jul. 2016.
- BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p. 1303–1311, 1 maio 2010.
- BLOMBERG JENSEN, M. et al. Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 377, n. 1–2, p. 93–102, set. 2013.
- BOOTMAN, M. D. et al. Calcium signalling—an overview. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 12, n. 1, p. 3–10, fev. 2001.
- BOUILLON, R.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. W. Structure-Function Relationships in the Vitamin D Endocrine System. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 2, p. 200–257, 1995.
- BOURGUIBA, S. et al. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 335–343, set. 2003.
- BOUSKINE, A. et al. Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 7, p. 1053–1058, jul. 2009.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1–2, p. 139–144, fev. 2002.
- BRINKMANN, A. O. et al. A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 801–809, nov. 1980.
- BROTONS, J. A. et al. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 6, p. 608–612, jun. 1995.

- BROUARD, V. et al. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 63, p. 49–61, 9 maio 2016.
- BUITRAGO, C.; BOLAND, R. Caveolae and caveolin-1 are implicated in 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ -dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1–2, p. 169–175, jul. 2010.
- CALI, J. J. et al. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 12, p. 7779–7783, 1991.
- CALVEL, P. et al. Testicular postgenomics: targeting the regulation of spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1481–1500, 27 maio 2010.
- CAPIATI, D.; BENASSATI, S.; BOLAND, R. L. 1,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$  induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 128–135, 2002.
- CARREAU, S. et al. Estrogen signaling in testicular cells. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 584–587, out. 2011.
- CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1517–1535, 27 maio 2010.
- CATTERALL, W. A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca $^{2+}$  Channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 1, p. 521–555, nov. 2000.
- CHEMALY, E. R.; TRONCONE, L.; LEBECHE, D. SERCA control of cell death and survival. **Cell Calcium**, jul. 2017.
- CHEN, J. et al. Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  in osteoblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 37041–37050, 19 nov. 2010.
- CHEN, J. et al. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ . **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2362–2373, dez. 2013.
- CHEN, X. et al. The Rapid Effect of Bisphenol-A on Long-Term Potentiation in Hippocampus Involves Estrogen Receptors and ERK Activation. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- CHENG, J. B. et al. De-orphanization of Cytochrome P450 2R1: A MICROSOMAL VITAMIN D 25-HYDROXYLASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 38084–38093, 26 set. 2003.
- CHENG, J. B. et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7711–7715, 2004.

CHERRADI, N. et al. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450scc and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 12, p. 7899–7907, 21 mar. 1997.

CHIMENTO, A. et al. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 320, n. 1–2, p. 136–144, 14 maio 2010.

CHIMENTO, A. GPER signaling in spermatogenesis and testicular tumors. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, 2014.

CHIMENTO, A. et al. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Testis Axis and Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, 2014.

COOKE, H. J.; SAUNDERS, P. T. K. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 10, p. 790–801, out. 2002.

CORREIA, J.; MICHELANGELI, F.; PUBLICOVER, S. Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm. **Reproduction**, v. 150, n. 2, p. R65–R76, ago. 2015.

COSTA, R. R.; VARANDA, W. A. Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels: T-type calcium channels in Leydig cells. **The Journal of Physiology**, v. 585, n. 2, p. 339–349, 1 dez. 2007.

COSTA, R. R.; VARANDA, W. A.; FRANCI, C. R. A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells. **AJP: Cell Physiology**, v. 299, n. 2, p. C316–C323, 1 ago. 2010.

COVACI, A. et al. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. **Environmental Research**, v. 141, p. 77–85, ago. 2015.

DE BOLAND, A. R.; NEMERE, I. Rapid actions of vitamin D compounds. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 32–36, maio 1992.

DE ROOIJ, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 3, p. 347–354, mar. 2001.

DE TONI, L. et al. Heat Sensing Receptor TRPV1 Is a Mediator of Thermotaxis in Human Spermatozoa. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167622, 16 dez. 2016.

DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 684–700, set. 2007.

DEROUICHE, S. et al. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 54, 2013.

- DEUTSCHMANN, A. et al. Bisphenol A Inhibits Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels in Vitro: Mechanisms and Structural Requirements. **Molecular Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 501–511, 1 fev. 2013.
- DONG, Q.; MILLER, W. L. Vitamin D 25-hydroxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, n. 1–2, p. 197–198, set. 2004.
- D'SOUZA, R. et al. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 241, n. 1–2, p. 41–48, set. 2005.
- DUPONT, S. et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. **Development**, v. 127, n. 19, p. 4277–4291, 2000.
- DUSELL, C. D. et al. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 65–77, jan. 2008.
- DUSSO, A. S. Vitamin D. **AJP: Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F8–F28, 1 jul. 2005.
- EDDY, E. M. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796–4805, nov. 1996.
- EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Opinion on BPA. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3978, jan. 2015.
- EHRENMANN, M. et al. Effects of low-dose Bisphenol A on calcium ion influx and on genes of proliferation and differentiation in immortalized human gingival cells in vitro: The role of estrogen receptor beta. **Dental Materials**, v. 33, n. 9, p. 1021–1032, set. 2017.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE: Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYP. **EFSA Journal**, v. 5, n. 1, p. 428, jan. 2007.
- FAWCETT, D. W. Sistema Reprodutor Masculino. In: **Tratado de Histologia**. 11. ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1993. p. 802–857.
- FENICHEL, P.; CHEVALIER, N.; BRUCKER-DAVIS, F. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. **Annales d'Endocrinologie**, v. 74, n. 3, p. 211–220, jul. 2013.
- FILARDO, E. J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 80, n. 2, p. 231–238, 2002.
- FLINIAUX, I. et al. TRPs and Ca<sup>2+</sup> in cell death and survival. **Cell Calcium**, jul. 2017.

- FOK, K. L. et al. Novel regulators of spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 31–42, maio 2014.
- FORESTA, C. et al. Altered bone status in unilateral testicular cancer survivors: Role of CYP2R1 and its luteinizing hormone-dependency. **Journal of Endocrinological Investigation**, n. 6, jun. 2013.
- GAIDO, K. W. et al. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 205–212, mar. 1997.
- GAO, X. et al. Molecular Mechanisms Underlying the Rapid Arrhythmogenic Action of Bisphenol A in Female Rat Hearts. **Endocrinology**, v. 154, n. 12, p. 4607–4617, dez. 2013.
- GAO, Y. et al. Role of protein kinase C in the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in airway smooth muscle cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 32, n. 3, p. 303–310, jun. 2012.
- GENISSEL, C.; LEVALLET, J.; CARREAU, S. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. **The Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 95–105, jan. 2001.
- GROVE, B. D.; VOGL, A. W. Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction? **Journal of Cell Science**, v. 93 ( Pt 2), p. 309–323, jun. 1989.
- GWATHMEY, J. K.; YEREVANIAN, A. I.; HAJJAR, R. J. Cardiac gene therapy with SERCA2a: From bench to bedside. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 5, p. 803–812, maio 2011.
- HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. **International review of cytology**, v. 233, p. 181–241, 2004.
- HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HELDRING, N. et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 905–931, 1 jul. 2007.
- HESS, R. A. et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 509–512, 4 dez. 1997.
- HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Austin: Landes Bioscience/Springer Science, 2008. p. 1–15.
- HIRAI, T. et al. Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D on Testicular Morphology and Gene Expression in Experimental Cryptorchid Mouse: Testis Specific cDNA Microarray Analysis and Potential Implication in Male Infertility. **The Journal of Urology**, v. 181, n. 3, p. 1487–1492, mar. 2009.
- HOEKSTRA, E. J.; SIMONEAU, C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate—A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 386–402, jan. 2013.



- HOFER, D. et al. Testicular Synthesis and Vitamin D Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 10, p. 3766–3773, out. 2014.
- HOFMANN, F.; LACINOVÁ, L.; KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 139, p. 33–87, 1999.
- HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1080S–6S, abr. 2008.
- HOLSTEIN, A.-F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2003.
- HOSEY, M. M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. **The Journal of Membrane Biology**, v. 104, n. 2, p. 81–105, set. 1988.
- HSUEH, A. J.; DUFAU, M. L.; CATT, K. J. Direct inhibitory effect of estrogen on Leydig cell function of hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 103, n. 4, p. 1096–1102, out. 1978.
- IGUCHI, N.; TOBIAS, J. W.; HECHT, N. B. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up-and down-regulated. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 20, p. 7712–7717, 2006.
- IVELL, R.; WADE, J. D.; ANAND-IVELL, R. INSL3 as a Biomarker of Leydig Cell Functionality. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 6, p. 147–147, 13 jun. 2013.
- JASAREVIC, E. et al. Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11715–11720, 12 jul. 2011.
- JAYLE, M. F. et al. [Excretion of phenol steroids and 17-ketosteroids after the administration of chorionic gonadotropins to men]. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 7, p. 212–220, mar. 1962.
- JENSEN, M. B. Vitamin D and male reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 175–186, 14 jan. 2014.
- JIANG, X. et al. Low-dose and combined effects of oral exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on the male reproductive system in adult Sprague-Dawley rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 94–102, abr. 2016.
- JOHNSON, J. A. et al. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, n. 1, p. 7–15, jan. 1996.
- JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 23–51, abr. 2008.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. **The Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 1, p. 13–31, 1 jan. 2014.

KHANAL, R. C.; NEMERE, I. The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1087–1093, 2007.

KINUTA, K. et al. Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1317–1324, 2000.

KRAUSS, G. Intracellular Messenger Substances: Second Messengers. In: **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. 3a. ed. Darmstadt: Druckhaus Darmstadt GmbH, 2003.

KRAWETZ, S. A.; DE ROOIJ, D. G.; HEDGER, M. P. Molecular aspects of male fertility. International Workshop on Molecular Andrology. **EMBO reports**, v. 10, n. 10, p. 1087–1092, out. 2009.

KREGE, J. H. et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15677–15682, 1998.

KWIECINSKI, G. G.; PETRIE, G. I.; DELUCA, H. F. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 5, p. 741–744, maio 1989.

LA ROVERE, R. M. L. et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. **Cell Calcium**, v. 60, n. 2, p. 74–87, ago. 2016.

LALEVÉE, N.; JOFFRE, M. Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis. **The Journal of Membrane Biology**, v. 169, n. 3, p. 167–174, 1 jun. 1999.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, n. 4, p. 548–573, 1952.

LEE, S. et al. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- $\kappa$ B. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 13, p. 2932–2942, out. 2008.

LI, M. W. M. et al. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 11, p. 2302–2314, nov. 2009.

LI, M. W. M. et al. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 17998–18003, 19 out. 2010.

LIAO, C.; KANNAN, K. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4655–4662, 15 maio 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUBAHN, D. B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11162–11166, 1 dez. 1993.

LYON, K. et al. Ca<sup>2+</sup> signaling machinery is present at intercellular junctions and structures associated with junction turnover in rat Sertoli cells†. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1288–1302, jun. 2017.

MA, R.; KUDLACEK, P. E.; SANSOM, S. C. Protein kinase Calpha participates in activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in human glomerular mesangial cells. **AJP: Cell Physiology**, v. 283, n. 5, p. C1390–C1398, 1 nov. 2002.

MALKOV, M.; FISHER, Y.; DON, J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 1, p. 84–92, 1998.

MENEGAZ, D. et al. Role of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> on  $\alpha$ -[1-14C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids**, v. 74, n. 2, p. 264–269, fev. 2009.

MENEGAZ, D. et al. Vitamin D Receptor (VDR) Regulation of Voltage-Gated Chloride Channels by Ligands Preferring a VDR-Alternative Pocket (VDR-AP). **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 8, p. 1289–1300, ago. 2011.

MERKE, J. et al. Demonstration and Characterisation of a Testicular Receptor for 1, 25-Dihydroxycholecalciferol in the Rat. **European Journal of Biochemistry**, v. 130, n. 2, p. 303–308, 1983.

MILLER, W. L. Steroid hormone synthesis in mitochondria. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 379, n. 1–2, p. 62–73, out. 2013.

MIZWICKI, M. T.; NORMAN, A. W. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. **Science Signaling**, v. 2, n. 75, p. re4, 2009.

MOLINA-MOLINA, J.-M. et al. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 127–136, out. 2013.

MURUGESAN, P. et al. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 25, n. 4, p. 447–454, ago. 2008.

NANJAPPA, M. K.; SIMON, L.; AKINGBEMI, B. T. The Industrial Chemical Bisphenol A (BPA) Interferes with Proliferative Activity and Development of Steroidogenic Capacity in Rat Leydig Cells. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 5, p. 135–135, 3 maio 2012.

NEMERE, I. et al. Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23750–23756, 23 set. 1994.

NEMERE, I. et al. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 which mediates rapid activation of protein kinase C. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 9, p. 1353–1359, set. 1998.

NEMERE, I. et al. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3 membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7392–7397, 11 maio 2004.

NORMAN, A. W. et al. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2-vitamin D 3. **Steroids**, v. 67, n. 6, p. 457–466, 2002.

NORMAN, A. W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5542–5548, dez. 2006.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 491S–499S, 2008.

NORMAN, A. W.; ISHIZUKA, S.; OKAMURA, W. H. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 76, n. 1, p. 49–59, 2001.

NORMAN, A. W.; MIZWICKI, M. T.; NORMAN, D. P. G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 27–41, jan. 2004.

NOTHNICK, W. B. The emerging use of aromatase inhibitors for endometriosis treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 87, 2011.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 3, p. 289–318, 2001.

OMDAHL, J. L. et al. Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. **Nature: New Biology**, v. 237, n. 71, p. 63–64, 10 maio 1972.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–970, dez. 2004.

PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. **The Leydig cell in health and disease**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007.

PETERSEN, C.; SODER, O. The sertoli cell--a hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. **Hormone Research**, v. 66, n. 4, p. 153–161, 2006.

PIKULEVA, I. A. CHOLESTEROL-METABOLIZING CYTOCHROMES P450. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 4, p. 513–520, 24 jan. 2006.

PINO, A. M. et al. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. **The Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 3, p. 715–725, dez. 2006.

POSNACK, N. G. et al. Physiological response of cardiac tissue to bisphenol A: alterations in ventricular pressure and contractility. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 2, p. H267-275, 15 jul. 2015.

PRAKRIYA, M.; LEWIS, R. S. Store-Operated Calcium Channels. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1383–1436, out. 2015.

PROSSNITZ, E. R.; MAGGIOLINI, M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 308, n. 1–2, p. 32–38, set. 2009.

PUBLICOVER, S.; HARPER, C. V.; BARRATT, C. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in sperm — making the most of what you’ve got. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 235–242, mar. 2007.

QIAN, W. et al. The toxic effects of Bisphenol A on the mouse spermatocyte GC-2 cell line: the role of the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II axis. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 35, n. 11, p. 1271–1277, nov. 2015.

QIAN, Y. M.; SONG, W. C. Regulation of estrogen sulfotransferase expression in Leydig cells by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and androgen. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1048–1053, mar. 1999.

RATO, L. et al. Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 2, p. 215–224, jul. 2010.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–338, 1 maio 2012.

RENSHAN, G.; HARDY, M. P. Regulation of Leydig Cells During Pubertal Development. In: **The Leydig cell in health and disease**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007. p. 55–70.

REZG, R. et al. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environment International**, v. 64, p. 83–90, mar. 2014.

RIU, A. et al. Characterization of Novel Ligands of ER $\alpha$ , Er $\beta$ , and PPAR $\gamma$ : The Case of Halogenated Bisphenol A and Their Conjugated Metabolites. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 372–382, ago. 2011a.

RIU, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is a target for halogenated analogs of bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 9, p. 1227–1232, set. 2011b.

- RIZZUTO, R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 566–578, 1 ago. 2012.
- ROBERTSON, K. M. et al. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7986–7991, 1999.
- ROBERTSON, K. M. et al. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 2913–2921, 2002.
- ROSENBAUM, T.; SIMON, S. A. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In: LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. (Eds.). **TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades**. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- ROSSI, G. et al. Follicle-Stimulating Hormone Activates Fatty Acid Amide Hydrolase by Protein Kinase A and Aromatase-Dependent Pathways in Mouse Primary Sertoli Cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 1431–1439, mar. 2007.
- ROSSO, A. et al.  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 146–154, jan. 2012.
- RUWANPURA, S. M.; MCLACHLAN, R. I.; MEACHEM, S. J. Hormonal regulation of male germ cell development. **The Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 2, p. 117–131, maio 2010.
- SAEZ, J. M. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 5, p. 574–626, out. 1994.
- SAKAKI, T. et al. Dual metabolic pathway of 25-hydroxyvitamin D3 catalyzed by human CYP24. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 20, p. 6158–6165, out. 2000.
- SALEH, S. N. et al. Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes: PKC-activated TRPC channels. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 10, p. 2463–2476, 15 maio 2008.
- SALIAN, S.; DOSHI, T.; VANAGE, G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. **Toxicology**, v. 265, n. 1–2, p. 56–67, nov. 2009.
- SCHUMACHER, M. et al. Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. **FEBS letters**, v. 91, n. 2, p. 333–338, 15 jul. 1978.
- 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.

SHATTOCK, M. J. et al.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the heart:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the heart. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 6, p. 1361–1382, 15 mar. 2015.

SHENG, Z.-G. et al. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 88–94, fev. 2013.

SHENG, Z.-G.; ZHU, B.-Z. Low Concentrations of Bisphenol A Induce Mouse Spermatogonial Cell Proliferation by G Protein–Coupled Receptor 30 and Estrogen Receptor- $\alpha$ . **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 12, p. 1775–1780, 3 ago. 2011.

SHETTY, G. et al. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). **Steroids**, v. 63, n. 7–8, p. 414–420, ago. 1998.

SHETTY, G. et al. Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3385–3396, set. 2002.

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

SKINNER, M. K. Sertoli Cell Secreted Regulatory Factors. In: **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Elsevier Science, 2005. p. 107–120.

SORIANO, S. et al. Rapid Insulinotropic Action of Low Doses of Bisphenol-A on Mouse and Human Islets of Langerhans: Role of Estrogen Receptor  $\beta$ . **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31109, 8 fev. 2012.

STAN, R.-V. Structure and function of endothelial caveolae. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 5, p. 350–364, 1 jun. 2002.

STRAUSS, L. et al. Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2865–2872, jun. 2009.

SUN, W. et al. Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 1, p. E51–E62, 1 jan. 2015.

TANABE, N.; KIMOTO, T.; KAWATO, S. Rapid  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by Bisphenol A in cultured rat hippocampal neurons. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 27, n. 1–2, p. 97–104, abr. 2006.

TANAKA, S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1860–1869, maio 1996.

- TANAKA, Y.; DELUCA, H. F. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 154, n. 2, p. 566–574, fev. 1973.
- 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, fev. 2005.
- TOMINAGA, M.; WADA, M.; MASU, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 12, p. 6951–6956, 5 jun. 2001.
- TOPPARI, J. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental health perspectives**, v. 104, n. Suppl 4, p. 741, 1996.
- TRAN, Q.-K. et al. Hetero-oligomeric Complex between the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 and the Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 21, p. 13293–13307, 22 maio 2015.
- TREZÍSE, A. E. O.; BUCHWALD, M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Nature**, v. 353, n. 6343, p. 434–437, out. 1991.
- TSIEN, R. W.; ELLINOR, P. T.; HORNE, W. A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 9, p. 349–354, set. 1991.
- TURNER, J.-E.; SEDEJ, S.; RUPNIK, M. Cytosolic Cl<sup>-</sup> ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices: Cl<sup>-</sup> and secretion in pituitary tissue slices. **The Journal of Physiology**, v. 566, n. 2, p. 443–453, jul. 2005.
- UMETANI, M. et al. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1185–1192, out. 2007.
- URRIOLA-MUÑOZ, P.; LAGOS-CABRÉ, R.; MORENO, R. D. A Mechanism of Male Germ Cell Apoptosis Induced by Bisphenol-A and Nonylphenol Involving ADAM17 and p38 MAPK Activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113793, 4 dez. 2014.
- VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 139–177, ago. 2007.
- VANDENBERG, L. N. et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. **Ciencia & saude coletiva**, v. 17, n. 2, p. 407–434, 2012.
- VAY, L.; GU, C.; MCNAUGHTON, P. A. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications: The thermo-TRP ion channel family. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 787–801, fev. 2012.
- VELLANI, V. et al. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. **The Journal of Physiology**, v. 534, n. Pt 3, p. 813–825, 1 ago. 2001.



- VILELA, J. et al. Sperm impairments in adult vesper mice ( *Calomys laucha* ) caused by in utero exposure to bisphenol A. **Andrologia**, v. 46, n. 9, p. 971–978, nov. 2014.
- VOGL, A. W. et al. The endoplasmic reticulum, calcium signaling and junction turnover in Sertoli cells. **Reproduction**, p. REP-17-0281, 24 out. 2017.
- WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 16, n. 3, p. 278–286, maio 2009.
- WANG, C. et al. Mitochondrial Dysfunction and Ca<sup>2+</sup> Overload in Injured Sertoli Cells Exposed to Bisphenol A: mitochondrial dysfunction and Ca<sup>2+</sup> overload. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 823–831, mar. 2017.
- WANG, Q. et al. [Effects of bisphenol A on voltage-dependent T-type calcium channels in mouse testis and epididymis, and the role of estrogen receptors]. **Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research**, v. 44, n. 1, p. 23–27, jan. 2015a.
- WANG, W. et al. Bisphenol A modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in rat dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 5, p. 391–397, maio 2013.
- WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 1 jul. 2012.
- WANG, Z.-Y. et al. Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 11, p. 14355–14364, 2015b.
- WATSON, C. S.; JENG, Y.-J.; GUPTARAK, J. Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1–2, p. 44–50, out. 2011.
- WISNIEWSKI, P. et al. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. **Toxicology**, v. 329, p. 1–9, mar. 2015.
- WOESTE, M. et al. Structural requirements for inhibitory effects of bisphenols on the activity of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3927–3933, jul. 2013.
- XI, W. et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus–pituitary–gonadal axis of CD-1 mice. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 409–417, maio 2011.
- YAGUE, J. G.; GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I. Selective transcriptional regulation of aromatase gene by vitamin D, dexamethasone, and mifepristone in human glioma cells. **Endocrine**, v. 35, n. 2, p. 252–261, abr. 2009.
- YAN, S. et al. Bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e25455, 2011.

YE, L. et al. Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 2, p. 137–142, nov. 2011.

ZALKO, D. et al. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 424–430, jan. 2011.

ZAMONER, A. et al. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 77, n. 26, p. 3321–3335, nov. 2005.

ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 1, p. 98–103, jan. 2007a.

ZAMONER, A. et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 267, n. 1–2, p. 116–126, 15 mar. 2007b.

ZANATTA, A. P. et al. Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77176, 10 out. 2013.

ZANATTA, A. P. **Função dos hormônios tireoideos e da 1,25(OH) $_2$  vitamina D3 em células testiculares de ratos imaturos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

ZANATTA, A. P. et al. Interactions between oestrogen and  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions. **Basic and Clinical Andrology**, v. 27, n. 1, dez. 2017.

ZANATTA, L. et al. Regulation of aromatase expression by  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 in rat testicular cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 5, p. 725, 2011a.

ZANATTA, L. et al. Nongenomic and genomic effects of  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 in rat testis. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 515–523, out. 2011b.

ZANATTA, L. et al. Effect of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, n. 1–2, p. 46–53, nov. 2011c.

ZANATTA, L. et al.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 Signaling Pathways on Calcium Uptake in 30-Day-Old Rat Sertoli Cells. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10284–10292, 29 nov. 2011d.

ZANELLO, L. P.; NORMAN, A. W. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1589–1594, 10 fev. 2004.

ZEHNDER, D. et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 2, p. 888–894, fev. 2001.

ZHANG, H. et al. Impact of the CFTR chloride channel on the cytoskeleton of mouse Sertoli cells. **Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 110–115, fev. 2016.

ZHANG, R.; PESSAH, I. N. Divergent Mechanisms Leading to Signaling Dysfunction in Embryonic Muscle by Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A. **Molecular Pharmacology**, v. 91, n. 4, p. 428–436, abr. 2017.

ZHAO, X. et al. Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells: Rat PDIA3. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 59–63, fev. 2013.

ZHU, J. G. et al. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p. 15650–15655, 24 set. 2013.

**APÊNDICE A – Manuscrito artigo 1**

**Title: 17 $\beta$ -estradiol and Bisphenol A exposure *in vivo* alter the expression of genes involved in 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> signaling in rat testes**

Article to be submitted to: The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (ISSN: 0960-0760) (submission scheduled to january 2018)

Authors: Renata Gonçalves<sup>1,2,3,4</sup>, Vanessa Brouard<sup>2,3,4</sup>, Christelle Delalande-Lecapitaine<sup>2,3,4</sup>, Fátima Regina Mena Barreto Silva<sup>1</sup>, Hélène Bouraïma-Lelong<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina, Brazil;*

<sup>2</sup>*Normandie Univ, France;*

<sup>3</sup>*UNICAEN, Laboratoire Estrogènes, Reproduction, Cancer, CAEN cedex 5, France;*

<sup>4</sup>*INRA USC 2006, CAEN cedex 5, France.*

\*Corresponding author: Dr. Hélène Bouraïma-Lelong, UNICAEN, EA2608, OeReCa, CS14032, F-14032 Caen, France. E-mail address: [helene.bouraima@unicaen.fr](mailto:helene.bouraima@unicaen.fr)

**Abstract**

There is increasing evidence in the literature of a relation between 1,25-D<sub>3</sub> and estrogens signaling pathways on reproductive function. To study this interaction, the expression of the vitamin D metabolizing enzyme 25-hydroxylase (CYP27A1) and vitamin D receptors (VDR and PDIA3) was verified in rat testis treated in vivo with E2 and/or BPA. Rats were exposed to E2 (20µg/kg bw/day of E2) and/or BPA (50µg/kg bw/day of BPA) for different periods (15 to 30 dpp and 60 to 75 dpp) and gene and protein expression was analyzed in the testis. When rats were treated from 15 to 30 dpp, E2 and BPA decreased VDR gene expression while CYP27A1 gene expression was affected only by E2. Another group of rats was also treated from 15 to 30 dpp but was kept alive until 75 dpp where the analyses were made. In this group, E2 increased all genes and proteins studied in contrast with the results from the 30-day-old rat testis, which could indicate a compensatory effect. In a third group the treatments were administered from 60 to 75 dpp, where the compounds had no effect on gene and protein expression. With these results we can conclude that indeed there might be a crosstalk between the actions of these two steroid hormones. These results reinforce the theory that there is an interaction between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signaling pathways.

**Keywords**

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 17 $\beta$ -estradiol, bisphenol A, 25-hydroxylase, VDR, PDIA3, testis

## 1. Introduction

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>), the active form of vitamin D<sub>3</sub>, is synthesized endogenously through the exposition of the skin to UV-B rays, which induce the photolytic conversion of 7-dehydrocholesterol into cholecalciferol, followed by two successive enzymatic hydroxylations to produce the fully activated vitamin D<sub>3</sub> (Mizwicki and Norman, 2009; Norman, 2008). CYP2R1 appears to be the main enzyme responsible for the 25 hydroxylation and is mainly expressed in the liver and testes (Boisen et al., 2017), but this step could also be catalyzed by some other enzymes like CYP27A1 (Prosser and Jones, 2004). The resultant 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is then 1 $\alpha$ -hydroxylated in the kidney by 1 $\alpha$ -hydroxylase enzyme (coded by CYP27B1 gene) to produce the active form 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Mizwicki and Norman, 2009; Norman, 2008) which could bind with a high affinity the nuclear receptor VDR and activates it. The inactivation of vitamin is catalyzed by the CYP24A1 enzyme which metabolizes 1,25-D<sub>3</sub> through 24-hydroxylation. Most of 1,25-D<sub>3</sub> known actions are mediated through the vitamin D receptor VDR and the membrane receptor PDIA3 (protein disulfide isomerase family A), resulting in genomic and non-genomic (rapid response) actions (Boyan et al., 2012; Nemere et al., 1998, 2015; Norman, 2006). Both receptors and metabolizing enzymes are expressed in the human testis, epididymis, seminal vesicle, prostate and spermatozoa (Boisen et al., 2017). The VDR and metabolizing enzymes are predominantly expressed in the developing germ cells in adult and spermatozoa (Blomberg-Jensen *et al.*, 2010; Aquila *et al.*, 2008) but also in Leydig cells (Hofer *et al.*, 2014) and the expression in Sertoli cells is relative to an immature status in human (Blomberg-Jensen *et al.*, 2010) and in rats (Zanatta *et al.*, 2010). Moreover, vitamin D deficient male rats present a significantly decrease in successful mating and fertility rates (Kwiecinski et al., 1989) and VDR null mutant mice showed decreased sperm count and motility (Kinuta et al., 2000).

It is now well established that a regulated estrogen synthesis occurs in mammalian testes and contributes to testicular physiology (Carreau and Hess, 2010; Dostalova et al., 2017; Jayle et al., 1962; O'donnell et al., 2001). E2 is synthesized irreversibly from testosterone by aromatase enzyme, acting through the classic nuclear estrogen receptors (ERs) ESR1 and ESR2 and the seven transmembrane receptor GPER (G protein-coupled estrogen receptor) (O'donnell et al., 2001; Prossnitz and Maggiolini, 2009). As 1,25D<sub>3</sub>, the estrogen receptors have been localized in testes, both ESR1 and ESR2 can be found in Leydig, Sertoli and germ cells, in human and rodents species (for review, (Zanatta et al.,

2017). Several studies converge to assume that estradiol and 1,25D<sub>3</sub> signaling pathways could interact (for review (Zanatta et al., 2017). The Leuven VDR<sup>-/-</sup> mouse model showed perturbations of estradiol signaling pathway (Blomberg Jensen et al., 2013). Another VDR knockout mice presented a reduced expression and activity of aromatase, between other anomalies in the reproductive tract. LH and FSH plasmatic levels were also elevated in these animals (Kinuta et al., 2000). Estrogen supplementation was able to reverse these effects almost completely. 1 $\alpha$ -hydroxylase KO model resulting in decreased calcium and phosphorus plasmatic levels showed altered E2 plasmatic levels, which can be restored by supplementation with calcium and phosphorus (Sun et al., 2015). Although these models showed some contrasting results, it is clear that there is a connection between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signaling pathways. 1,25-D<sub>3</sub> modulation of aromatase activity is also shown in other tissues, such as osteoblasts (Tanaka et al., 1996), glioma cells (Yague et al., 2009) and mesenchymal stem cells (Pino et al., 2006). In the male reproductive system, 1,25-D<sub>3</sub> was able to increase aromatase expression in testicular cells (Zanatta et al., 2011a) and decrease ESR1 and ESR2 gene expression in seminiferous tubules (Zanatta et al., unpublished data).

The aim of this study was to investigate E2 and BPA effects *in vivo* in the expression of some 1,25-D<sub>3</sub> signaling key points. As E2, bisphenol A (BPA), a chemical compound used in plastic industry, can bind to ERs and induce estrogenic actions even at low doses, so considered a xenoestrogen (Bouskine et al., 2009; Fenichel et al., 2013; Gaido et al., 1997). It was already shown that E2 and BPA exposure in prepubertal rats altered blood-testis barrier (BTB) establishment and induced histological abnormalities in the testis (Brouard et al., 2016). Using the same treatment protocol, we analyzed E2 and BPA effects in the expression of important points of 1,25-D<sub>3</sub> signaling, such as the expression of receptors (VDR and PDIA3) and 25-hydroxylase enzyme, in prepubertal and adult rats. This analysis was performed immediately after treatment or in delayed time.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Chemicals and reagents*

Bisphenol A, 17 $\beta$ -estradiol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), NaCl, protease inhibitor cocktail, reagents of RIPA buffer, TRI Reagent and Tween-20 were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Deoxyribose nucleotide triphosphate (dNTP), Ribonuclease inhibitor (RNasin), Random primers, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), GoTaqPCR Master Mix and ECL were purchased from Promega (Madison,

USA). Primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Nitrocellulose membranes were purchased from GE Healthcare (Vélizy-Villacoublay, France). Primary and secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech (Dallas, USA) and the actin B antibody (C4) was purchased from Millipore (Billerica, USA).

## 2.2 Animals

Fifteen and sixty-day-old male Sprague-Dawley rats were obtained from the University Center of Biological Experimental Resources (CURB, Caen, France). All experimental procedures were approved by the French Ministry of Agriculture and the regional committee of ethics on animal experimentation (CENOMEXA1112 -10). Animals were housed at 21°C under a 12h light/12h dark cycle in polypropylene cages. The rats were fed *ad libitum* with a low phytoestrogen food (SDS-Dietex©) from the weaning (21 dpp) until the end of the experiment.

## 2.3 Experimental design

The treatments were performed at the CURB and were carried as demonstrated in Scheme 1 (Brouard et al., 2016). BPA and E2 were dissolved in DMSO; all animals were exposed to the same level of DMSO (0.7%). The animals were weighted each day and received their treatment by subcutaneous injections. Three treatment protocols (TP) with different treatment periods were made, and for each experience four groups of 8 rats were randomized (figure 1): control group (DMSO), BPA group (50 µg/kg bw/day of BPA), E2 group (20 µg/kg bw/day of 17β-estradiol) and BPA+E2 group (50 µg/kg bw/day of BPA and 20 µg/kg bw/day of 17β-estradiol). In TP1, the animals received the treatments from 15 to 30 days-old, and were euthanized at day 30. In TP2, the treatment was administered from 15 to 30 days-old, and the animals were euthanized at day 75. In TP3, the treatment took place from 60 to 75 days-old, where the animals were euthanized. At the last day of treatment, the animals received their last injection and on the following day were anesthetized by inhalation of 4% isofluran in 30% O<sub>2</sub>/70% N<sub>2</sub>O gas mixture. Testes were removed immediately and frozen for RNA and protein extraction.

## 2.4 RNA extraction and real-time RT-PCR

Total testis RNA was extracted using TRI Reagent solution according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA samples was determined by absorbance at 260 nm, RNA integrity was confirmed by gel migration and RNA quality was verified by measuring



optical density at 260 and 280 nm. Reverse transcription was realized for 90 min at 37 °C with 250 ng of total RNA, 100 IU MMLV-RT, 12 IU RNasin, 100 ng random primers and 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dNTP in a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . The negative control was realized by adding water instead of RNA. The polymerase chain reaction was performed on 5  $\mu\text{L}$  of diluted cDNA (1:10) using the GoTaq® qPCR Master Mix and 0.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of each primer. The negative control was realized by adding water instead of cDNA. PCR was carried out in Stratagene Mx3005 P system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) as follows: an initial step of 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. At the end of the amplification, an increase in 0.5 °C every 10 s from 50 °C to 95 °C allowed to obtain the melt curve. PCR efficiency was determined for each set of primers (Table 1) and was contained between 87% and 110%. The PCR product identity was confirmed by sequencing (Beckman Coulter, Pasadena, USA). Relative levels of specific mRNA were obtained with the formula  $2^{-(C_{\text{tref}} - C_{\text{tgene}})}$  with L19 gene expression as reference.

### *2.5 Protein extraction and Western blotting*

Total testicular proteins were extracted from a cryopreserved testis piece with RIPA buffer (50  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris, 150  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl, 5  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA, 1% Triton and 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1:100). After crushing the tissue, the testis lysates were centrifuged at 4500 g during 10 min at 4 °C. Protein concentration was determined by Bradford method at 595 nm. Thirty micrograms of protein were resolved on 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were washed with TBS (200  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-Base, 1.6  $\text{mol L}^{-1}$  NaCl), blocked with 5% dry milk then washed with TBS-0.1% Tween-20 (TBST) and incubated with primary antibodies (CYP27A1 (K16), VDR (4H312) and PDIA3/ERp57 (sc-23886), actin B (C4)) diluted at 1:1000 (CYP27A1, PDIA3/ERp57) and 1:5000 (VDR) in TBST containing 5% dry milk at 4 °C overnight. Then, the membranes were washed with TBST, incubated with the appropriated secondary antibody coupled with horseradish peroxidase diluted at 1:2000 and finally developed with ECL (Promega). The protein signal was quantified by densitometry and normalized to actin B protein signal with ImageJ® software.

## **3. Results**

*Immediate E2 and BPA in vivo treatment effects on VDR, PDIA3 and CYP27A1 gene and protein expression in prepubertal rat testis (TP1).*

To study E<sub>2</sub> and BPA influence on 1,25-D<sub>3</sub> signalling, VDR and PDIA3 receptors and 25-hydroxylase enzyme expression (CYP27A1) were analysed in prepubertal rats treated *in vivo* with E<sub>2</sub> and/or BPA (TP1). As shown in figure 2, E<sub>2</sub> treatment decreased significantly CYP27A1 ( $p < 0.05$ ) and VDR ( $p < 0.01$ ) gene expression and has no impact on PDIA3 expression. BPA treatment decreased significantly only CYP27A1 gene expression ( $p < 0.01$ ). BPA+E<sub>2</sub> treatment did not alter the expression of any of the studied genes. When E<sub>2</sub> was used combined with BPA treatment, the E<sub>2</sub> effect on VDR gene expression was abolished. When protein expression levels were analysed through Western Blot, E<sub>2</sub> treatment was not able to modify VDR protein expression. On the contrary of effect observed on mRNA level, BPA treatment was able to increase VDR protein expression (figure 3). The expression of CYP2R1 and CYP27B1 was also analysed, but mRNA levels of these genes were too low to be quantified in our samples.

*E<sub>2</sub> and BPA in vivo prepubertal treatment effects on VDR, PDIA3 and CYP27A1 gene and protein expression in adult rat testis (TP2).*

To analyse if E<sub>2</sub> and BPA in prepubertal treatment effects are reversible, prepubertal treated rats were kept without continued treatment, in normal conditions, until adulthood (75 day-old) where the animals were euthanized (TP2). Unlike the first protocol, E<sub>2</sub> treated group showed a significant increase in all studied genes (VDR ( $p < 0.01$ ), PDIA3 ( $p < 0.05$ ) and CYP27A1 ( $p < 0.05$ )), while other groups (BPA and E<sub>2</sub> + BPA) did not present any significant effect in gene expression (figure 4). VDR protein expression was analysed in the E<sub>2</sub> group, and results show a tendency to increase VDR protein expression ( $p = 0,0567$ ). E<sub>2</sub> was also able to increase CYP27A1 protein expression (figure 5).

*E<sub>2</sub> and BPA in vivo adult treatment effects on VDR, PDIA3 and CYP27A1 gene and protein expression in adult rat testis (TP3).*

E<sub>2</sub> and BPA treatments were also performed in adult rats. So, in order to verify if exposure to E<sub>2</sub> and BPA are also capable of altering 1,25-D<sub>3</sub> signalling the *in vivo* treatments were performed (TP3). These treatments, when carried out in adult rats, showed that neither E<sub>2</sub> and BPA had effect in the expression of the genes studied (figure 6). In opposite to other group, the combination of E<sub>2</sub> and BPA increased significantly ( $p < 0.05$ ) the PDIA3 mRNA level, although this effect was not observed when CYP27A1 protein expression was analysed (figure 7).

#### 4. Discussion

Data concerning the interaction between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signaling pathways in male reproduction is already present in the literature (Jensen, 2014; Zanatta et al., 2017) though it is not clear how both hormones interact. It was reported that 1,25-D<sub>3</sub> can modulate aromatase expression in Sertoli cells (Zanatta et al., 2011a) and VDRKO mice exhibit impaired expression of the same enzyme (Kinuta et al., 2000). Furthermore, these VDRKO mice show diminished spermatozoa count and mobility, as well as high LH, FSH and E2 serum levels. Estrogen supplementation protected these animals from testicular impairment and hormonal variation, with values similar to the control group. VDRKO animal models also have similar characteristics with ESR1KO models related to fertility (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997).

This work shows effects of E2 and BPA in vivo exposure in some points of 1,25-D<sub>3</sub> signaling pathways, such as the 1,25-D<sub>3</sub> receptors and the metabolizing enzyme 25-hydroxylase (CYP27A1). The experimental model used was the same as the animal model described by Brouard et al. (Brouard et al., 2016). Low doses of E2 and BPA were chosen for the study. The E2 dose has a deleterious effect on adult spermatogenesis (D'Souza et al., 2005) and the BPA dose represents a 100 x inferior dose to the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of 5 mg/kg/day in Europe in 2007 (European Food Safety Authority (EFSA), 2007), although the Tolerable Daily Intake (TDI) was altered to 4 µg/kg/day in 2015 (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015). A fourth group where both compounds were administered was also analyzed to study possible synergistic or antagonistic effects between E2 and BPA. Analyses immediately after exposition at prepubertal and adult stages were performed and a different analysis with exposition at prepubertal stage and analysis at the adult stage was added.

In TP1, VDR mRNA and protein levels did not show the same pattern. VDR gene expression was decreased in E2 group while VDR protein expression levels in the same group were similar to control. The difference between gene and protein expression could be related to post-transcriptional modifications in testicular cells. In most somatic cells mRNA transcription and translation are deeply connected, making mRNA detection a strong indicator of protein expression. Meanwhile, testicular cells strongly depend on post-transcriptional regulation mechanisms (Iguchi et al., 2006). Moreover a delay could be observed between translation and transcription (Calvel et al., 2010). When the analysis was performed at 30 dpp, the seminiferous tubules present a homogenous status with germ cells engaged in meiosis with the most differentiate status characterized by first elongated spermatids. The opposite effect observed between *vdr* mRNA and protein could be explained

by this delay between transcription and translation. At 30 dpp, the study of mRNA level could reveal the mechanism occurring at the immediately concerning gene regulation whereas, study of protein level could reveal the situation occurring a few days ago. Another explanation could be the existence of a post-translational regulatory mechanism. E2 and BPA treatment also decreased CYP27A1 expression. This observation could indicate that both compounds may inhibit 1,25-D<sub>3</sub> synthesis, just like 1,25-D<sub>3</sub> shows effects in aromatase and ERs expression. On the other side, the enzyme coded by CYP27A1 also participates in cholesterol and bile acid intermediates metabolism (Pikuleva, 2006). This enzyme is capable of converting cholesterol to 27-hydroxycholesterol, and the enzyme deficiency leads to cerebro tendinous xanthomatosis, a disorder characterized by cholesterol deposition in several tissues (Cali et al., 1991). 27-hydroxycholesterol is considered a selective modulator of ERs (SERM – selective estrogen receptor modulator), interacting with both ERs, ESR1 and ESR2 as an agonist (DuSell et al., 2008) or antagonist (Umetani et al., 2007) depending on the tissue. E2 and BPA effects in this enzyme could also indicate a negative feedback mechanism considering 27-hydroxycholesterol effects as a SERM, but no data were found in the literature concerning its actions in the testis.

In TP2, E2 and BPA treatment was carried out in prepubertal age and the effects of this treatment were analyzed in adult age. E2 treatment raised the expression of all studied genes. This effect is contrary to what was observed in TP1, where gene expression was analyzed in prepubertal age. It is possible that this effect is the result of a compensation mechanism by the inhibitory effect of E2, since in this protocol there was a interval of 45 days from the end of the treatment to the tissue removal for analysis. In TP3 the only treatment that showed any effect was when both compounds (E2 and BPA) were used simultaneously, which increased PDIA3 gene expression, an effect that was not observed when PDIA3 protein expression was analysed.

Comparing the results from the three treatment protocols we can conclude that E2 and BPA treatment caused more alterations when administered at prepubertal age, while animals treated at adult age did not show any alterations in the expression of the studied genes. Prepubertal period, between 15 and 30 days in rats, is extremely important for sexual development, since BTB establishment and Sertoli cell differentiation occur at this period, along with the initiation of the first spermatogenic wave. Sertoli cells are responsible for energetic and nutritional support of developing germ cells. Without this support differentiation, meiosis and spermiogenesis would not occur (Rato et al., 2012; Sharpe et al., 2003). The BTB is formed by intercellular junctions between Sertoli cells, creating a specific

environment necessary for germ cell growth and differentiation (Petersen and Soder, 2006). This barrier controls the passage of molecules from basal to adluminal compartment, protecting germ cells. Therefore this age appears to be more susceptible to adverse effects from exposure to exogenous compounds.

In conclusion, it was shown in this study that E2 treatment was able to alter the gene expression of 1,25-D<sub>3</sub> receptor, VDR, and metabolizing enzyme 25-hydroxylase, CYP27A1, so we can conclude that indeed there might be a crosstalk between the actions of these two steroid hormones. These results reinforce the theory that there is an interaction between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signaling pathways.

## 5. References

- Aquila S, Guido C, Perrotta I, Tripepi S, Nastro A, Andò S. 2008. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and its possible role in the human male gamete: VDR and human sperm, S. Aquila et al. *Journal of Anatomy* 213(5): 555–564. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00975.x.
- Blomberg Jensen M, Lieben L, Nielsen JE, Willems A, Jørgensen A, Juul A, Toppari J, Carmeliet G, Rajpert-De Meyts E. 2013. Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 377(1–2): 93–102. DOI: 10.1016/j.mce.2013.06.036.
- Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A, Leffers H. 2010. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Human Reproduction* 25(5): 1303–1311. DOI: 10.1093/humrep/deq024.
- Boisen IM, Bøllehuus Hansen L, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. 2017. Possible influence of vitamin D on male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 173: 215–222. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.09.023.
- Bouskine A, Nebout M, Brücker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. 2009. Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor. *Environmental Health Perspectives* 117(7): 1053–1058. DOI: 10.1289/ehp.0800367.
- Boyan BD, Chen J, Schwartz Z. 2012. Mechanism of Pdia3-dependent 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> signaling in musculoskeletal cells. *Steroids* 77(10): 892–896. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.04.018.
- Brouard V, Guénon I, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2016. Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment. *Reproductive Toxicology* 63: 49–61. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.05.003.

Cali JJ, Hsieh C-L, Francke U, Russell DW. 1991. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *Journal of Biological Chemistry* 266(12): 7779–7783.

Calvel P, Rolland AD, Jegou B, Pineau C. 2010. Testicular postgenomics: targeting the regulation of spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1546): 1481–1500. DOI: 10.1098/rstb.2009.0294.

Carreau S, Hess RA. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1546): 1517–1535. DOI: 10.1098/rstb.2009.0235.

Dostalova P, Zatecka E, Dvorakova-Hortova K. 2017. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* 18(5): 904. DOI: 10.3390/ijms18050904.

D'Souza R, Gill-Sharma MK, Pathak S, Kedia N, Kumar R, Balasinor N. 2005. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 241(1–2): 41–48. DOI: 10.1016/j.mce.2005.04.011.

DuSell CD, Umetani M, Shaul PW, Mangelsdorf DJ, McDonnell DP. 2008. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator. *Molecular Endocrinology* 22(1): 65–77. DOI: 10.1210/me.2007-0383.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137(11): 4796–4805. DOI: 10.1210/endo.137.11.8895349.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Opinion on BPA. *EFSA Journal* 13(1): 3978. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3978.

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE: Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYP. *EFSA Journal* 5(1): 428. DOI: 10.2903/j.efsa.2007.428.

Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. 2013. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Annales d'Endocrinologie* 74(3): 211–220. DOI: 10.1016/j.ando.2013.04.002.

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143(1): 205–212.

Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390(6659): 509–512. DOI: 10.1038/37352.

Hofer D, Münzker J, Schwetz V, Ulbing M, Hutz K, Stiegler P, Zigeuner R, Pieber TR, Müller H, Obermayer-Pietsch B. 2014. Testicular Synthesis and Vitamin D Action. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99(10): 3766–3773. DOI: 10.1210/jc.2014-1690.

Iguchi N, Tobias JW, Hecht NB. 2006. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up-and down-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(20): 7712–7717.

Jayle MF, Scholler R, Sfrikakis A, Heron M. 1962. [Excretion of phenol steroids and 17-ketosteroids after the administration of chorionic gonadotropins to men]. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 7: 212–220.

Jensen MB. 2014. Vitamin D and male reproduction. *Nature Reviews Endocrinology* 10(3): 175–186. DOI: 10.1038/nrendo.2013.262.

Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. 2000. Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads. *Endocrinology* 141(4): 1317–1324.

Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. 1989. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *The Journal of Nutrition* 119(5): 741–744.

Mizwicki MT, Norman AW. 2009. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Science Signaling* 2(75): re4. DOI: 10.1126/scisignal.275re4.

Nemere I, Garbi N, Winger Q. 2015. The 1,25D3-MARRS receptor/PDIA3/ERp57 and lifespan. *Journal of Cellular Biochemistry* 116(3): 380–385. DOI: 10.1002/jcb.24986.

Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. 1998. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> which mediates rapid activation of protein kinase C. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(9): 1353–1359. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.9.1353.

Norman AW. 2006. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147(12): 5542–5548. DOI: 10.1210/en.2006-0946.

Norman AW. 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition* 88(2): 491S–499S.

O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine reviews* 22(3): 289–318.

Petersen C, Soder O. 2006. The sertoli cell--a hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research* 66(4): 153–161. DOI: 10.1159/000094142.

Pikuleva IA. 2006. CHOLESTEROL-METABOLIZING CYTOCHROMES P450. *Drug Metabolism and Disposition* 34(4): 513–520. DOI: 10.1124/dmd.105.008789.

Pino AM, Rodríguez JM, Ríos S, Astudillo P, Leiva L, Seitz G, Fernández M, Rodríguez JP. 2006. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. *The Journal of Endocrinology* 191(3): 715–725. DOI: 10.1677/joe.1.07026.

Prosser D, Jones G. 2004. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in Biochemical Sciences* 29(12): 664–673. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.10.005.

Prossnitz ER, Maggiolini M. 2009. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology* 308(1–2): 32–38. DOI: 10.1016/j.mce.2009.03.026.

Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology* 9(6): 330–338. DOI: 10.1038/nrurol.2012.77.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6): 769–784.

Sun W, Chen L, Zhang W, Wang R, Goltzman D, Miao D. 2015. Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 308(1): E51–E62. DOI: 10.1152/ajpendo.00076.2014.

Tanaka S, Haji M, Takayanagi R, Tanaka S, Sugioka Y, Nawata H. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. *Endocrinology* 137(5): 1860–1869. DOI: 10.1210/endo.137.5.8612525.

Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ. 2007. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nature Medicine* 13(10): 1185–1192. DOI: 10.1038/nm1641.

Yague JG, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. 2009. Selective transcriptional regulation of aromatase gene by vitamin D, dexamethasone, and mifepristone in human glioma cells. *Endocrine* 35(2): 252–261. DOI: 10.1007/s12020-008-9134-2.

Zanatta AP, Brouard V, Gautier C, Goncalves R, Bouraïma-Lelong H, Mena Barreto Silva FR, Delalande C. 2017. Interactions between oestrogen and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions. *Basic and Clinical Andrology* 27(1). DOI: 10.1186/s12610-017-0053-z.

Zanatta L, Bouraïma-Lelong H, Delalande C, Silva FRMB, Carreau S. 2011a. Regulation of aromatase expression by 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in rat testicular cells. *Reproduction, Fertility and Development* 23(5): 725. DOI: 10.1071/RD10163.



Zanatta L, Zamoner A, Gonçalves R, Zanatta AP, Bouraïma-Lelong H, Carreau S, Silva FRMB. 2011b.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Signaling Pathways on Calcium Uptake in 30-Day-Old Rat Sertoli Cells. *Biochemistry* 50(47): 10284–10292. DOI: 10.1021/bi201113n.

## Tables

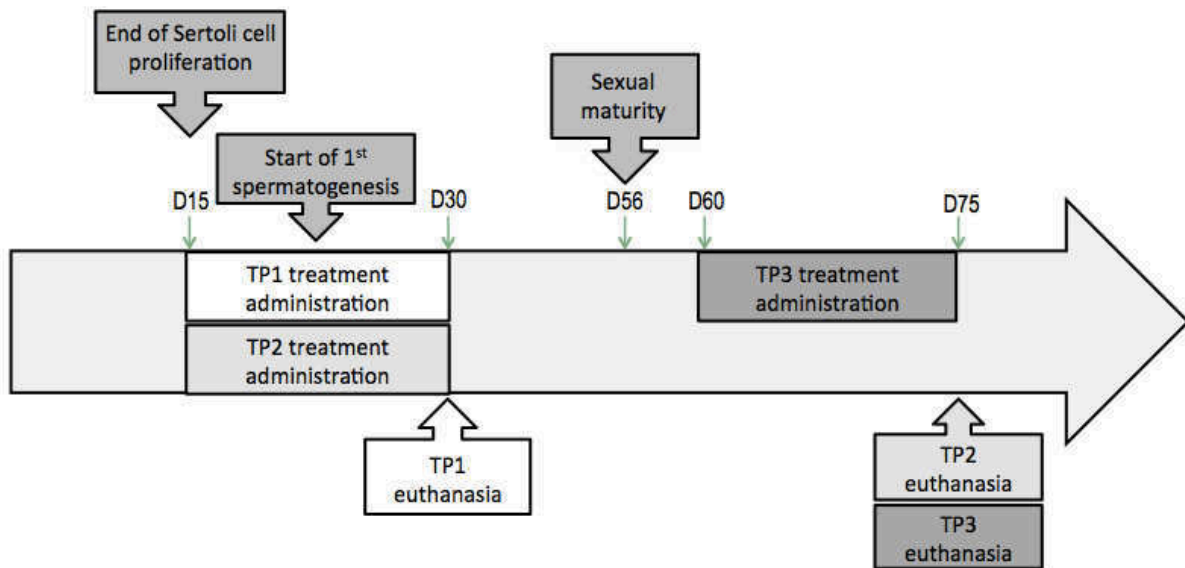
**Table 1:** *Primers used in real-time RT-PCR*

<b>Gene</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Size of amplified product (pb)</b>
<i>L19</i> <sup>A</sup> (NM_031103.1)	<b>F:</b> GGAATCTAAGAAGATTGACCGTC <b>R:</b> GCCTTGTCTGCCTTCAGTTT	120 pb
<i>VDR</i> <sup>B</sup> (NM_017058)	<b>F:</b> TGACCCACCTACGCTGACT <b>R:</b> CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT	79 pb
<i>PDIA3</i> <sup>A</sup> (NM_017319.1)	<b>F:</b> TAAAGATGCCTCGGTGGTGG <b>R:</b> ACGTTGGTGTGTGCAAATCG	114 PB
<i>Cyp2r1</i> <sup>A</sup> (NM_001108499.1)	<b>F:</b> CCCACGTCTACATGAGGAAGC <b>R:</b> CACCCACTCCCATTTTTGTCAT	92 pb
<i>Cyp27a1</i> <sup>A</sup> (NM_178847.3)	<b>F:</b> AACAGGTCAAGACCGACCGC <b>R:</b> CCGTACTTGGCCTTGTTTCAGC	141 pb
<i>Cyp27b1</i> <sup>A</sup> (NM_053763.1)	<b>F:</b> TACCCCTGCTAAAGGCTGTGA <b>R:</b> TGGCATAGTGACAGAGGGAAAC	144 pb

<sup>A</sup> Genbank sequences.

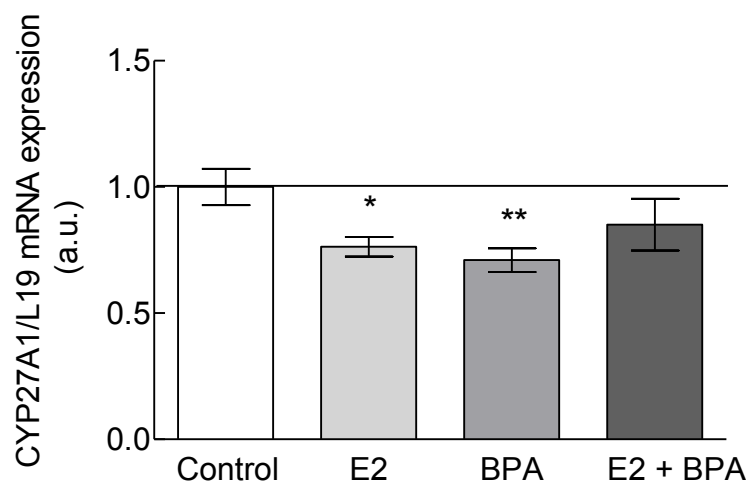
<sup>B</sup> Design based on Zanatta et al. (ZANATTA et al., 2011a).

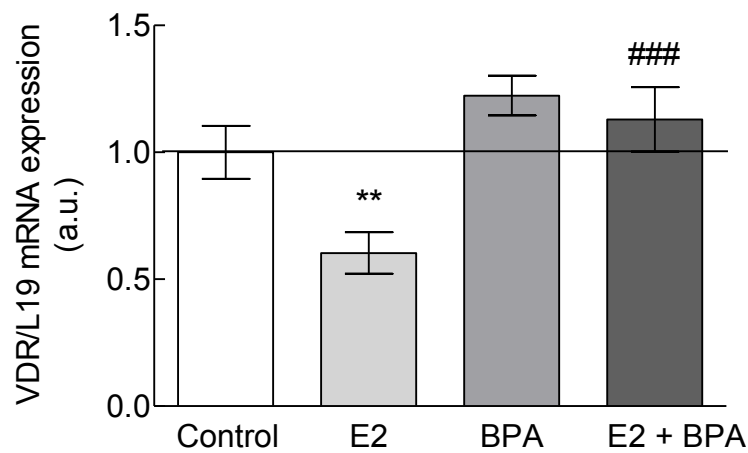
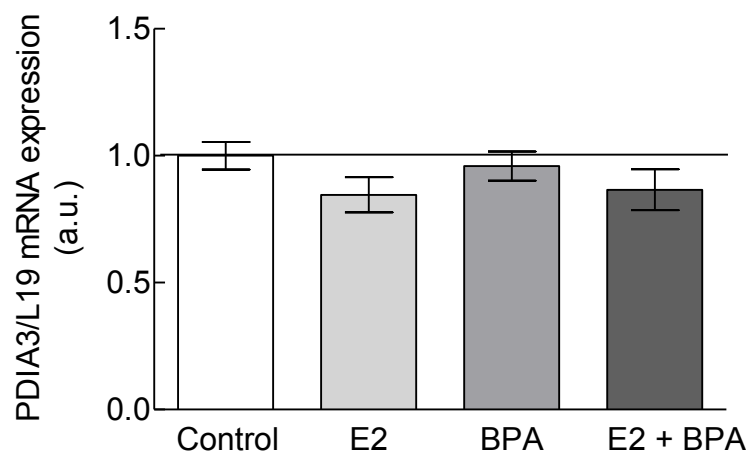
**Figures:**



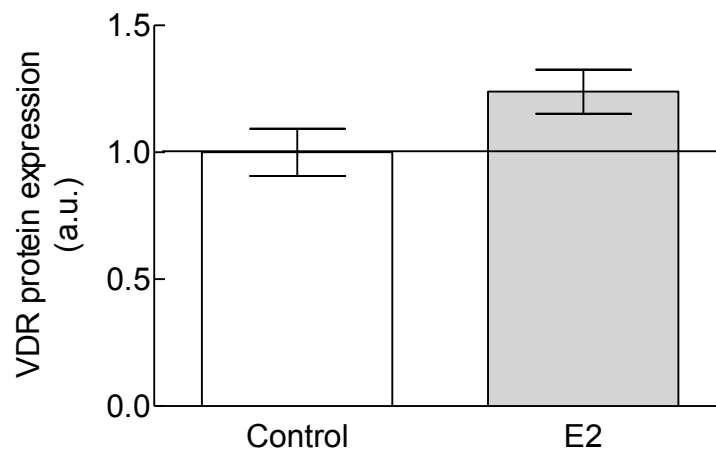
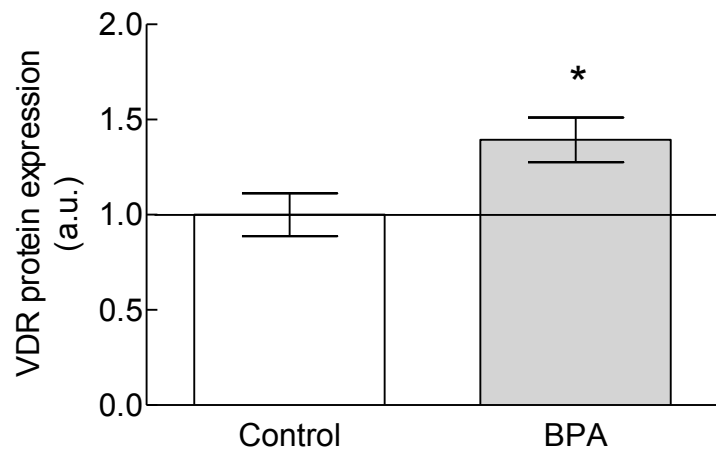
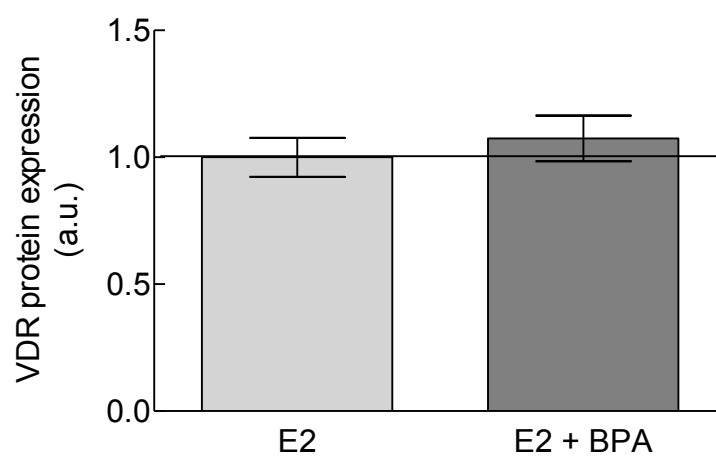
**Figure 1:** Experimental design. Three treatment protocols (TP) with different treatment periods were made, and for each experience four groups of 8 rats were randomized: control group (DMSO), BPA group (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day of BPA), E2 group (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day of 17 $\beta$ -estradiol) and BPA+E2 group (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day of BPA and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day of 17 $\beta$ -estradiol). In TP1, the animals received the treatments from 15 to 30 days-old, and were euthanized at day 30. In TP2, the treatment was administered from 15 to 30 days-old, and the animals were euthanized at day 75. In TP3, the treatment took place from 60 to 75 days-old, where the animals were euthanized.

(A)

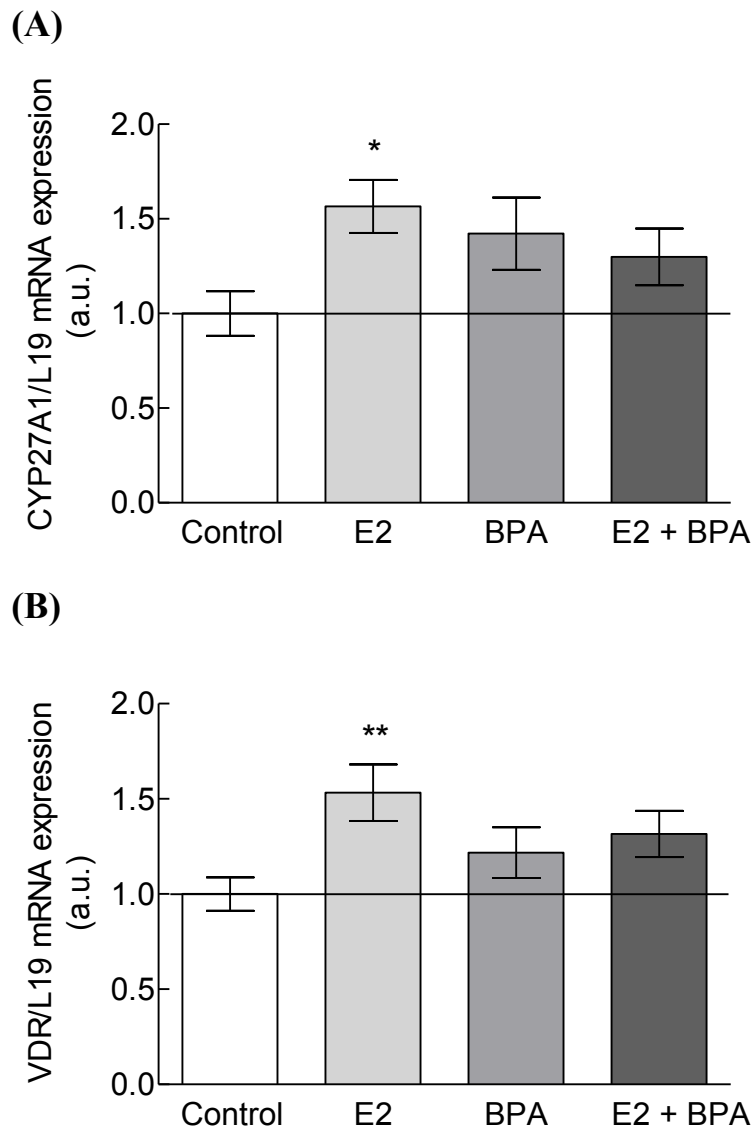


**(B)****(C)**

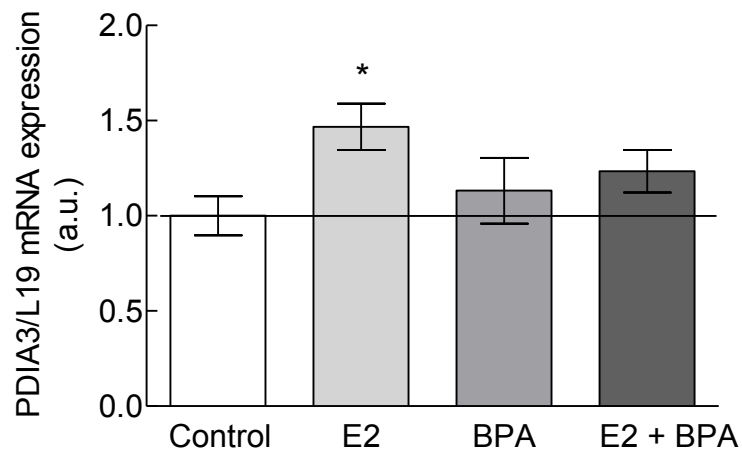
**Figure 2:** Semiquantitative real-time PCR analysis of (A) CYP27A1, (B) VDR and (C) PDIA3 mRNA expression on testes from 30-day-old rats treated in vivo with E2 and/or BPA from 15 to 30-day-old. Relative quantity of CYP27A1, VDR and PDIA3 mRNA were normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of eight animals. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with control group. ### $P < 0.001$  compared with E2 group.

**(A)****(B)****(C)**

**Figure 3:** Western blot analysis and quantification of VDR protein expression on testes from 30-day-old rats treated in vivo with E2 and/or BPA from 15 to 30 day-old. Relative quantity of VDR and CYP27A1 protein was normalized by actin protein levels and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m of eight animals. \* $P < 0.05$  compared with control group.

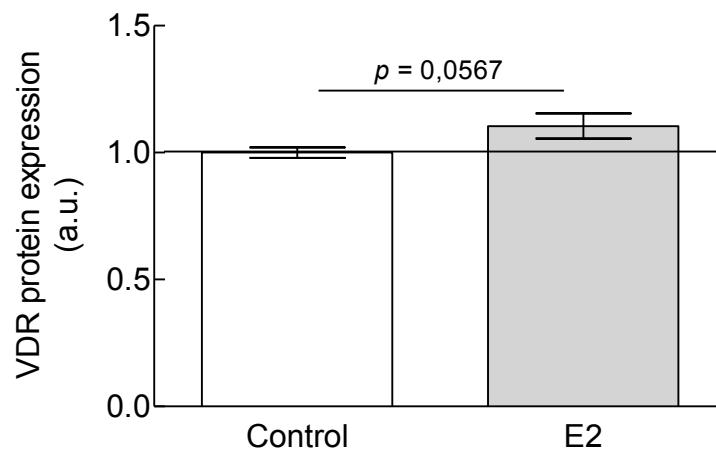


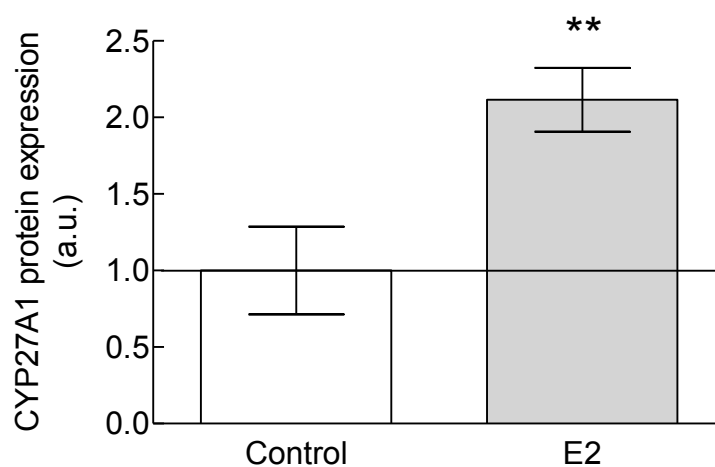
(C)



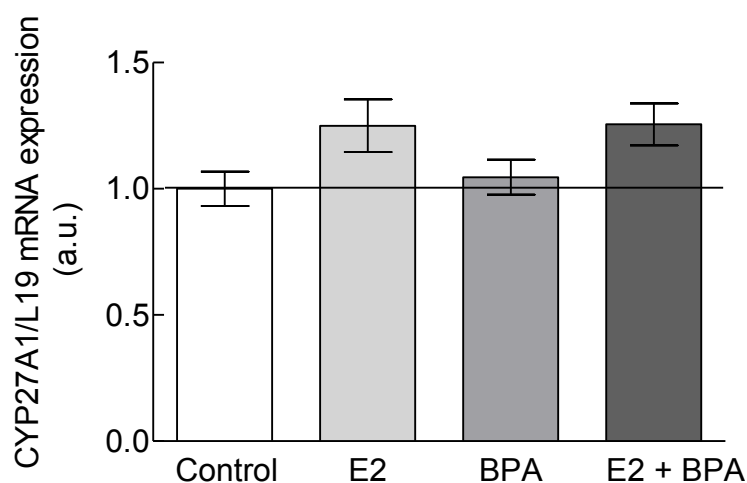
**Figure 4:** Semiquantitative real-time PCR analysis of (A) CYP27A1, (B) VDR and (C) PDIA3 mRNA expression on testes from 75-day-old rats treated in vivo with E2 and/or BPA from 15 to 30 day-old. Relative quantity of CYP27A1, VDR and PDIA3 mRNA were normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of eight animals. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

(A)

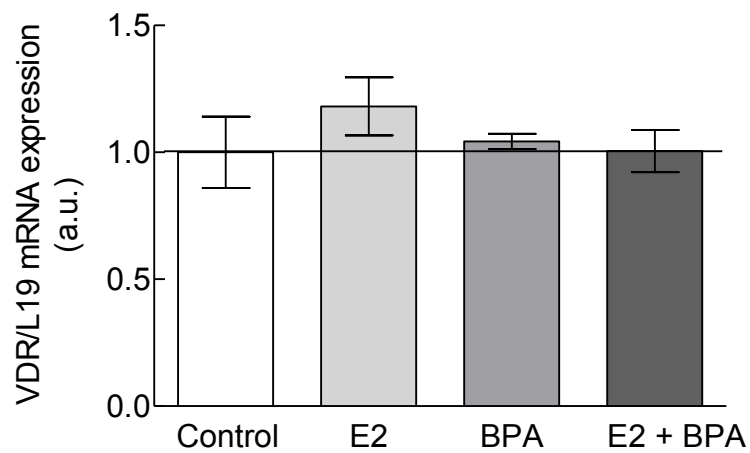
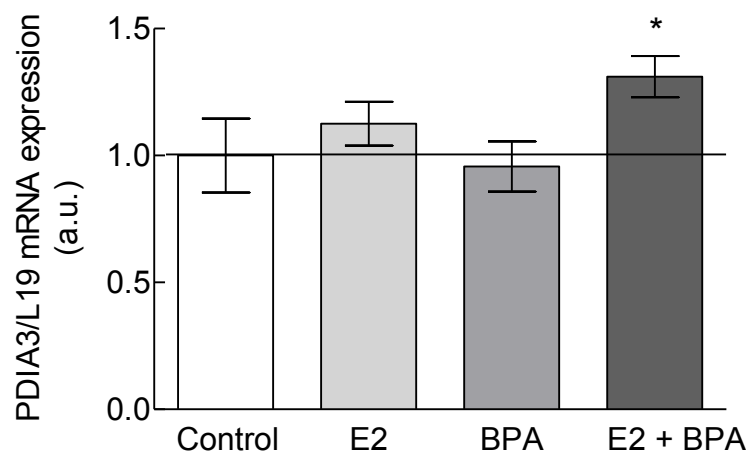


**(B)**

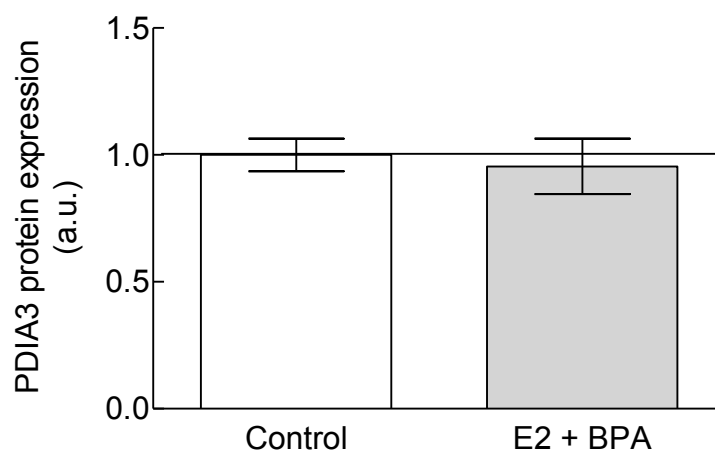
**Figure 5:** Western blot analysis and quantification of (A) VDR and (B) CYP27A1 protein expression on testes from 75-day-old rats treated in vivo with E2 from 15 to 30-day-old. Relative quantity of VDR and CYP27A1 protein was normalized by actin protein levels and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m of eight animals. \*\*P < 0.01 compared with control group.

**(A)**



**(B)****(C)**

**Figure 6:** Semiquantitative real-time PCR analysis of (A) CYP27A1, (B) VDR and (C) PDIA3 mRNA expression on testes from 75-day-old rats treated in vivo with E2 and/or BPA from 60 to 75-day-old. Relative quantity of CYP27A1, VDR and CYP27A1 mRNA were normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of eight animals.



**Figure 7:** Western blot analysis and quantification of PDIA3 protein expression on testes from 75-day-old rats treated in vivo with E2 + BPA from 60 to 75-day-old. Relative quantity of PDIA3 protein was normalized by actin protein levels and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m of eight animals.

**APÊNDICE B – Manuscrito artigo 2**

**Title: Acute effect of bisphenol A: signaling pathways on calcium influx in immature rat testes**

Article submitted to Reproductive Toxicology (Elsevier - ISSN: 0890-6238)

Authors: Renata Gonçalves<sup>1,2,3,4</sup>, Ana Paula Zanatta<sup>2</sup>, Fernanda Carvalho Cavalari<sup>1</sup>, Monica Andressa Wessner do Nascimento<sup>1</sup>, Christelle Delalande-Lecapitaine<sup>3,4,5</sup>, H el ene Boura ima-Lelong<sup>3,4,5</sup>, F atima Regina Mena Barreto Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina, Brazil;*

<sup>2</sup>*UNOCHAPECÓ*

<sup>3</sup>*Normandie Univ, France;*

<sup>4</sup>*UNICAEN, Laboratoire Estrog nes, Reproduction, Cancer, CAEN cedex 5, France;*

<sup>5</sup>*INRA USC 2006, CAEN cedex 5, France.*

\*Corresponding author: Dr. F atima Regina Mena Barreto Silva. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail address: mena.barreto@ufsc.br, Tel/Fax: +55-48.3721.6912/9672

**Abstract**

We investigated the acute effect of low concentrations of BPA on calcium influx and the mechanism of action of BPA in this rapid response in the rat testis. BPA increased calcium influx at 1 pM and 1 nM at 300 s of incubation, in a similar manner to that of estradiol. At 1 pM, BPA stimulated calcium influx independently of classical estrogen receptors, consistent with a G-protein coupled receptor. This effect also involves the modulation of ionic channels, such as  $K^+$ , TRPV1 and  $Cl^-$  channels. Furthermore, BPA is able to modulate calcium from intracellular storages by inhibiting SERCA and activating  $IP_3$  receptor/ $Ca^{2+}$  channels at the endoplasmic reticulum and activate kinase proteins, such as PKA and PKC. The rapid responses of BPA on calcium influx could, in turn, trigger a cross talk by MEK and  $p38^{MAPK}$  activation and also mediate genomic responses.

**Keywords:** Bisphenol A, calcium, rapid responses, testis.

## 1. Introduction

Bisphenol A (BPA), a synthetic compound with two hydroxyphenyl groups, belongs to the diphenylmethane derivatives and bisphenols. First synthesized in 1891, BPA is now one of the most frequently produced chemicals and is consumed in the manufacture of plastic and epoxy resins used in a variety of consumer goods [1,2]. Several reports have suggested that BPA can disrupt endocrine signaling, since it can up/down regulate hormone secretion. As an endocrine disruptor, BPA can interact with different receptors, such as estrogen receptors (ER), androgen receptors, corticoids, thyroid hormone receptors, the dopaminergic system and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) to initiate similar or different responses to those of the usual receptor agonists, causing adverse health effects and leading to a variety of irregularities in the reproductive system [3–8]. BPA can also act as a xenoestrogen via ER and trigger alternative estrogenic effects that begin outside the nuclear receptor and may cause reproductive disorders and metabolic damage [9,10]. It can also interfere with the expression of target genes mediated by the classical ER [11]. In addition, BPA may act through the G-protein coupled estrogen receptor (GPER), as well as ESR1 and ESR2, to regulate Sertoli TM4 cell proliferation, as reported by Ge et al. [12]. BPA can also bind to non-classical estrogen receptors and trigger non-genomic or rapid responses involving hormone exocytosis and calcium homeostasis [13,14].

The effects of BPA on the reproductive function in animal models are widely discussed in the scientific community. Prenatal and prepubertal exposure to BPA lead to morphological anomalies in germ cell development, including increased apoptosis and the inhibition of testicular cell proliferation [15–17]. Exposure to BPA in rats can have an effect on the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis [18], where prepubertal exposition can increase ESR2 expression and decrease LH levels in the pituitary gland, diminishing the sensibility to negative feedback from estradiol [19]. In adult rats, daily doses of BPA result in diminished plasma levels of FSH, LH and testosterone, associated with an increase in estradiol and decrease in sperm count and quality [20] together with a disturbance in the expression of steroidogenic enzymes [21,22]. Meiosis is also impaired by the exposure to BPA in adult rats, where there is a decrease in sperm mobility and production, together with irregularities in spermiation, mediated by ER [23,24]. Long-term exposure to BPA at low doses reportedly leads to male reproduction disorders, characterized by androstenedione and testosterone serum levels and sexual behavior alterations [25,26]. The joint actions of low doses of BPA and diethylstilbestrol over long periods have been shown to decrease sperm motility, provoke

lesions in organelles of Sertoli and Leydig cells, alter protein phosphorylation in the endoplasmic reticulum and influence sperm quality [27]. In addition, Sertoli cell metabolism is significantly altered after a short period of *in vitro* exposure to high concentrations of BPA, where BPA alters glucose metabolism and decreases lactate dehydrogenase activity, potentially impairing spermatogenesis [28]. Moreover, *in vitro* exposure of Sertoli cells to high concentrations of BPA has been reported to induce reactive oxygen species production and mitochondria malfunction, leading to calcium imbalance and cell death [29].

Several epidemiological studies associate BPA exposure to developmental issues and reproductive problems in humans. A positive correlation between urinary BPA concentrations and implantation failure was found in women undergoing *in vitro* fertilization [30]. A link was demonstrated between cumulative BPA exposure through dietary sources and prostate cancer in a study in Hong Kong [31]. Another study shows that BPA concentrations in seminal plasma are negatively correlated with sperm count, concentration and motility, while associated with higher E2 estrogen levels and decreased testicular steroidogenesis [32]. Furthermore, numerous studies show that high BPA levels in the urine during pregnancy result in lower TSH levels [33], sex-specific changes in infant HPA axis function [34] and behavioral problems in children [35–37], together with autism [38]. In most countries, such as Canada, Brazil, and in the European Union, BPA is only prohibited in baby bottles and articles for children under 3 years old. France is the only country to have completely prohibited the use of BPA in all plastic food containers in addition to baby bottles. In Brazil, there is a legal proposal underway to prohibit the use of BPA in all food contact materials and articles, but this has yet to be approved.

Calcium has an important role in the male reproductive system. Aside from being essential for testosterone synthesis in the steroidogenesis process [39], calcium signaling participates in the blood-testis-barrier (BTB) homeostasis. The calcium signaling machinery seems to have an important role in intercellular junctions and structures related to germ cell translocation through the BTB, together with germ cell release to the lumen of the seminiferous tubules [40,41]. Additionally, calcium is crucial for the acrosome reaction and motility in the sperm [42], emphasizing the importance of calcium signaling for the reproductive function as a whole. We hypothesize that balancing calcium could prevent BPA toxicity in the testis and may maintain adequate spermatogenesis and fertility. In the present study, we investigated the acute effects of BPA at low concentrations to establish the ionic mechanism of action of this xenoestrogen in the immature rat testis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

(7 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-7-[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol (ICI 182,780), 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt hydrate (DIDS), 9-anthracene carboxylic acid, BAPTA-AM, bisphenol A, bovine serum albumin, capsaicin, CFTR(inh)-172, dantrolene, estradiol (E2), flunarizine, glibenclamide, H-89 dihydrochloride hydrate, KB-R7943, KT 5720, nifedipine, ouabain, PD 98,059, Ro 31-0432, SB 239063, thapsigargin, and U-73122 were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). [ $^{45}\text{Ca}$ ]CaCl<sub>2</sub> (sp. act. 321 KBq/mg Ca<sup>2+</sup>), and Optiphase Hisafe III biodegradable scintillation liquid were purchased from Perkin–Elmer (Boston, USA). All other chemicals were of analytical grade.

### 2.2. Animals

Thirty-day-old male Wistar rats were used in this study. The animals were bred in our animal facility and housed in an air-conditioned room (21  $\pm$  2 °C) with controlled lighting (12 h/12 h light/dark cycle). All animals were maintained with pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil) and tap water available ad libitum. The animal procedures were carried out in accordance with the ethical recommendations of the local Ethical Committee for Animal Use (Protocol CEUA/PP00862).

### 2.3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx

Animals were euthanized by decapitation and the testes were removed. Testes were then decapsulated and preincubated with Krebs Ringer-bicarbonate (KRb) buffer (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) for 15 min in a Dubnoff metabolic incubator at 34°C, pH 7.4 and gassed with a O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> mixture (95:5; v/v). The medium was replaced with fresh KRb with 0.1  $\mu\text{Ci/mL}$   $^{45}\text{Ca}^{2+}$  and the samples incubated for 60 min. Finally, the tissue was incubated for 30, 60 or 300 s either in the absence (control) or the presence of BPA or E2 (10<sup>-6</sup> to 10<sup>-17</sup> M). In some experiments, channel blockers or kinase inhibitors were added 15 min before BPA and E2 addition and maintained for the whole incubation period. At the end of the incubation period, extracellular  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  was thoroughly washed off the testes in 127.5 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 11 mM glucose, and 10 mM LaCl<sub>3</sub>, pH 7.3 (30 min in washing solution). After washing, testes were homogenized with 0.5 M NaOH solution and aliquots

were placed in scintillation fluid and then in a LKB rack beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter–Beckman Coulter, Boston, USA) [43]. A second aliquot was used for total protein quantification by the Lowry method [44]. Results were expressed as pmol calcium/ug of protein, sometimes in % of control.

#### 2.4. Statistical analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. or % of control of 2 independent experiments with four animals in each group per experiment. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* test was used to identify significant differences between groups. Differences were considered to be significant at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. BPA increases calcium influx at low concentrations, similar to the effects of E2

To study the effects of BPA (figure 1) on rapid responses at the plasma membrane in 30-day-old rat testes, BPA was used in low concentrations (1 pM and 1 nM) and with different incubation times (30, 60 and 300 s). As shown in figure 2A, 1 pM BPA was able to increase  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx within 300s. To further analyse these responses, a dose-response curve was carried out with BPA concentrations from 1  $\mu\text{M}$  to 0.01 fM. BPA increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx at 1 and 0.1 pM and 10 nM. Time-course and dose-response curves were also assayed for E2 to compare the hormone and xenoestrogen rapid responses, and both exhibited similar responses. At 0.1 and 0.01 fM, BPA decreased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx, which indicates a dose-dependent biphasic effect of BPA. Thus, a dose of 1 pM and a 300 s incubation time was used in subsequent studies due to the similarity of its effects to E2.

Since BPA can bind to ERs in the same manner as E2, the involvement of these receptors was studied in the calcium influx mediated by BPA. As can be seen in figure 3, the classic ERs blocker ICI 182,780 did not alter the effects of BPA, indicating that the effects of BPA, at least at the concentration and time studied in this experimental approach, are not mediated by classic ERs.

#### 3.2. BPA increases $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx by opening transient receptor potential vanilloid channels (TRPV1 channels)

To analyse the mechanism by which BPA modulates  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in immature rat testis, some plasma membrane targets were studied. Voltage-dependent calcium channels (VDCC)



were studied, but the effect of BPA effect on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx does not appear to involve VDCC channels since neither nifedipine nor flunarizine altered the stimulatory effect of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx (figure 4).

When ATP-dependent  $\text{K}^+$  channels were studied, BPA showed similar effects to those of glibenclamide, a classic ATP-dependent  $\text{K}^+$  channel inhibitor (figure 5). This result indicates that both compounds have similar mechanisms of action. Transient receptor potential channel (TRPs) activity was also studied in the presence of BPA (figure 5). Capsaicin, an activator of transient receptor potential vanilloid (TRPV1) channels, was used and *per se* stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx, as expected (figure 5). When BPA was used together with capsaicin, there was no addition to the effect demonstrated by each compound alone, indicating that BPA and capsaicin have a similar mechanism of action on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in the rat testis.

Other possible plasma membrane targets of BPA were also analysed. To verify a possible role of the  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump in the effects of BPA, the pump inhibitor, ouabain, was used. Ouabain *per se* exhibited a stimulatory effect on calcium influx, through the inhibition of the  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump, which activates the  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchanger (figure 6). Interestingly, the co-incubation of BPA and ouabain led to an amplified effect compared to the use of each compound on its own, indicating that BPA and ouabain have different mechanisms of action. When KB-R7943 was used, it did not alter the effect of BPA on the calcium influx. As both Ouabain and KB-R7943 did not modify the effect of BPA, this indicates that BPA does not modulate either the  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  pump or the  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchanger to induce the  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx observed at this concentration and incubation time.

### 3.3. BPA activates store-operated calcium channels (SOCs) through phospholipase C (PLC) activation and $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibition

Since BPA has been shown to act as a weak sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) inhibitor [45], the involvement of intracellular calcium ( $[\text{Ca}]_i$ ) in the effect of BPA was also analysed. Initially, an  $[\text{Ca}]_i$  chelator (BAPTA-AM) was used; as can be seen in figure 7A, the  $[\text{Ca}]_i$  chelator itself induced an increased calcium influx, which remained the same when BAPTA-AM was co-incubated with BPA, suggesting that both compounds could be acting through the same mechanism. To further study this mechanism, namely the control of  $[\text{Ca}]_i$  through calcium storage in the endoplasmic reticulum,  $\text{IP}_3$ , ryanodine receptors and the involvement of SERCA in the effect of BPA was analysed. Curiously, when the inhibitor, dantrolene, was used to block ryanodine receptors, there was an increase in the effect of BPA on calcium influx. The inhibition of PLC by U-73122 abolished the BPA-mediated calcium

influx (figure 7B). As expected, when SERCA was inhibited by thapsigargin, BPA was not able to stimulate calcium influx.

#### *3.4. BPA calcium signalling involves plasma membrane chloride channels*

The involvement of Cl<sup>-</sup> channels in the effects of BPA was also studied. 9-Anthracene (a Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> channel blocker), DIDS (a voltage dependent Cl<sup>-</sup> channel blocker) and CFTR(inh)-172 (a CFTR Cl<sup>-</sup> channel blocker) were used. As demonstrated in figure 8, both 9-anthracene and CFTR(inh)-172 abolished the effects of BPA on calcium influx, indicating that Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> channels and CFTR Cl<sup>-</sup> channels may be involved in this effect. Interestingly, when voltage dependent Cl<sup>-</sup> channels were blocked with DIDS, there was no change in the stimulatory effect of BPA on calcium influx.

#### *3.5. Protein kinases such as PKA, PKC, MAP kinase kinase (MEK) and p38<sup>MAPK</sup> are involved in the effects of BPA*

Intracellular targets mediating the effects of BPA on calcium influx were also studied in 30-day-old rat testes (figure 9). When H-89 and KT 5720 (PKA inhibitors) and Ro 31-0432 (PKC inhibitor) were used, the effect of BPA was abolished, indicating that PKA and PKC are involved in this effect. Furthermore, when MEK and p38<sup>MAPK</sup> were inhibited by PD 98,059 and SB 239063, respectively, the inhibition of these protein kinases cancelled BPA's effect.

## **4. Discussion**

BPA's action as a xenoestrogen is widely discussed in the scientific community. Several studies have demonstrated the effects of BPA at different concentrations in numerous tissues, leading to altered metabolism and even the development of cancer [26]. Mice treated with BPA at low concentrations for chronic periods exhibited reproduction disorders due to alterations in behaviours that are essential for the success of male reproduction [25]. In addition, severe lesions in sperm motility and in the function of testicular cells can be detected when the BPA is co-administered with diethylstilbestrol, even at low doses of these compounds [27].

Histologic and metabolic alterations in the reproductive system following BPA exposure have been previously described. In seminiferous tubules, low concentrations of BPA inhibit meiosis progression [46] and stimulate spermatogonial proliferation and GPER expression

[47,48]. In male rats, exposure to BPA at an immature age disrupts the blood-testis barrier (BTB) formation by altering the expression and location of key proteins in the BTB structure [49–51]. Here, we show, to the best of our knowledge, for the first time, that BPA at a very low concentration (1 picomolar) is able to elicit rapid responses and change calcium equilibrium by altering ionic channel activity and protein kinase modulation in 30-day-old rat testes. A similar effect was also seen in rat hippocampal neurons, where BPA was able to induce rapid calcium signaling through nongenomic pathways [52]. Furthermore, when compared to E2, BPA had similar effects on calcium influx. Other studies have previously demonstrated a triphasic effect such as the one seen in the present investigation, where BPA has a stimulating or inhibiting effect, depending on the concentration used [53,54]. Intriguingly, extremely low concentrations of BPA were able to inhibit calcium influx; in general, hormones are more likely to have an effect at very low concentrations, such as reverse  $T_3$  [55]. As a xenoestrogen, BPA can act through the classic estrogen receptors, ESR1 and ESR2, and also through GPER, located at the plasma membrane [56–58]. The nongenomic effects demonstrated in this work appear not to involve classic estrogen receptors since the inhibition of both receptors did not alter the effects of BPA. The effect observed with ICI 182,780 alone is most likely related to the fact that ICI 182,780 can act as a GPER agonist [59]. The activation of GPER can lead to calcium influx, as demonstrated in rat brain microvascular endothelial cells (RBMVEC) [60]. Additionally, an interaction between GPER and the plasma membrane calcium  $Ca^{2+}$ -ATPase was demonstrated by Tran et al [61]. As there was no difference between the effects of ICI 182,780 and BPA, these are most likely acting through the same mechanism. This could indicate that BPA may act through the GPER receptor, initiating a signaling pathway at the plasma membrane. The fact that PLC mediates the effects of BPA reinforces the role of a G-protein in this pathway, but further studies are necessary to elucidate this theory.

A relationship between BPA and calcium has already been shown in pancreatic islets [62,63], in the central nervous system [64,65], cardiac system [66,67] and other systems. Apoptotic stimulation by BPA has been observed in a spermatocyte cell line and involves calcium signaling [68]. In Sertoli cells, BPA led to cell injury through mitochondrial dysfunction and calcium overload [29]. In this wide concentration range, a triphasic effect of BPA on calcium influx was observed. The oscillations in  $[Ca]_i$ , which serve to regulate many different cellular processes, may reflect calcium handling from a multitude of sources, by activating exchangers, calcium pumps and ionic channels. Thus, we used several pharmacological tools to investigate the calcium pathways and some proteins downstream of

the plasma membrane that may be involved in the cellular signaling triggered by extracellular calcium. Some targets involved in calcium signaling at the plasma membrane were studied first, such as ionic channels. A relationship between BPA and VDCC has been previously shown *in vitro*, where BPA is able to inhibit these channels in mouse endocrine, neuronal and cardiac cells [69]. Exceptionally, in the mice testis, BPA seems capable of modulating T-type VDCC expression during longer periods of exposure *in vivo* through genomic pathways involving estrogen receptors [70]. Our data suggest that VDCC do not mediate the nongenomic effect of BPA, at least under the experimental conditions used herein.

Despite the fact that voltage-dependent channels do not seem to participate in the effect of BPA observed in the present study, BPA showed similar effects to those of glibenclamide, a known ATP-K<sup>+</sup> channel inhibitor, which causes membrane depolarization. A similar effect was also observed in mouse and human pancreatic islets, where BPA had an insulinotropic effect [63]. Some studies demonstrate a hyperpolarizing effect of BPA and GPER on the plasma membrane [60,71], but further studies are necessary to elucidate the effects of BPA on the plasma membrane potential. A possible mechanism by which BPA could stimulate calcium influx is through TRPV1 channels, as BPA showed a similar effect to that of capsaicin, a known TRPV1 activator. TRP channels are a family of more than 30 members subdivided into seven classes. TRPV1 is a heat-sensitive non-selective ion channel present in primary sensory neurons [72]. The presence of this receptor in non-neuronal tissues, including Sertoli and sperm cells has previously been demonstrated [73,74], as well as its involvement in calcium transport [73,75]. Despite being heat-sensitive receptors, TRPV1 can be activated through G-protein coupled receptors and protein kinases, such as PKA and PKC [76], which can lead to channel opening even at normal body temperatures [77,78]. Likewise, BPA could promote calcium influx through TRPV1 channels via GPER, PKA and/or PKC activation.

The effect of BPA on [Ca]<sup>i</sup> calcium signaling was also studied. At a low concentration, BPA was able to increase calcium influx in the testis, showing similar effects to an intracellular calcium chelator, BAPTA-AM and a SERCA inhibitor, thapsigargin. Woeste et al demonstrated BPA's role as a weak SERCA inhibitor in rabbit tissue [45]. Furthermore, BPA-induced calcium influx seems to involve PLC activation, which leads to IP<sub>3</sub> synthesis and could result in IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel activation at the endoplasmic reticulum. This SERCA inhibition and, possibly, IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel activation could lead to a depletion of the intracellular calcium storages by activating IP<sub>3</sub> receptors, which would alter calcium stocks in the endoplasmic reticulum and activate SOCs channels in the plasma

membrane, stimulating calcium influx. SOCs are ion channels located at the plasma membrane of most non-excitable cells [79]. These channels are activated by the depletion of [Ca]I from the endoplasmic reticulum. They can also be activated by PKC, which has been shown to participate in the effects of BPA. The involvement of SOCs in the effect of BPA has been reported in other tissues, where BPA was able to stimulate prostate cancer cell migration through calcium signaling, namely through SOCs [80]. Furthermore, in female rat hearts, BPA promoted arrhythmias by altering  $\text{Ca}^{2+}$  handling in the endoplasmic reticulum [81].

Cytosolic  $\text{Cl}^-$  ion improves  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent secretory activity in several kinds of endocrine cells [82]. The participation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channels in modulating voltage-dependent calcium channels in the testis and in Sertoli cells has been reported for secretory activities stimulated by thyroid hormones ( $\text{T}_4$  and reverse  $\text{T}_3$ ) and  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  [55,83,84]. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride currents present in Sertoli cells are involved in the hyperpolarizing effect of cAMP and the release of a low  $\text{Cl}^-$  and bicarbonate-rich primary fluid [85]. Herein, we demonstrate, for the first time, that the acute action of BPA in the testis triggers a rapid calcium influx response involving the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channels. These data may suggest that, even at low concentrations, BPA can influence secretory activity in the testis. Another class of  $\text{Cl}^-$  channel, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)  $\text{Cl}^-$  channel, is also expressed in Sertoli cells. These channels are transmembrane regulators that modulate intracellular and lumen pH by exchanging  $\text{Cl}^-$  / $\text{HCO}_3^-$  [86]. In the testis, the CFTR is expressed according to the cycle of spermatogenesis and seems to contribute to male fertility. Although CFTR were reported to be expressed in the testis in 1991, few data are available about the contribution of these channels to the fluid production and electrolyte transport in the testis and in Sertoli cell protein expression [87–89]. We demonstrated that the blockage of CFTR  $\text{Cl}^-$  channels nullified the stimulatory effect of BPA on calcium influx in immature rat testes. Taken together, these data reinforce the acute effect that BPA has on rapid calcium dynamic responses, mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channels and CFTR  $\text{Cl}^-$  channels.

Nongenomic responses are classified as effects that start at the plasma membrane and occur within seconds to minutes. A nongenomic response could also result in a genomic modulation over longer periods [90]. Protein kinases, such as MAP kinase kinase (MEK) and  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ , participate in nuclear signalling pathways. The involvement of such enzymes in the effects of BPA could indicate that BPA can induce nongenomic responses that may modulate genomic effects over prolonged periods. It has been previously reported that BPA affects cell

signal transduction by stimulating calcium influx and phosphorylation of several kinases and induces apoptotic cell death in HT-22 cells [64]. In the present study, PD 98,059 nullified the xenoestrogen effect of BPA, demonstrating a role for MEK in the stimulatory action of BPA on calcium influx in the rat testis. In addition, the involvement of calcium influx, PKC and p38<sup>MAPK</sup> indicates a crosstalk between nongenomic initiation effects that may converge with genomic effects, since both kinases can induce genomic transcription [91]. Furthermore, the modulatory effect of BPA on genomic pathways, mediated by the activation of transcription factors and gene transcription, points clearly to the participation of the p38<sup>MAPK</sup> signalling pathway in the regulation of KRT1, KRT10, IVL and FLG in oral keratinocytes [92]. Accordingly, our data demonstrate an association between calcium influx, PKC and p38<sup>MAPK</sup> activation that might regulate genomic responses. However, additional studies are needed in order to clarify this point for BPA.

Thus, the results of this study show that BPA is able to stimulate calcium influx independently of classical ERs, through the modulation of ionic channels, such as K<sup>+</sup>, TRPV1 and Cl<sup>-</sup> channels. Furthermore, BPA is able to modulate calcium from intracellular storages by inhibiting SERCA and activating IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channels at the endoplasmic reticulum and activate kinase proteins, such as PKA and PKC. The rapid responses of BPA on calcium influx could, in turn, trigger a cross talk by MEK and p38<sup>MAPK</sup> activation and also mediate genomic responses.

## 5. Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brazil (CNPq n° 472071/2013-0) and Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES). RG (CNPq n° 204568/2014-5), FCC, MAWN are registered at the PPG-Biochemistry/UFSC. FRMBS is recipient of a CNPq productivity fellowship. We thank the LAMEB I-CCB/UFSC technicians for their support. We also thank Prof. Bóris Stambuk/UFSC for technical support.

## 6. References

- [1] E.G. Dodds, W. Lawson, Molecular structure in relation to oestrogenic activity: compounds without a phenantrene nucleus, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 125 (1938) 222–232.

- [2] T. Geens, L. Goeyens, A. Covaci, Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214 (2011) 339–347. doi:10.1016/j.ijheh.2011.04.005.
- [3] T. Galloway, R. Cipelli, J. Guralnik, L. Ferrucci, S. Bandinelli, A.M. Corsi, C. Money, P. McCormack, D. Melzer, Daily Bisphenol A Excretion and Associations with Sex Hormone Concentrations: Results from the InCHIANTI Adult Population Study, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 1603–1608. doi:10.1289/ehp.1002367.
- [4] J.-M. Molina-Molina, E. Amaya, M. Grimaldi, J.-M. Sáenz, M. Real, M.F. Fernández, P. Balaguer, N. Olea, In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (2013) 127–136. doi:10.1016/j.taap.2013.05.015.
- [5] A. Riu, A. le Maire, M. Grimaldi, M. Audebert, A. Hillenweck, W. Bourguet, P. Balaguer, D. Zalko, Characterization of novel ligands of ER $\alpha$ , Er $\beta$ , and PPAR $\gamma$ : the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 122 (2011) 372–382. doi:10.1093/toxsci/kfr132.
- [6] D.C. Jones, G.W. Miller, The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 569–581. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.010.
- [7] W.D. Pennie, T.C. Aldridge, A.N. Brooks, Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements, *J. Endocrinol.* 158 (1998) R11-14.
- [8] L.N. Vandenberg, M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto, Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 75–95. doi:10.1210/er.2008-0021.
- [9] P. Alonso-Magdalena, A.B. Ropero, S. Soriano, M. García-Arévalo, C. Ripoll, E. Fuentes, I. Quesada, A. Nadal, Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways, *Mol. Cell. Endocrinol.* 355 (2012) 201–207. doi:10.1016/j.mce.2011.12.012.
- [10] D.-K. Li, Z. Zhou, M. Miao, Y. He, J. Wang, J. Ferber, L.J. Herrinton, E. Gao, W. Yuan, Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality, *Fertil. Steril.* 95 (2011) 625–630.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.026.
- [11] X.-L. Zhang, H.-S. Wang, N. Liu, L.-C. Ge, Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals, *Arch. Biochem. Biophys.* 585 (2015) 10–16. doi:10.1016/j.abb.2015.09.006.
- [12] L.-C. Ge, Z.-J. Chen, H.-Y. Liu, K.-S. Zhang, H. Liu, H.-B. Huang, G. Zhang, C.K.C. Wong, J.P. Giesy, J. Du, H.-S. Wang, Involvement of activating ERK1/2 through G protein coupled receptor 30 and estrogen receptor  $\alpha/\beta$  in low doses of bisphenol A promoting growth of Sertoli TM4 cells, *Toxicol. Lett.* 226 (2014) 81–89. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.035.
- [13] N.N. Bulayeva, Mechanisms of membrane estrogen receptor- mediated rapid stimulation of Ca<sup>2+</sup> levels and prolactin release in a pituitary cell line, *AJP Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E388–E397. doi:10.1152/ajpendo.00349.2004.

- [14] B. Lei, S. Sun, J. Xu, C. Feng, Y. Yu, G. Xu, M. Wu, W. Peng, Low-concentration BPAF- and BPF-induced cell biological effects are mediated by ROS in MCF-7 breast cancer cells, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2017). doi:10.1007/s11356-017-9709-7.
- [15] H. Aikawa, S. Koyama, M. Matsuda, K. Nakahashi, Y. Akazome, T. Mori, Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A, *Cell Tissue Res.* 315 (2004) 119–124. doi:10.1007/s00441-003-0806-1.
- [16] Y. Toyama, S. Yuasa, Effects of neonatal administration of 17 $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis, *Reprod. Toxicol.* 19 (2004) 181–188. doi:10.1016/j.reprotox.2004.08.003.
- [17] P. Urriola-Muñoz, R. Lagos-Cabré, R.D. Moreno, A Mechanism of Male Germ Cell Apoptosis Induced by Bisphenol-A and Nonylphenol Involving ADAM17 and p38 MAPK Activation, *PLoS ONE.* 9 (2014) e113793. doi:10.1371/journal.pone.0113793.
- [18] J.G. Ramos, J. Varayoud, L. Kass, H. Rodríguez, L. Costabel, M. Muñoz-de-Toro, E.H. Luque, Bisphenol A Induces Both Transient and Permanent Histofunctional Alterations of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Prenatally Exposed Male Rats, *Endocrinology.* 144 (2003) 3206–3215. doi:10.1210/en.2002-0198.
- [19] B.T. Akingbemi, C.M. Sottas, A.I. Koulova, G.R. Klinefelter, M.P. Hardy, Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells, *Endocrinology.* 145 (2004) 592–603. doi:10.1210/en.2003-1174.
- [20] P. Wisniewski, R.M. Romano, M.M.L. Kizys, K.C. Oliveira, T. Kasamatsu, G. Giannocco, M.I. Chiamolera, M.R. Dias-da-Silva, M.A. Romano, Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis, *Toxicology.* 329 (2015) 1–9. doi:10.1016/j.tox.2015.01.002.
- [21] L.-L. Qiu, X. Wang, X. Zhang, Z. Zhang, J. Gu, L. Liu, Y. Wang, X. Wang, S.-L. Wang, Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A, *Toxicol. Lett.* 219 (2013) 116–124. doi:10.1016/j.toxlet.2013.03.011.
- [22] D. Nakamura, Y. Yanagiba, Z. Duan, Y. Ito, A. Okamura, N. Asaeda, Y. Tagawa, C. Li, K. Taya, S.-Y. Zhang, Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol, *Toxicol. Lett.* 194 (2010) 16–25. doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.002.
- [23] C. Liu, W. Duan, R. Li, S. Xu, L. Zhang, C. Chen, M. He, Y. Lu, H. Wu, H. Pi, X. Luo, Y. Zhang, M. Zhong, Z. Yu, Z. Zhou, Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e676. doi:10.1038/cddis.2013.203.
- [24] D. Tiwari, G. Vanage, Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility, *Reprod. Toxicol.* 40 (2013) 60–68. doi:10.1016/j.reprotox.2013.05.013.



- [25] E. Jasarevic, P.T. Sieli, E.E. Twellman, T.H. Welsh, T.R. Schachtman, R.M. Roberts, D.C. Geary, C.S. Rosenfeld, Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 11715–11720. doi:10.1073/pnas.1107958108.
- [26] R. Rezg, S. El-Fazaa, N. Gharbi, B. Mornagui, Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives, *Environ. Int.* 64 (2014) 83–90. doi:10.1016/j.envint.2013.12.007.
- [27] X. Jiang, H. Chen, Z. Cui, L. Yin, W. Zhang, W. Liu, F. Han, L. Ao, J. Cao, J. Liu, Low-dose and combined effects of oral exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on the male reproductive system in adult Sprague-Dawley rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43 (2016) 94–102. doi:10.1016/j.etap.2016.02.014.
- [28] W. Huang, H. Huang, H. Wang, J. Zhao, M. Li, H. Wang, X. Wang, P. Wang, Bisphenol A alters glucose metabolism in rat Sertoli cells in vitro, *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* 21 (2015) 119–123.
- [29] C. Wang, S. Qi, C. Liu, A. Yang, W. Fu, C. Quan, P. Duan, T. Yu, K. Yang, Mitochondrial Dysfunction and Ca<sup>2+</sup> Overload in Injured Sertoli Cells Exposed to Bisphenol A: mitochondrial dysfunction and Ca<sup>2+</sup> overload, *Environ. Toxicol.* 32 (2017) 823–831. doi:10.1002/tox.22282.
- [30] S. Ehrlich, P.L. Williams, S.A. Missmer, J.A. Flaws, K.F. Berry, A.M. Calafat, X. Ye, J.C. Petrozza, D. Wright, R. Hauser, Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing in Vitro Fertilization, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 978–983. doi:10.1289/ehp.1104307.
- [31] L.A. Tse, P.M.Y. Lee, W.M. Ho, A.T. Lam, M.K. Lee, S.S.M. Ng, Y. He, K. Leung, J.C. Hartle, H. Hu, H. Kan, F. Wang, C.F. Ng, Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong, *Environ. Int.* 107 (2017) 1–7. doi:10.1016/j.envint.2017.06.012.
- [32] J. Vitku, J. Heracek, L. Sosvorova, R. Hampl, T. Chlupacova, M. Hill, V. Sobotka, M. Bicikova, L. Starka, Associations of bisphenol A and polychlorinated biphenyls with spermatogenesis and steroidogenesis in two biological fluids from men attending an infertility clinic, *Environ. Int.* 89–90 (2016) 166–173. doi:10.1016/j.envint.2016.01.021.
- [33] M.T. Aung, L.E. Johns, K.K. Ferguson, B. Mukherjee, T.F. McElrath, J.D. Meeker, Thyroid hormone parameters during pregnancy in relation to urinary bisphenol A concentrations: A repeated measures study, *Environ. Int.* 104 (2017) 33–40. doi:10.1016/j.envint.2017.04.001.
- [34] the APrON Study Team, G.F. Giesbrecht, M. Ejaredar, J. Liu, J. Thomas, N. Letourneau, T. Campbell, J.W. Martin, D. Dewey, Prenatal bisphenol a exposure and dysregulation of infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: findings from the APrON cohort study, *Environ. Health.* 16 (2017). doi:10.1186/s12940-017-0259-8.
- [35] M. Ejaredar, Y. Lee, D.J. Roberts, R. Sauve, D. Dewey, Bisphenol A exposure and children's behavior: A systematic review, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 27 (2017) 175–183. doi:10.1038/jes.2016.8.

- [36] Y.-H. Lim, S. Bae, B.-N. Kim, C.H. Shin, Y.A. Lee, J.I. Kim, Y.-C. Hong, Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and social impairment in 4-year-old children, *Environ. Health*. 16 (2017). doi:10.1186/s12940-017-0289-2.
- [37] J.M. Braun, G. Muckle, T. Arbuckle, M.F. Bouchard, W.D. Fraser, E. Ouellet, J.R. Séguin, Y. Oulhote, G.M. Webster, B.P. Lanphear, Associations of Prenatal Urinary Bisphenol A Concentrations with Child Behaviors and Cognitive Abilities, *Environ. Health Perspect.* 125 (2017). doi:10.1289/EHP984.
- [38] B.S. Ye, A.O.W. Leung, M.H. Wong, The association of environmental toxicants and autism spectrum disorders in children, *Environ. Pollut.* 227 (2017) 234–242. doi:10.1016/j.envpol.2017.04.039.
- [39] R.R. Costa, W.A. Varanda, C.R. Franci, A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells, *AJP Cell Physiol.* 299 (2010) C316–C323. doi:10.1152/ajpcell.00521.2009.
- [40] K. Lyon, A. Adams, M. Piva, P. Asghari, E.D. Moore, A.W. Vogl, Ca<sup>2+</sup> signaling machinery is present at intercellular junctions and structures associated with junction turnover in rat Sertoli cells†, *Biol. Reprod.* 96 (2017) 1288–1302. doi:10.1093/biolre/iox042.
- [41] M.W.M. Li, D.D. Mruk, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 17998–18003. doi:10.1073/pnas.1007047107.
- [42] J. Correia, F. Michelangeli, S. Publicover, Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm, *Reproduction.* 150 (2015) R65–R76. doi:10.1530/REP-15-0102.
- [43] A. Zamoner, C. Royer, K.P. Barreto, R. Pessoa-Pureur, F.R.M.B. Silva, Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake in cerebral cortex from young rats, *Neurosci. Res.* 57 (2007) 98–103. doi:10.1016/j.neures.2006.09.012.
- [44] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [45] M. Woeste, J. Steller, E. Hofmann, T. Kidd, R. Patel, K. Connolly, M. Jayasinghe, S. Paula, Structural requirements for inhibitory effects of bisphenols on the activity of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 3927–3933. doi:10.1016/j.bmc.2013.04.012.
- [46] S. Ali, G. Steinmetz, G. Montillet, M.-H. Perrard, A. Loundou, P. Durand, M.-R. Guichaoua, O. Prat, Exposure to Low-Dose Bisphenol A Impairs Meiosis in the Rat Seminiferous Tubule Culture Model: A Physiotoxicogenomic Approach, *PLoS ONE.* 9 (2014) e106245. doi:10.1371/journal.pone.0106245.
- [47] Z.-G. Sheng, W. Huang, Y.-X. Liu, B.-Z. Zhu, Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 267 (2013) 88–94. doi:10.1016/j.taap.2012.12.014.

- [48] Z.-G. Sheng, B.-Z. Zhu, Low Concentrations of Bisphenol A Induce Mouse Spermatogonial Cell Proliferation by G Protein–Coupled Receptor 30 and Estrogen Receptor- $\alpha$ , *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 1775–1780. doi:10.1289/ehp.1103781.
- [49] V. Brouard, I. Guénon, H. Bouraima-Lelong, C. Delalande, Differential effects of bisphenol A and estradiol on rat spermatogenesis' establishment, *Reprod. Toxicol.* 63 (2016) 49–61. doi:10.1016/j.reprotox.2016.05.003.
- [50] M.W.M. Li, D.D. Mruk, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 2302–2314. doi:10.1016/j.biocel.2009.05.016.
- [51] S. Salian, T. Doshi, G. Vanage, Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis, *Toxicology.* 265 (2009) 56–67. doi:10.1016/j.tox.2009.09.012.
- [52] N. Tanabe, T. Kimoto, S. Kawato, Rapid Ca(2+) signaling induced by Bisphenol A in cultured rat hippocampal neurons, *Neuro Endocrinol. Lett.* 27 (2006) 97–104.
- [53] X. Chen, Y. Wang, F. Xu, X. Wei, J. Zhang, C. Wang, H. Wei, S. Xu, P. Yan, W. Zhou, I. Mody, X. Xu, Q. Wang, The Rapid Effect of Bisphenol-A on Long-Term Potentiation in Hippocampus Involves Estrogen Receptors and ERK Activation, *Neural Plast.* 2017 (2017) 1–9. doi:10.1155/2017/5196958.
- [54] Z.-Y. Wang, J. Lu, Y.-Z. Zhang, M. Zhang, T. Liu, X.-L. Qu, Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 14355–14364.
- [55] A.P. Zanatta, L. Zanatta, R. Gonçalves, A. Zamoner, F.R.M.B. Silva, Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin, *PLoS ONE.* 8 (2013) e77176. doi:10.1371/journal.pone.0077176.
- [56] A. Bouskine, M. Nebout, F. Brücker-Davis, M. Benahmed, P. Fenichel, Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1053–1058. doi:10.1289/ehp.0800367.
- [57] P. Fenichel, N. Chevalier, F. Brucker-Davis, Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor, *Ann. Endocrinol.* 74 (2013) 211–220. doi:10.1016/j.ando.2013.04.002.
- [58] K.W. Gaido, L.S. Leonard, S. Lovell, J.C. Gould, D. Babaï, C.J. Portier, D.P. McDonnell, Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997) 205–212.
- [59] P. Thomas, Y. Pang, E.J. Filardo, J. Dong, Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells, *Endocrinology.* 146 (2005) 624–632. doi:10.1210/en.2004-1064.

- [60] J.B. Altmann, G. Yan, J.F. Meeks, M.E. Abood, E. Brailoiu, G.C. Brailoiu, G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells, *J. Neurochem.* 133 (2015) 629–639. doi:10.1111/jnc.13066.
- [61] Q.-K. Tran, M. VerMeer, M.A. Burgard, A.B. Hassan, J. Giles, Hetero-oligomeric Complex between the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 and the Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4b, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 13293–13307. doi:10.1074/jbc.M114.628743.
- [62] P. Alonso-Magdalena, O. Laribi, A.B. Roperio, E. Fuentes, C. Ripoll, B. Soria, A. Nadal, Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair  $\text{Ca}^{2+}$  signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 969–977.
- [63] S. Soriano, P. Alonso-Magdalena, M. García-Arévalo, A. Novials, S.J. Muhammed, A. Salehi, J.-A. Gustafsson, I. Quesada, A. Nadal, Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor  $\beta$ , *PLoS One.* 7 (2012) e31109. doi:10.1371/journal.pone.0031109.
- [64] S. Lee, K. Suk, I.K. Kim, I.-S. Jang, J.-W. Park, V.J. Johnson, T.K. Kwon, B.-J. Choi, S.-H. Kim, Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 2932–2942. doi:10.1002/jnr.21739.
- [65] W. Wang, J. Wang, Q. Wang, W. Wu, F. Huan, H. Xiao, Bisphenol A modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in rat dorsal root ganglion neurons, *J. Membr. Biol.* 246 (2013) 391–397. doi:10.1007/s00232-013-9545-8.
- [66] N.G. Posnack, D. Brooks, A. Chandra, R. Jaimes, N. Sarvazyan, M. Kay, Physiological response of cardiac tissue to bisphenol A: alterations in ventricular pressure and contractility, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309 (2015) H267-275. doi:10.1152/ajpheart.00272.2015.
- [67] S. Yan, Y. Chen, M. Dong, W. Song, S.M. Belcher, H.-S. Wang, Bisphenol A and  $17\beta$ -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling, *PLoS One.* 6 (2011) e25455. doi:10.1371/journal.pone.0025455.
- [68] W. Qian, Y. Wang, J. Zhu, C. Mao, Q. Wang, F. Huan, J. Cheng, Y. Liu, J. Wang, H. Xiao, The toxic effects of Bisphenol A on the mouse spermatocyte GC-2 cell line: the role of the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II axis, *J. Appl. Toxicol. JAT.* 35 (2015) 1271–1277. doi:10.1002/jat.3188.
- [69] A. Deutschmann, M. Hans, R. Meyer, H. Haberlein, D. Swandulla, Bisphenol A Inhibits Voltage-Activated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Vitro: Mechanisms and Structural Requirements, *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 501–511. doi:10.1124/mol.112.081372.
- [70] Q. Wang, L. Zhang, Z. Ding, null Qian Wenyi, Q. Lu, J. Wang, H. Xiao, Effects of bisphenol A on voltage-dependent T-type calcium channels in mouse testis and epididymis, and the role of estrogen receptors, *Wei Sheng Yan Jiu.* 44 (2015) 23–27.
- [71] R. Zhang, I.N. Pessah, Divergent Mechanisms Leading to Signaling Dysfunction in Embryonic Muscle by Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A, *Mol. Pharmacol.* 91 (2017) 428–436. doi:10.1124/mol.116.107342.

- [72] L. Vay, C. Gu, P.A. McNaughton, The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications: The thermo-TRP ion channel family, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 787–801. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x.
- [73] L. De Toni, A. Garolla, M. Menegazzo, S. Magagna, A. Di Nisio, I. Šabović, M.S. Rocca, V. Scattolini, A. Filippi, C. Foresta, Heat Sensing Receptor TRPV1 Is a Mediator of Thermotaxis in Human Spermatozoa, *PLOS ONE*. 11 (2016) e0167622. doi:10.1371/journal.pone.0167622.
- [74] G. Rossi, V. Gasperi, R. Paro, D. Barsacchi, S. Cecconi, M. Maccarrone, Follicle-Stimulating Hormone Activates Fatty Acid Amide Hydrolase by Protein Kinase A and Aromatase-Dependent Pathways in Mouse Primary Sertoli Cells, *Endocrinology*. 148 (2007) 1431–1439. doi:10.1210/en.2006-0969.
- [75] N. Bernabò, M.G. Pistilli, M. Mattioli, B. Barboni, Role of TRPV1 channels in boar spermatozoa acquisition of fertilizing ability, *Mol. Cell. Endocrinol.* 323 (2010) 224–231. doi:10.1016/j.mce.2010.02.025.
- [76] T. Rosenbaum, S.A. Simon, TRPV1 Receptors and Signal Transduction, in: W.B. Liedtke, S. Heller (Eds.), *TRP Ion Channel Funct. Sens. Transduct. Cell. Signal. Cascades*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/> (accessed September 7, 2017).
- [77] M. Tominaga, M. Wada, M. Masu, Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 6951–6956. doi:10.1073/pnas.111025298.
- [78] V. Vellani, S. Mapplebeck, A. Moriondo, J.B. Davis, P.A. McNaughton, Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide, *J. Physiol.* 534 (2001) 813–825.
- [79] M. Prakriya, R.S. Lewis, Store-Operated Calcium Channels, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 1383–1436. doi:10.1152/physrev.00020.2014.
- [80] S. Derouiche, M. Warnier, P. Mariot, P. Gosset, B. Mauroy, J.-L. Bonnal, C. Slomianny, P. Delcourt, N. Prevarskaya, M. Roudbaraki, Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling, *SpringerPlus*. 2 (2013) 54. doi:10.1186/2193-1801-2-54.
- [81] X. Gao, Q. Liang, Y. Chen, H.-S. Wang, Molecular Mechanisms Underlying the Rapid Arrhythmogenic Action of Bisphenol A in Female Rat Hearts, *Endocrinology*. 154 (2013) 4607–4617. doi:10.1210/en.2013-1737.
- [82] J.-E. Turner, S. Sedej, M. Rupnik, Cytosolic Cl<sup>-</sup> ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices: Cl<sup>-</sup> and secretion in pituitary tissue slices, *J. Physiol.* 566 (2005) 443–453. doi:10.1113/jphysiol.2005.088997.
- [83] A. Rosso, M. Pansera, A. Zamoner, L. Zanatta, H. Bouraïma-Lelong, S. Carreau, F.R.M.B. Silva, 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells, *Biochimie*. 94 (2012) 146–154. doi:10.1016/j.biochi.2011.10.001.

- [84] L. Zanatta, A. Zamoner, R. Gonçalves, A.P. Zanatta, H. Bouraïma-Lelong, C. Bois, S. Carreau, F.R.M.B. Silva, Effect of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 515 (2011) 46–53. doi:10.1016/j.abb.2011.09.001.
- [85] N. Lalevée, M. Joffre, Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis, *J. Membr. Biol.* 169 (1999) 167–174.
- [86] K.L. Fok, H. Chen, Y.C. Ruan, H.C. Chan, Novel regulators of spermatogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 29 (2014) 31–42. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.008.
- [87] L. Rato, S. Socorro, J.E.B. Cavaco, P.F. Oliveira, Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells, *J. Membr. Biol.* 236 (2010) 215–224. doi:10.1007/s00232-010-9294-x.
- [88] A.E.O. Trezise, M. Buchwald, In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Nature.* 353 (1991) 434–437. doi:10.1038/353434a0.
- [89] H. Zhang, Z. Zhang, H. Jiang, Y. Gu, K. Hong, W. Tang, L. Zhao, D. Liu, J. Mao, Y. Yang, Impact of the CFTR chloride channel on the cytoskeleton of mouse Sertoli cells, *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* 22 (2016) 110–115.
- [90] L. Zanatta, H. Bouraïma-Lelong, C. Delalande, F.R.M.B. Silva, S. Carreau, Regulation of aromatase expression by  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 in rat testicular cells, *Reprod. Fertil. Dev.* 23 (2011) 725. doi:10.1071/RD10163.
- [91] C.S. Watson, Y.-J. Jeng, J. Guptarak, Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127 (2011) 44–50. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.01.015.
- [92] M. Ehrenmann, P. Tomakidi, E. Hellwig, S.D. Schulz, O. Polydorou, Effects of low-dose Bisphenol A on calcium ion influx and on genes of proliferation and differentiation in immortalized human gingival cells in vitro: The role of estrogen receptor beta, *Dent. Mater.* 33 (2017) 1021–1032. doi:10.1016/j.dental.2017.06.011.

## Figures

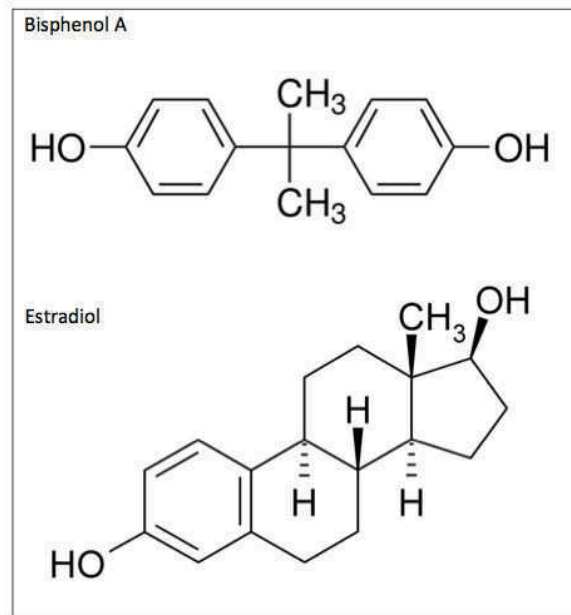
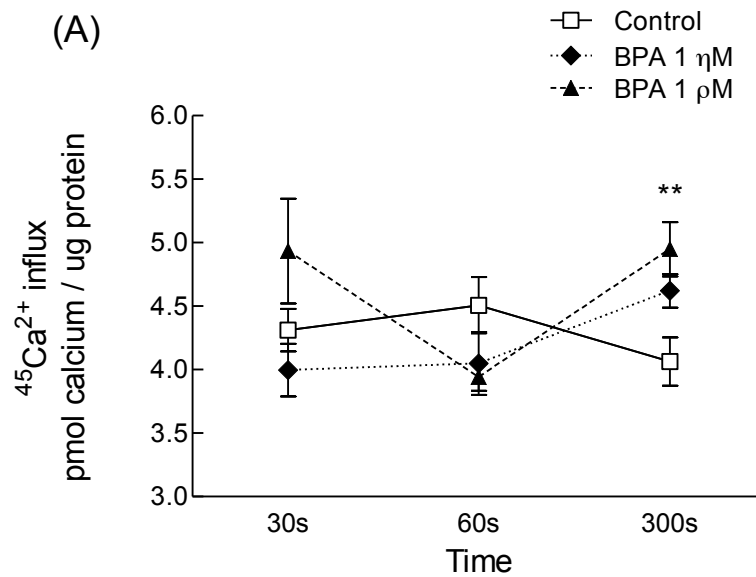
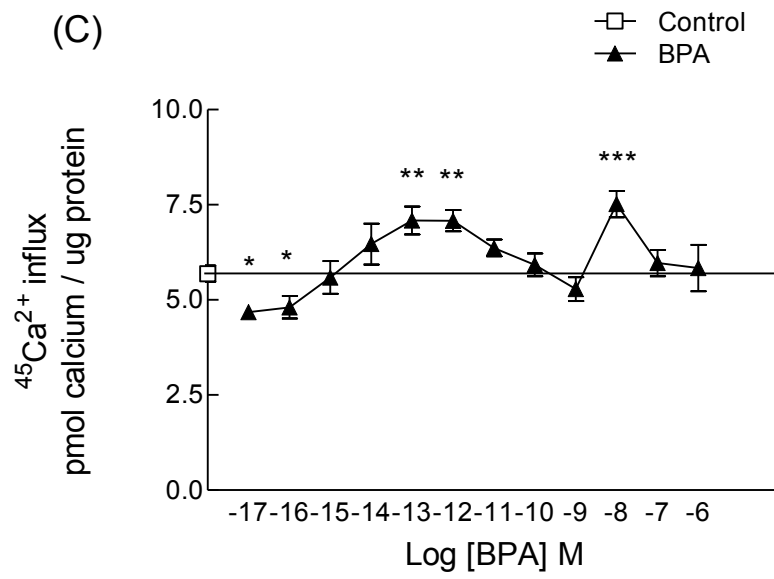
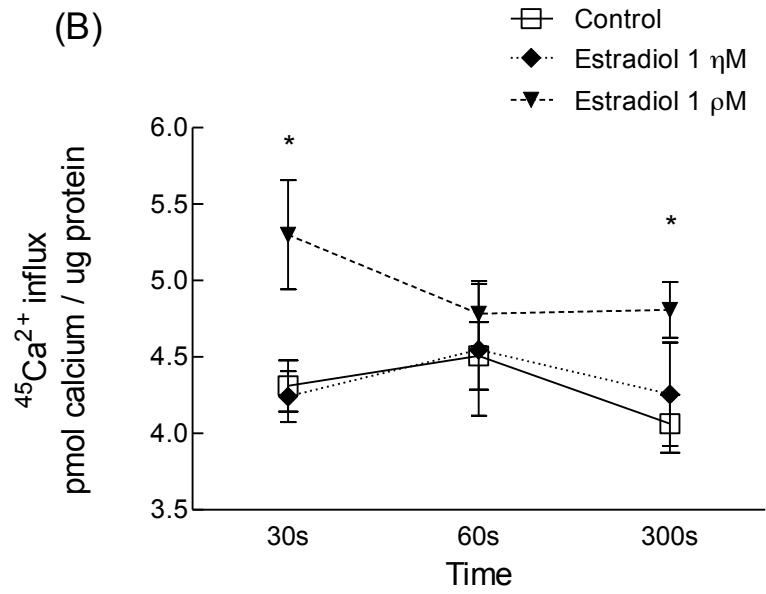
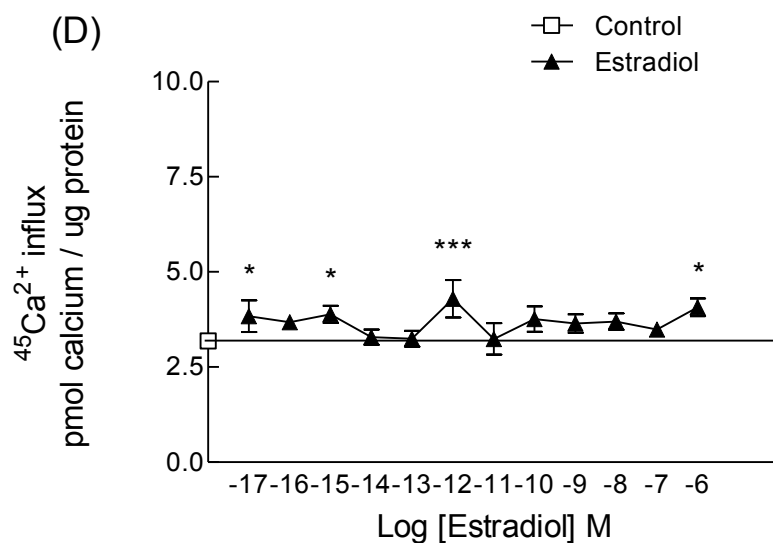


Fig. 1: Chemical structure of bisphenol A and estradiol.

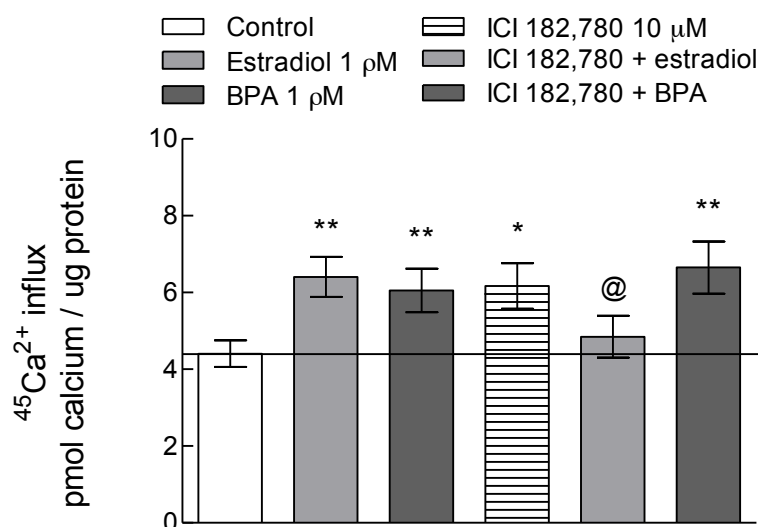




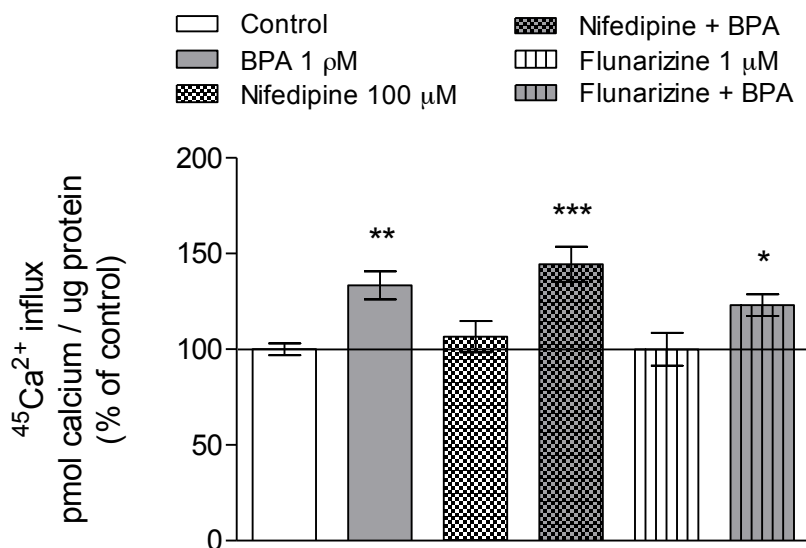




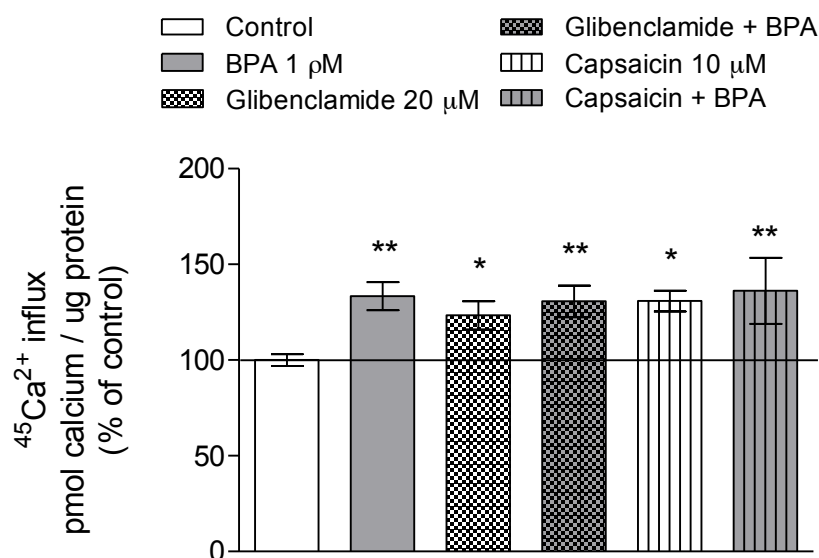
**Fig. 2:** BPA and estradiol effects on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testis. (A) and (B) correspond to BPA and estradiol time-course curves, respectively. (C) and (D) correspond to BPA and estradiol dose-response curves. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group.



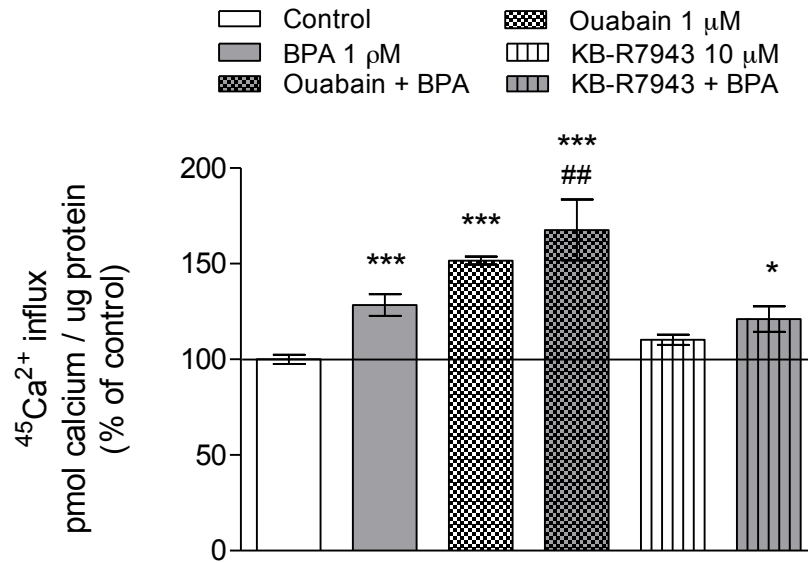
**Fig. 3:** Involvement of the classic estrogen receptors, ESR1 and ESR2, in the effects of BPA and estradiol on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. The classic estrogen receptor antagonist, ICI 182,780, was added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared to control group. @ $p < 0.05$ , compared to estradiol group.



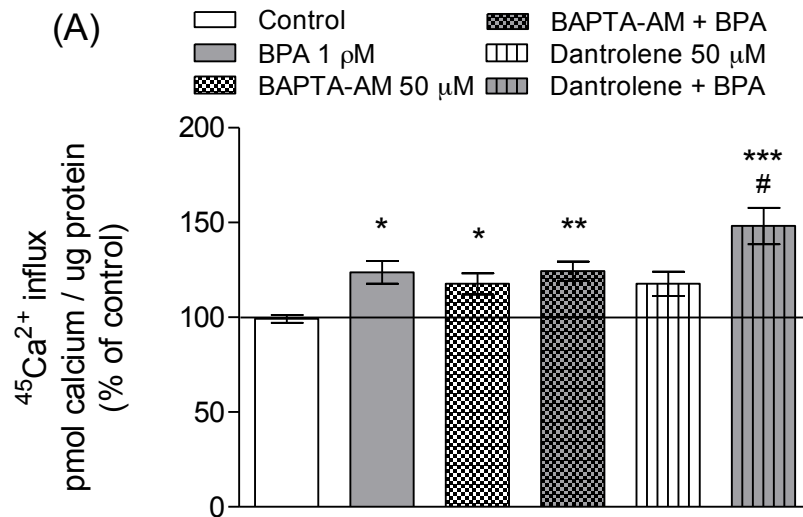
**Fig. 4:** Involvement of voltage-dependent calcium channels (VDCC) in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. VDCC type L and type T antagonists Nifedipine and Flunarizine were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group.

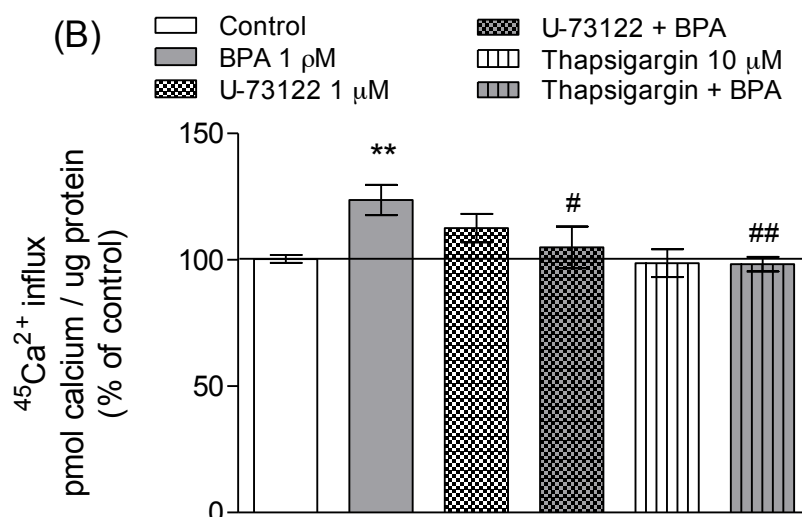


**Fig. 5:** Involvement of ATP-dependent potassium channels and TRPV1 channel in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. The ATP-dependent potassium channels antagonist, Glibenclamide, and the TRPV1 agonist, Capsaicin, were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group.

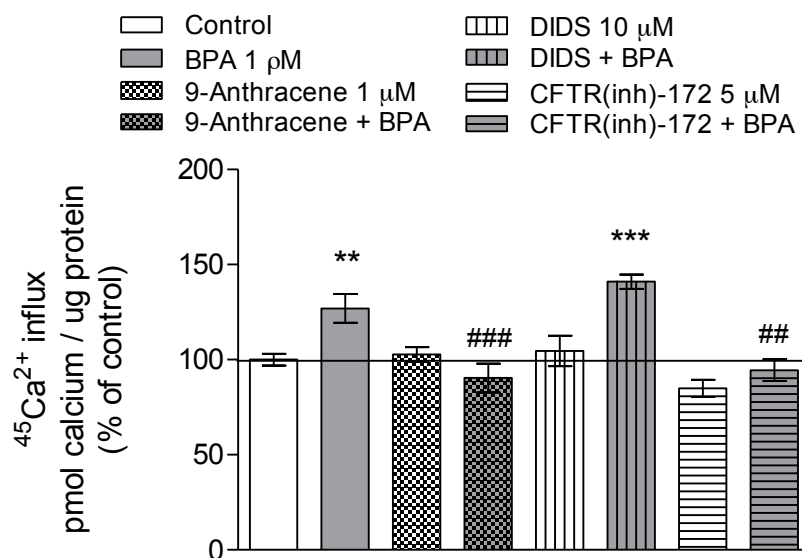


**Fig. 6:** Involvement of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump and the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitors, Ouabain and KB-R7943, were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group. ## $p < 0.01$ , compared to BPA group.

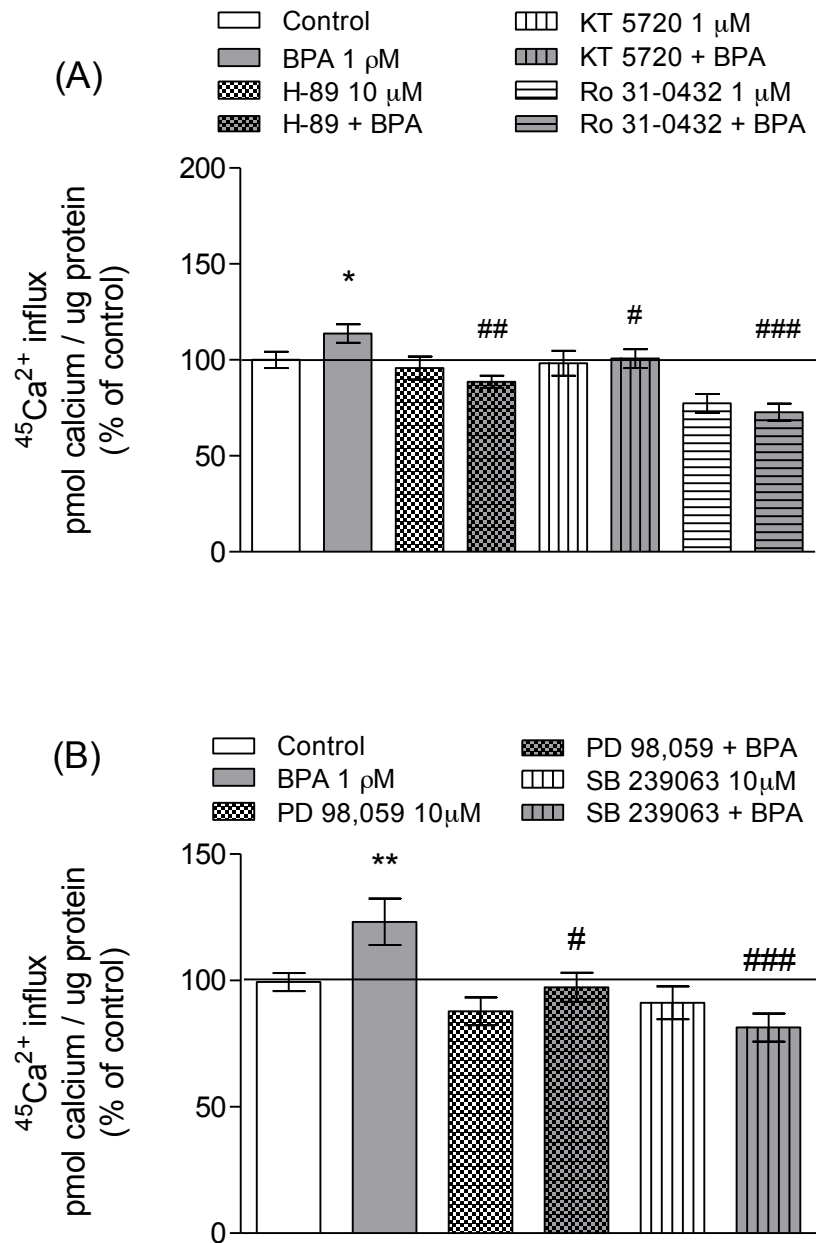




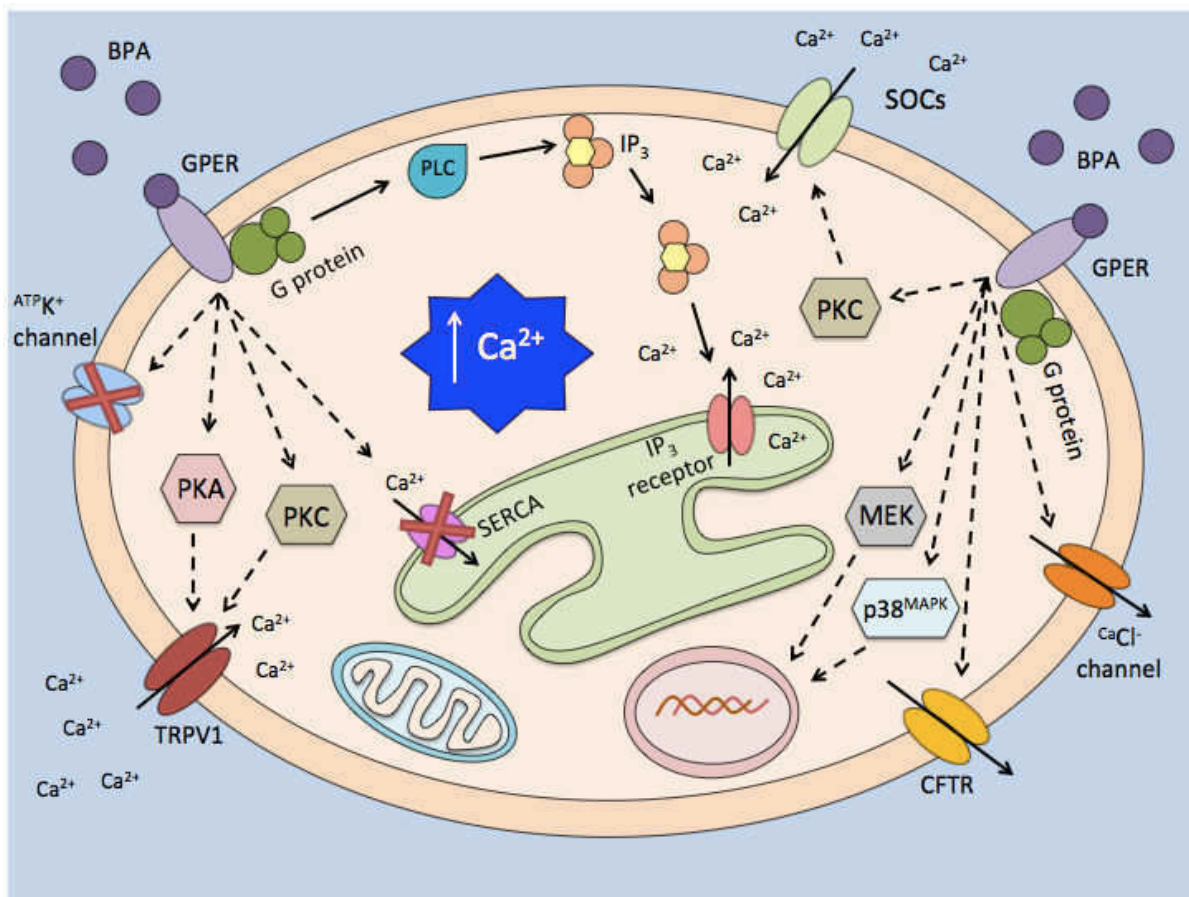
**Fig. 7:** Involvement of  $i[\text{Ca}^{2+}]$  in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. (A)  $i[\text{Ca}^{2+}]$  chelator BAPTA-AM, ryanodine receptor antagonist Dantrolene and (B) Phospholipase C inhibitor U-73122 and SERCA inhibitor Thapsigargin were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group. # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$ , compared to BPA group.



**Fig. 8:** Involvement of chloride channels in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channel antagonist 9-anthracene, voltage-dependent chloride channel antagonist DIDS and CFTR channel antagonist CFTR(inh)-172 were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group. ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$ , compared to BPA group.



**Fig. 9:** Involvement of (A) PKA, PKC and (B) MAPKs in the effects of BPA on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in 30-day-old rat testes. PKA inhibitors, H-89 and KT 5720, PKC inhibitor Ro 31-0432, MEK inhibitor PD 98,059 and p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB 239063 were added 15 minutes before treatment. Incubation time = 5 min. Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments with four animals in each group per experiment. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared to control group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$ , compared to BPA group.



**Fig. 10:** Schematic representation of BPA-induced calcium signalling pathways on 30-day-old rat testis. Bisphenol A (BPA) binds to G protein-coupled estrogen receptor (GPER), activates phospholipase C (PLC), which catalyses the hydrolysis of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacyl glycerol. IP<sub>3</sub> then acts in the endoplasmic reticulum to open IP<sub>3</sub>-receptor to stimulate calcium release. BPA can also inhibit the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) to increase the concentration of intracellular calcium ([Ca]<sub>i</sub>). The depletion of calcium in the endoplasmic reticulum then stimulates the opening of store-operated calcium channels (SOCs). Several plasma membrane ionic channels seem to be involved in the stimulation of calcium influx by BPA, such as transient receptor potential vanilloid channels (TRPV1), calcium dependent chloride channels (Ca<sup>2+</sup>Cl<sup>-</sup> channel), ATP-dependent potassium channels (ATP<sup>+</sup>K<sup>+</sup> channel) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel (CFTR). Some of these channels may be modulated through the action of kinase proteins, such as protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) that also participate in the effects of BPA. Other enzymes that seem to participate in the effect of BPA are MAP kinase kinase (MEK) and p38<sup>MAPK</sup> (p38), which could also indicate a crosstalk between nongenomic initiation effects that may converge with genomic effects. Straight lines are direct pathways; dotted lines represent multi-step pathways

**APÊNDICE C – Manuscrito artigo 3**

**Title: Genomic and nongenomic effects of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>, estradiol and bisphenol A in adult rat Leydig cells: crosstalk signalling pathways**

Authors: Renata Gonçalves<sup>1,2,3,4</sup>, Fernanda Carvalho Cavalari<sup>1</sup>, Monica Andressa Wessner do Nascimento<sup>1</sup>, Bianca Costa Bernardo<sup>1</sup>, Christelle Delalande-Lecapitaine<sup>2,3,4</sup>, H  l  ne Boura  ma-Lelong<sup>2,3,4</sup>, Fátima Regina Mena Barreto Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina, Brazil;*

<sup>2</sup>*Normandie Univ, France;*

<sup>3</sup>*UNICAEN, Laboratoire Estrog  nes, Reproduction, Cancer, CAEN cedex 5, France;*

<sup>4</sup>*INRA USC 2006, CAEN cedex 5, France.*

\*Corresponding author: Dr. Fátima Regina Mena Barreto Silva. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail address: mena.barreto@ufsc.br, Tel/Fax: +55-48.3721.6912/9672

**Abstract**

1 $\alpha$ ,25-dihydroxvitamina D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>), the active form of vitamin D, is synthesized from cholesterol by skin exposure to the sun followed by two hydroxylations involving 25-hydroxylase enzyme (coded by CYP27A1 and CYP2R1 genes) and 1 $\alpha$ -hydroxylase (coded by CYP27B1 gene). 1,25-D<sub>3</sub> actions are mediated by vitamin D receptor (VDR) in the nucleus and plasma membrane, resulting in genome and nongenomic actions, respectively. In the plasma membrane, PDIA3 protein can also act as a 1,25-D<sub>3</sub> receptor. Vitamin D has an important role in reproductive function, since fertility reduction was observed in vitamin D deficient rats, as well as VDR and 1 $\alpha$ -hydroxylase deficiency. In these animals, calcium and estrogen supplementation was able to reverse the deleterious effects in reproductive function, indicating that there is a relation between 1,25-D<sub>3</sub> and estrogens signaling pathways. Estradiol (E2) is synthesized from testosterone by aromatase enzyme (CYP19). E2 is found in high levels in the male reproductive function, and like 1,25-D<sub>3</sub> can induce genomic and nongenomic actions, mediated by ESR1, ESR2 and G protein-coupled estrogen receptor (GPER). Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen utilized in plastic industry, capable of modulating the endocrine system through E2 receptors. The aim of this work was to study genomic (gene expression) and nongenomic (calcium influx) effects on the metabolism and signaling pathways of 1,25-D<sub>3</sub> and E2, as well as BPA influence in Leydig cells. 1,25-D<sub>3</sub> decreased CYP27A1 gene expression, an effect that was also observed when cells were coincubated with 1,25-D<sub>3</sub> and E2. E2 decreased ESR1 and CYP19 gene expression. Both hormones demonstrated a negative feedback mechanism over their own metabolism in these cells. 1,25-D<sub>3</sub> was able to stimulate calcium influx, while E2 had the opposite effect. From these results we can conclude that 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA have important molecular effects in the male reproductive system, through gene expression control over receptors and enzymes involved in the metabolism of the steroid hormones studied. These results also reinforce the theory that there is a relationship between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signalling pathways, as well as 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA also have non-genomic actions in calcium signalling.

**Keywords:** 1,25-D<sub>3</sub>, estradiol, Bisphenol A, calcium, testis.



## 1. Introduction

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>), the active form of vitamin D, can be obtained from the diet or by endogenous synthesis. Through the exposition of the skin to UVB rays, 7-dehydrocholesterol is converted to vitamin D<sub>3</sub>, which is hydroxylated in the liver to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by 25-hydroxylase enzyme coded by CYP2R1 and CYP27A1. 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is then hydroxylated a second time in the kidneys to form the active form 1,25-D<sub>3</sub> by 1 $\alpha$ -hydroxylase enzyme coded by CYP27B1 (MIZWICKI; NORMAN, 2009; NORMAN, 2008). 1,25-D<sub>3</sub> acts through the classic vitamin D receptor (VDR) or the membrane receptor PDIA3 (protein disulfide isomerase family A, member 3) (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995; DE BOLAND; NEMERE, 1992; KHANAL; NEMERE, 2007; NEMERE et al., 1998, 2004; NORMAN et al., 2002). Both metabolizing enzymes and 1,25-D<sub>3</sub> receptors presence has been described in the male reproductive tract, where the hormone seems to have an important role in the development and maintenance of reproductive functions (BLOMBERG JENSEN et al., 2010; JENSEN, 2014; JOHNSON et al., 1996).

Estradiol (E2) is a steroid hormone commonly known for its importance in the female reproductive tract, yet its presence and importance in the male reproductive tract has been featured since the 1960's. E2 is synthesized by the aromatase enzyme, which irreversibly converts testosterone to estrogens, including E2. E2 is present in high concentrations in the rete testis together with classic estrogen receptors (ERs) ESR1 and ESR2 and aromatase, which are expressed through all the male reproductive tract (JAYLE et al., 1962; O'DONNELL et al., 2001). The absence of ERs leads to impairment of the spermatogenesis process and infertility (CARREAU; HESS, 2010; EDDY et al., 1996; LUBAHN et al., 1993). E2 can act through the classical ERs at nuclear level and also through the same receptors at the plasma membrane, leading to rapid, nongenomic responses (HELDRING et al., 2007). E2 can also bind to the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) at the plasma membrane to initiate nongenomic responses, and this receptor is also expressed in testicular cells (CHIMENTO et al., 2014; FILARDO, 2002). Regarding estrogen activity, some endocrine disruptors can act as xenoestrogens, binding and activating ERs. Bisphenol A (BPA) is a compound widely used in plastic industry (HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013). It is able to bind to ESR1, ESR2 and GPER, with harmful effects already described for reproductive function (BOUSKINE et al., 2009; FENICHEL; CHEVALIER; BRUCKER-DAVIS, 2013; GAIDO et al., 1997; VILELA et al., 2014; XI et al., 2011).

Several studies demonstrate a connection between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signalling pathways (ZANATTA et al., 2017). Knockout models for VDR show a decrease in aromatase expression and activity, sperm count and motility. They also show an increase in LH and FSH plasma concentrations and altered ESR1 expression, although some models present contrasting results (BLOMBERG JENSEN et al., 2013; KINUTA et al., 2000). The supplementation with estrogens in the Kinuta model was able to reverse almost every change, indicating a crosstalk between 1,25-D<sub>3</sub> and E2 signalling pathways. Also, in a model where CYP27B1 was silenced, animals were infertile with low concentrations of E2 and high LH and FSH (SUN et al., 2015). Moreover, 1,25-D<sub>3</sub> is able to stimulate aromatase expression in Sertoli cells (ZANATTA et al., 2011a).

Leydig cells are responsible for testosterone and estrogen synthesis in the testis through steroidogenesis, among other hormones and growth factors (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003). In adult rats they are the main site of E2 synthesis, together with germ cells (O'DONNELL et al., 2001). A wide range of factors regulate the steroidogenic process, most importantly LH through the hypothalamic pituitary axis (HPA), testosterone and estradiol themselves, and calcium signalling (COSTA; VARANDA; FRANCI, 2010; HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003).

The aim of this work was to analyse genomic and nongenomic effects of 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA on adult rat Leydig cells. At a genomic approach, the effects of 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA on the expression of several enzymes and receptors were investigated. The expression of enzymes participating in 1,25-D<sub>3</sub> and E2 synthesis, such as CYP27A1 and CYP19, together with its receptors was examined. At a nongenomic approach, the influence of these compounds on calcium influx was analysed in these cells.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Chemicals*

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-D<sub>3</sub>), bisphenol A (BPA), bovine serum albumin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), estradiol (E2), flunarizine, H-89 dihydrochloride hydrate, Ham's F12 medium, penicillin/streptomycin, sodium bicarbonate and TRI Reagent were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM/Ham's F12 mixture without phenol red, Collagenase type I and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Percoll was purchased from GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, USA). Deoxyribose nucleotide triphosphate (dNTP), Random

hexamers, Ribonuclease inhibitor (RNasin), Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) and GoTaq qPCR Master Mix were purchased from Promega (Madison, USA). Primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). [ $^{45}\text{Ca}$ ]CaCl<sub>2</sub> (sp. act. 321 KBq/mg Ca<sup>2+</sup>), and Optiphase Hisafe III biodegradable scintillation liquid were purchased from Perkin–Elmer (Boston, USA). All other chemicals were of analytical grade.

## 2.2. *Animals*

Seventy-day-old male Wistar rats were used in this work. The animals were bred in the animal facilities of Centre Universitaire de Ressources Biologiques from Caen University in France and Federal University of Santa Catarina in Brazil. The animals were housed in an air-conditioned room ( $21 \pm 2$  °C) with controlled lighting (12 h/12 h light/dark cycle). All animals were maintained with pelleted food and tap water available ad libitum. The animal procedures were carried out in accordance with the ethical recommendations of the local Regulations of French Government (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture) and Ethical Committee for Animal Use from Brazil (Protocol CEUA/PP00862).

## 2.3. *Leydig cell culture*

Leydig cells were isolated as previously described (MURUGESAN et al., 2008; SCHUMACHER et al., 1978). Seventy-day-old rat testes were decapsulated and incubated in Ham's F12/DMEM (1:1) medium with 0.25 mg/mL collagenase for 15 min at 34 °C. Then two consecutive gravitational sedimentations were made, where the supernatant containing the Leydig cells was removed. The supernatant was filtered with nylon mesh and centrifuged at 2500 g for 10 min. The sediment was recovered and the cells were deposited in a Percoll gradient for the purification of Leydig cells. The cells recovered from the gradient were washed and centrifuged for total elimination of Percoll. The cells were then counted and seeded in 6-wells plates (2.000,000 cells / well) in Ham's F12 / DMEM medium without phenol red supplemented with antibiotics (penicilin / streptomycin 50 U/mL) and 10% foetal bovine serum at 34 °C in an atmosphere 5% CO<sub>2</sub> / 95% O<sub>2</sub> for 24 h. After this time, the treatments with 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and/or BPA were realized.

## 2.4 *Treatments*

For genomic assays (gene expression), cells were treated in Ham's F12 / DMEM medium without phenol red in the presence or absence of 1,25D<sub>3</sub>, E2, BPA and testosterone

( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) for 3, 6, 10 or 24 h. After incubation time, the medium was eliminated and the cells were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for RNA extraction. For nongenomic assays (calcium influx), cells were treated as described in the item 2.6 of Materials and methods.

### 2.5 RNA extraction and real-time RT-PCR

Total RNA was extracted using a TRI-Reagent kit (Sigma-Aldrich) following the manufacture's instructions. The RNA concentration in the samples was quantified by optical density by absorbance at 260 nm. The RNA quality was verified by measuring optical density at 260 and 280 nm (260/280). Reverse transcription was realized with 500 ng of total RNA. The reaction was carried out with a final volume of 20  $\mu\text{L}$ , with 100 ng random primers, 200 nM of each dNTP, 12 IU RNAsin and 200 IU MMLV RT in reaction buffer (Promega). The mixture was incubated for 90 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and after that more 5 min at  $70^{\circ}\text{C}$ . The negative control was realized by adding water instead of RNA. The polymerase chain reaction was performed with 5  $\mu\text{L}$  of diluted cDNA (1:10) using GoTaq® qPCR Master Mix (SYBR green mix – Bio-Rad) and 0.3  $\mu\text{M}$  of each primer (Table 1). The negative control was realized by adding water instead of cDNA. The amplification reaction was carried out in a Stratagene Mx3005 P system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) as follows: an initial step of 3 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 45 cycles of 15s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 120s at  $60^{\circ}\text{C}$ . At the end of the amplification, an increase in  $0.5^{\circ}\text{C}$  every 10s from  $50^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  allowed to obtain the melt curve. PCR efficiency was determined for each set of primers (Table 1) and was contained between 87% and 110%. The expression of the analyzed genes was normalized with control gene L19 by the formula  $2^{-(\text{CtL19}-\text{Ctgene})}$  (TENA-SEMPERE et al., 2002).

**Table 1:** Primers used in real-time RT-PCR

Gene	Sequence (5'-3')	Size of amplified product (pb)
<i>L19</i> <sup>A</sup> (NM_031103.1)	<b>F:</b> GGAATCTAAGAAGATTGACCGTC <b>R:</b> GCCTTGTCTGCCTTCAGTTT	120 pb
<i>VDR</i> <sup>B</sup> (NM_017058)	<b>F:</b> TGACCCACCTACGCTGACT <b>R:</b> CCTTGGAGAATAGCTCCCTGTACT	79 pb
<i>PDIA3</i> <sup>A</sup> (NM_017319.1)	<b>F:</b> TAAAGATGCCTCGGTGGTGG <b>R:</b> ACGTTGGTGTGTGCAAATCG	114 PB
<i>Cyp2r1</i> <sup>A</sup>	<b>F:</b> CCCACGTCTACATGAGGAAGC	92 pb

(NM_001108499.1)	<b>R:</b> CACCCACTCCCATTTTTGTCAT	
<i>Cyp27a1</i> <sup>A</sup> (NM_178847.3)	<b>F:</b> AACAGGTCAAGACCGACCGC <b>R:</b> CCGTACTTGGCCTTGTTTCAGC	141 pb
<i>Cyp19</i> <sup>A</sup> (M33986.1)	<b>F:</b> CGTCATGTTGCTTCTCATCG <b>R:</b> TACCGCAGGCTCTCGTTAAT	150pb
<i>ESR1</i> <sup>C</sup> (X61098)	<b>F:</b> AATTCTGACAATCGACGCCAG <b>R:</b> GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	345 pb

<sup>A</sup> Genbank sequences.

<sup>B</sup> Design based on Zanatta et al. (ZANATTA et al., 2011a).

<sup>C</sup> Design based on Chimento et al. (CHIMENTO et al., 2010).

## 2.6. <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx

After the isolation procedure, Leydig cells were washed in Krebs Ringer-bicarbonate (KRb) buffer (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) and counted. 1,000,000 cells were used for each sample. Cells were then preincubated in KRb for 15 min in a Dubnoff metabolic incubator at 34 °C, pH 7.4 and gassed with an O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> mixture (95:5; v/v). The medium was replaced with fresh KRb with 0.1 µCi/mL <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> and samples were incubated for 60 min. Finally, the cells were incubated for 30, 60 or 300 s either in the absence (control) or the presence of 1,25-D<sub>3</sub>, E2 or BPA (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-9</sup> or 10<sup>-12</sup> M). In some experiments channel blockers or kinase inhibitors were added 15 min before treatment addition and maintained for the whole incubation period. At the end of the incubation period, extracellular <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> was thoroughly washed off the samples in 127.5 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 11 mM glucose, and 10 mM LaCl<sub>3</sub>, pH 7.3 (30 min in washing solution). After washing, cells were homogenized with 0.5 M NaOH solution and aliquots were placed in scintillation fluid and then in a LKB rack beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter–Beckman Coulter, Boston, USA) (ZAMONER et al., 2007). A second aliquot was used for total protein quantification by the Lowry method (LOWRY et al., 1951). Results were expressed as pmol calcium/ug of protein, sometimes in % of control.

## 2.7. Statistical analysis

Data was expressed as mean ± S.E.M. for ug protein or as % of control from determinations realized in 3 to 4 independent experiments. Statistic comparisons were realized using Student

t test or one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. The differences found were considered statistically significant for  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA effects in the expression of genes related to 1,25-D<sub>3</sub> signalling pathways

After treatment with 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA the expression of VDR, CYP2R1 and CYP27A1 genes was analysed. None of the compounds altered VDR or CYP2R1 expressions in the time and concentration curves (data not shown). Regarding PDIA3 (alternative 1,25-D<sub>3</sub> membrane receptor), only BPA at  $10^{-9}$  M was able to alter PDIA3 gene expression (figure 1).

1,25-D<sub>3</sub> alone as well as 1,25-D<sub>3</sub> coincubated with E2 was able to decrease CYP27A1 gene expression (figure 2). To verify if these hormones could act at longer periods, 3, 6, 10 and 24 h incubations were realized. As can be seen in figure 3, 1,25-D<sub>3</sub> and 1,25-D<sub>3</sub> + E2 were able to alter CYP27A1 gene expression only at shorter periods of incubation, which suggests a possible rapid effect of these hormones in these cells.

#### 3.2. 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA effects in the expression of genes involved in E2 signalling pathways

Regarding genes involved in E2 signalling, the expression of ESR1 and aromatase (CYP19) genes was analysed. Among the treatments used, only E2 at  $10^{-7}$  M had an effect in the expression of these genes (figure 4 and 5).

#### 3.3. 1,25-D<sub>3</sub>, E2 and BPA effects in calcium influx in adult Leydig cells

To study the role of E2, BPA and 1,25-D<sub>3</sub> on rapid responses, Leydig cells were incubated with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  and then treated with the compounds (at  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-12}$  M) for short period incubations (30, 60 and 300s). As it can be seen in figure 6, E2 seems to inhibit  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx, although results were not statistically different. BPA had no effect (data not shown). However, 1,25-D<sub>3</sub> stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx at 60s (figure 6).

### 4. Discussion

Testosterone synthesis is one of the most important functions of Leydig cells. Testosterone is synthesized from cholesterol by steroidogenesis, a series of reactions

catalysed by specific enzymes located at the mitochondrial and microsomal membranes of Leydig cells (AZHAR; REAVEN, 2007). At the end of the process, testosterone can be converted to E2 by aromatase enzyme activity. Leydig cells together with germ cells are the major source of estrogen production in the adult rat testis. The presence of aromatase gene and enzymatic activity together with ERs expression in these cells demonstrate the importance of estrogens to the regulation of reproductive function and development (O'DONNELL et al., 2001).

Estrogens are able to regulate various functions in Leydig cells. Estrogen exposition in immature animals inhibits Leydig cell proliferation and differentiation (ABNEY, 1999). Testosterone production is also altered by estrogen exposure (BARTKE; WILLIAMS; DALTERIO, 1977) by the inhibition of enzymes participating in the steroidogenesis process (BRINKMANN et al., 1980; HSUEH; DUFAU; CATT, 1978; STRAUSS et al., 2009). Androgens produced in Leydig cells are able to control the metabolism and inactivation of estrogens, modulating the estrogen sulfotransferase enzyme production (QIAN; SONG, 1999). Considering these factors, it is evident that estrogens can have a paracrine action in the testis by controlling Leydig cell development.

In this work we demonstrated that Leydig cell treatment with E2 at high concentrations ( $10^{-7}$  M) inhibits aromatase and ESR1 expression in short periods of incubation. This effect could be associated with the inhibitory effect of estrogens in Leydig cell metabolism and also on the metabolism of the hormone itself by negative feedback (ABNEY, 1999; O'DONNELL et al., 2001). Although it was already shown that E2 is able to increase aromatase expression and activity in longer periods, it is evident that this effect is dependent on the concentration and incubation time in these cells (BOURGUIBA et al., 2003; GENISSEL; LEVALLET; CARREAU, 2001). Corroborating with our results, an inhibitory effect of E2 on its own metabolism was already seen in seminiferous tubules culture (ZANATTA et al., unpublished data) (ZANATTA, 2015).

1,25-D<sub>3</sub> and E2 were also able to decrease CYP27A1 gene expression in short periods of incubation. 1,25-D<sub>3</sub> effect on its own metabolism indicates a negative feedback effect, as it was already described by Jensen (JENSEN, 2014). Our results demonstrate that there is a synergism in 1,25-D<sub>3</sub> and E2 effects on CYP27A1 gene expression in Leydig cells in these short periods of treatment. 1,25-D<sub>3</sub> seems to have important effects on these cells. VDR knockout animals show decreased aromatase expression and activity, with increased LH and FSH plasmatic levels (KINUTA et al., 2000) and decreased ERs expression in the testis (BLOMBERG JENSEN et al., 2013).

Steroidogenesis in Leydig cells is mostly controlled by LH by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. When GnRH produced by hypothalamus stimulates the pituitary gland, the release of FSH and LH in the circulation is triggered. While FSH acts mostly in Sertoli cells, LH stimulates Leydig cells to produce testosterone. Testosterone, in turn, acts in the hypothalamus and pituitary gland to inhibit GnRH and gonadotropins secretion, in a negative feedback mechanism. E2 is also able to modulate hormone secretion by the HPG axis (CHIMENTO et al., 2014). There is evidence that shows that 1,25-D<sub>3</sub> might have regulatory effects on the mechanisms of hormone secretion in the pituitary gland, as VDR is expressed in this tissue (WANG; ZHU; DELUCA, 2012). 1,25-D<sub>3</sub> stimulates steroidogenesis and testosterone synthesis in human testicular cells (HOFER et al., 2014) with a synergic effect with LH. Also, it was already demonstrated that treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) increases CYP2R1 protein expression in MA-10 Leydig cell line (FORESTA et al., 2013). Since hCG and LH share the same receptor, this could indicate that LH is capable of regulating 1,25-D<sub>3</sub> metabolism in Leydig cells, indicating that 1,25-D<sub>3</sub> has a important role in these cells. Considering this, some works suggest that estrogens are capable of modulating LH receptors in Leydig cells, altering hormone responsiveness in these cells. It was already demonstrated an increase in the responsiveness of Leydig cells to LH in monkeys treated with an aromatase inhibitor (O'DONNELL et al., 2001; SHETTY et al., 1998).

Several works demonstrate that certain signalling pathways, such as PKA, AKT, PI3K, PKC, MAPKs and intracellular calcium signalling proteins also control hormonal regulation in Leydig cells (AZHAR; REAVEN, 2007). LH action in these cells promotes adenylyl cyclase activation, increasing cAMP concentration. LH receptor stimulation also activates PLC, increasing IP<sub>3</sub> and diacylglycerol levels. Both processes are able to modulate cytosolic calcium levels. Besides participating in cellular secretion mechanisms, calcium is also essential for steroidogenesis (COSTA; VARANDA; FRANCI, 2010). Despite the importance of this ion, little is known about calcium mechanism of action in Leydig cells. Here we show that E2 is able to inhibit calcium influx by Leydig cells in short periods related to rapid responses at the plasma membrane. Since calcium is required for steroidogenesis, this effect could also be related to the negative feedback caused by E2 on Leydig cells. 1,25-D<sub>3</sub> in turn was able to increase calcium influx in these cells at very low concentrations, an effect already described in immature rat testis and Sertoli cells (ROSSO et al., 2012; ZANATTA et al., 2011b, 2011c). Considering the influence of 1,25-D<sub>3</sub> in calcium



metabolism and signalling, it is possible that this hormone could also have important regulatory actions in Leydig cell metabolism and steroidogenesis process.

In the present study it was demonstrated that 1,25-D<sub>3</sub> and E2 could act inhibiting their own metabolism through a negative feedback mechanism in adult rat Leydig cells. Also, E2 was able to inhibit calcium influx in a nongenomic way. On the other side, 1,25-D<sub>3</sub> was able to increase calcium influx. Therefore we can conclude that these hormones appear to have an important role in Leydig cells metabolism and in the steroidogenesis process, yet further studies are necessary to clarify these effects.

## 5. Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq n° 472071/2013-0) and Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES). RG (CNPq n° 204568/2014-5), FCC, MAWN are registered on the PPG-Biochemistry/UFSC. FRMBS is recipient of CNPq productivity fellowship. We thank LAMEB I-CCB/UFSC technicians for their support. We also thank Prof. Bóris Stambuk/UFSC by technical support.

## 6. References

- ABNEY, T. O. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v. 64, n. 9, p. 610–617, set. 1999.
- AZHAR, S.; REAVEN, E. Regulation of Leydig Cell Cholesterol Metabolism. In: **The Leydig cell in health and disease**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007. p. 135–148.
- BARTKE, A.; WILLIAMS, K. I.; DALTERIO, S. Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 645–649, dez. 1977.
- BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p. 1303–1311, 1 maio 2010.
- BLOMBERG JENSEN, M. et al. Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 377, n. 1–2, p. 93–102, set. 2013.
- BOUILLON, R.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. W. Structure-Function Relationships in the Vitamin D Endocrine System. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 2, p. 200–257, 1995.

- BOURGUIBA, S. et al. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 335–343, set. 2003.
- BOUSKINE, A. et al. Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 7, p. 1053–1058, jul. 2009.
- BRINKMANN, A. O. et al. A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 801–809, nov. 1980.
- CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1517–1535, 27 maio 2010.
- CHIMENTO, A. et al. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 320, n. 1–2, p. 136–144, 14 maio 2010.
- CHIMENTO, A. et al. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Testis Axis and Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, 2014.
- COSTA, R. R. et al. Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells. **Cell Calcium**, v. 49, n. 3, p. 191–199, mar. 2011.
- COSTA, R. R.; VARANDA, W. A.; FRANCI, C. R. A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells. **AJP: Cell Physiology**, v. 299, n. 2, p. C316–C323, 1 ago. 2010.
- DE BOLAND, A. R.; NEMERE, I. Rapid actions of vitamin D compounds. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 32–36, maio 1992.
- EDDY, E. M. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796–4805, nov. 1996.
- FENICHEL, P.; CHEVALIER, N.; BRUCKER-DAVIS, F. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. **Annales d'Endocrinologie**, v. 74, n. 3, p. 211–220, jul. 2013.
- FILARDO, E. J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 80, n. 2, p. 231–238, 2002.
- FORESTA, C. et al. Altered bone status in unilateral testicular cancer survivors: Role of CYP2R1 and its luteinizing hormone-dependency. **Journal of Endocrinological Investigation**, n. 6, jun. 2013.
- GAIDO, K. W. et al. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 205–212, mar. 1997.

GENISSEL, C.; LEVALLET, J.; CARREAU, S. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. **The Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 95–105, jan. 2001.

HELDRING, N. et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 905–931, 1 jul. 2007.

HOEKSTRA, E. J.; SIMONEAU, C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate—A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 386–402, jan. 2013.

HOFER, D. et al. Testicular Synthesis and Vitamin D Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 10, p. 3766–3773, out. 2014.

HOLSTEIN, A.-F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2003.

HSUEH, A. J.; DUFAU, M. L.; CATT, K. J. Direct inhibitory effect of estrogen on Leydig cell function of hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 103, n. 4, p. 1096–1102, out. 1978.

JAYLE, M. F. et al. [Excretion of phenol steroids and 17-ketosteroids after the administration of chorionic gonadotropins to men]. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 7, p. 212–220, mar. 1962.

JENSEN, M. B. Vitamin D and male reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 175–186, 14 jan. 2014.

JOHNSON, J. A. et al. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, n. 1, p. 7–15, jan. 1996.

KHANAL, R. C.; NEMERE, I. The ERp57/GRp58/1,25D<sub>3</sub>-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1087–1093, 2007.

KINUTA, K. et al. Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1317–1324, 2000.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUBAHN, D. B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11162–11166, 1 dez. 1993.

MIZWICKI, M. T.; NORMAN, A. W. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. **Science Signaling**, v. 2, n. 75, p. re4, 2009.

MURUGESAN, P. et al. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 25, n. 4, p. 447–454, ago. 2008.

NEMERE, I. et al. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> which mediates rapid activation of protein kinase C. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 9, p. 1353–1359, set. 1998.

NEMERE, I. et al. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> membrane binding protein (1,25D<sub>3</sub>-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7392–7397, 11 maio 2004.

NORMAN, A. W. et al. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2-vitamin D 3. **Steroids**, v. 67, n. 6, p. 457–466, 2002.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 491S–499S, 2008.

O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 3, p. 289–318, 2001.

QIAN, Y. M.; SONG, W. C. Regulation of estrogen sulfotransferase expression in Leydig cells by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and androgen. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1048–1053, mar. 1999.

ROSSO, A. et al. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 146–154, jan. 2012.

SCHUMACHER, M. et al. Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. **FEBS letters**, v. 91, n. 2, p. 333–338, 15 jul. 1978.

SHETTY, G. et al. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). **Steroids**, v. 63, n. 7–8, p. 414–420, ago. 1998.

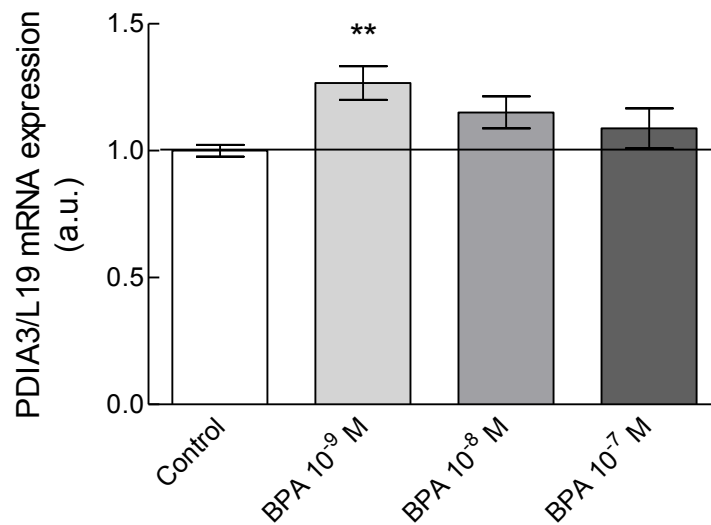
STRAUSS, L. et al. Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2865–2872, jun. 2009.

SUN, W. et al. Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 1, p. E51–E62, 1 jan. 2015.

TENA-SEMPERE, M. et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 717–725, fev. 2002.

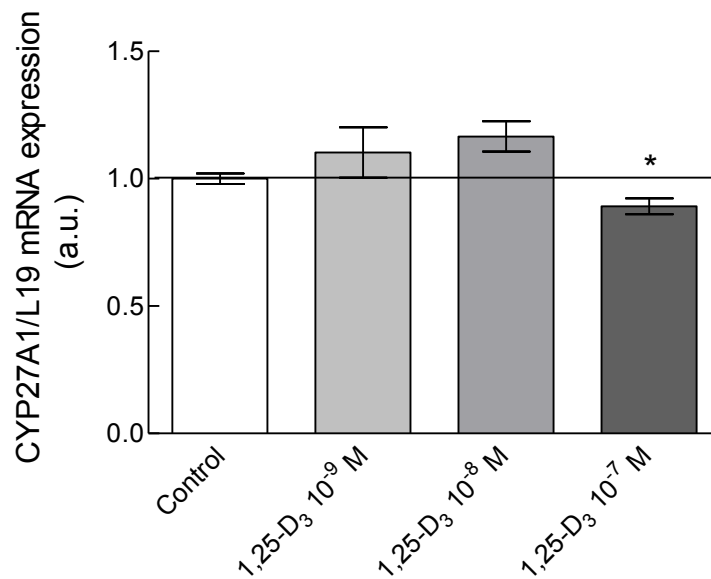
- VILELA, J. et al. Sperm impairments in adult vesper mice ( *Calomys laucha* ) caused by in utero exposure to bisphenol A. **Andrologia**, v. 46, n. 9, p. 971–978, nov. 2014.
- WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 1 jul. 2012.
- XI, W. et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus–pituitary–gonadal axis of CD-1 mice. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 409–417, maio 2011.
- ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on  $45\text{Ca}^{2+}$  uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 1, p. 98–103, jan. 2007.
- ZANATTA, A. P. **Função dos hormônios tireoideos e da  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina D3 em células testiculares de ratos imaturos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- ZANATTA, A. P. et al. Interactions between oestrogen and  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions. **Basic and Clinical Andrology**, v. 27, n. 1, dez. 2017.
- ZANATTA, L. et al. Regulation of aromatase expression by  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 in rat testicular cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 5, p. 725, 2011a.
- ZANATTA, L. et al. Effect of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, n. 1–2, p. 46–53, nov. 2011b.
- ZANATTA, L. et al.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 Signaling Pathways on Calcium Uptake in 30-Day-Old Rat Sertoli Cells. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10284–10292, 29 nov. 2011c.

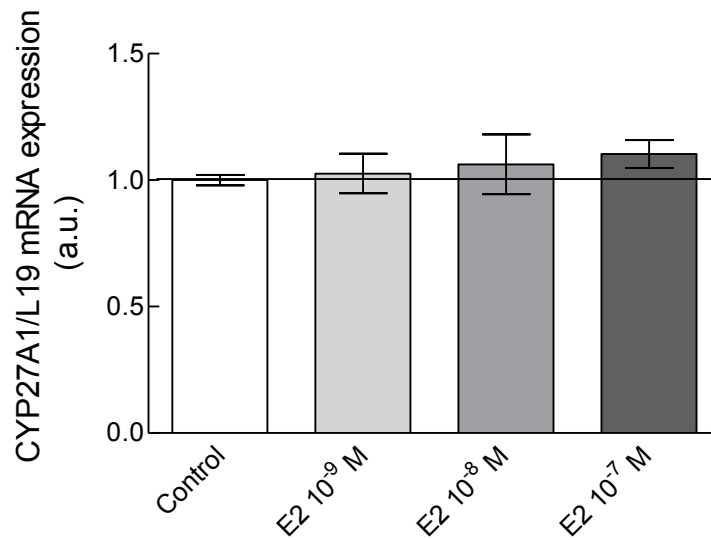
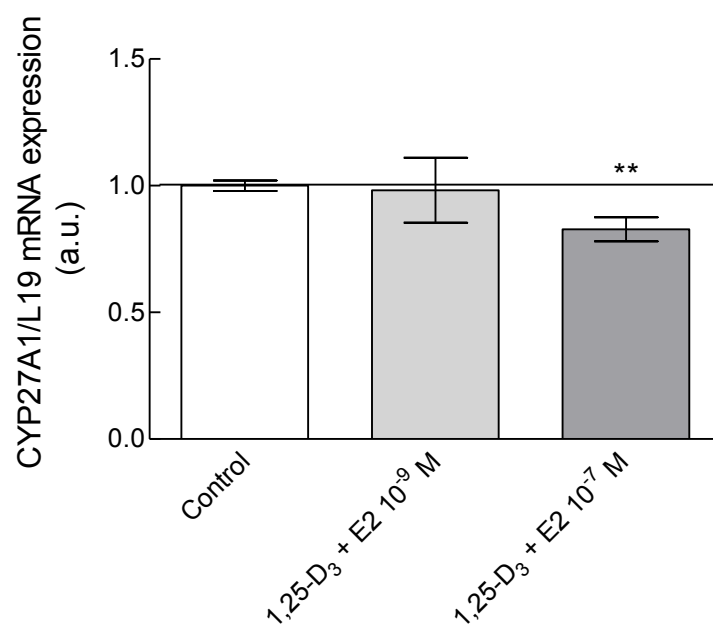
## Figures



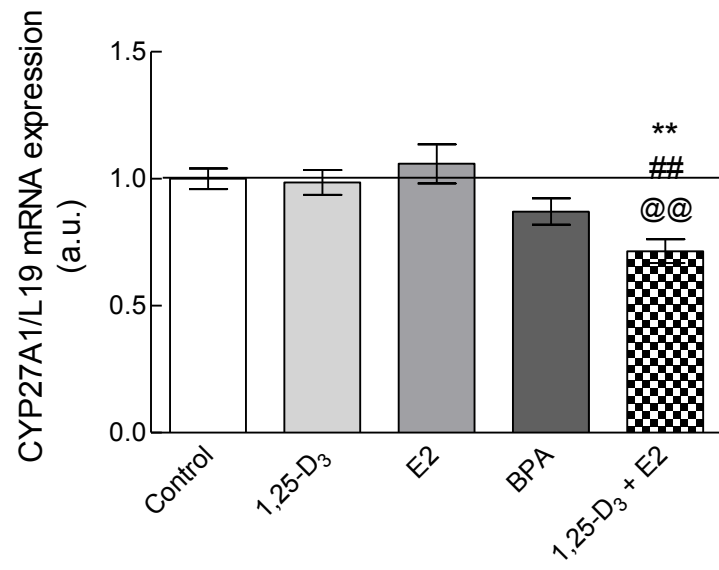
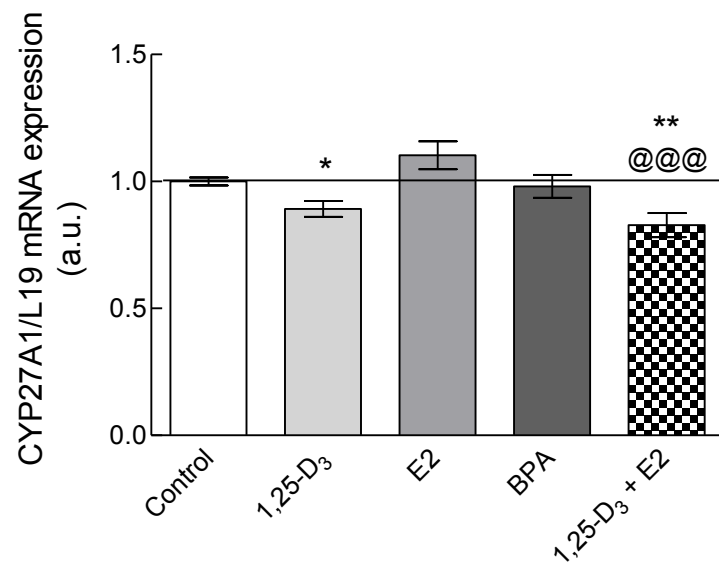
**Figure 1:** Semiquantitative real-time PCR analysis of PDIA3 mRNA expression on Leydig cells from adult rats treated in vitro with BPA. Incubation time: 6 h. Relative quantity of PDIA3 mRNA was normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. \*\*  $p < 0.01$  when compared to control group.

(A)

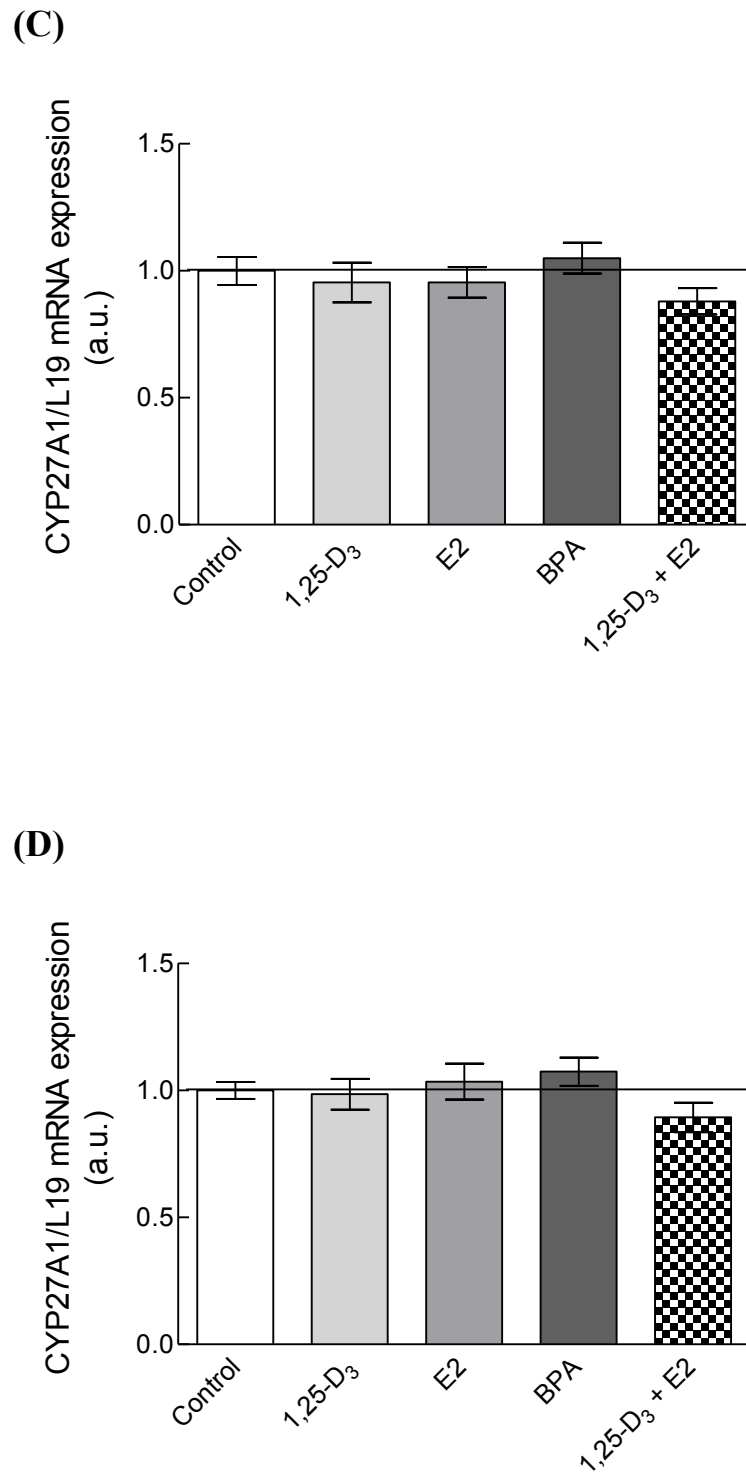


**(B)****(C)**

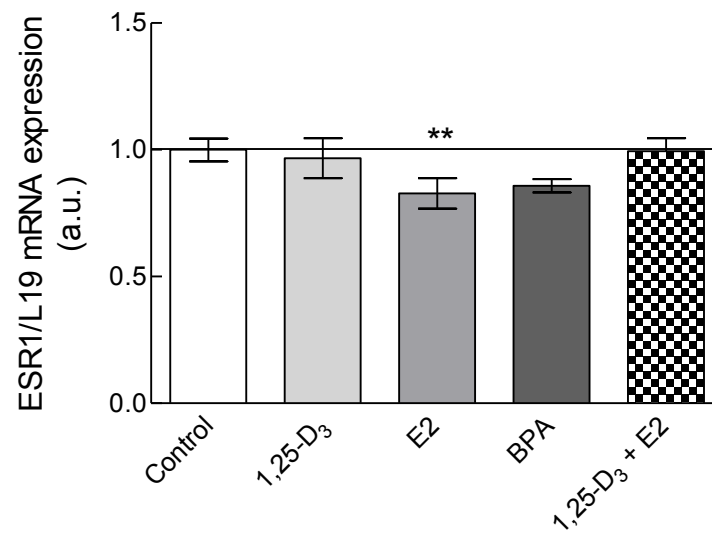
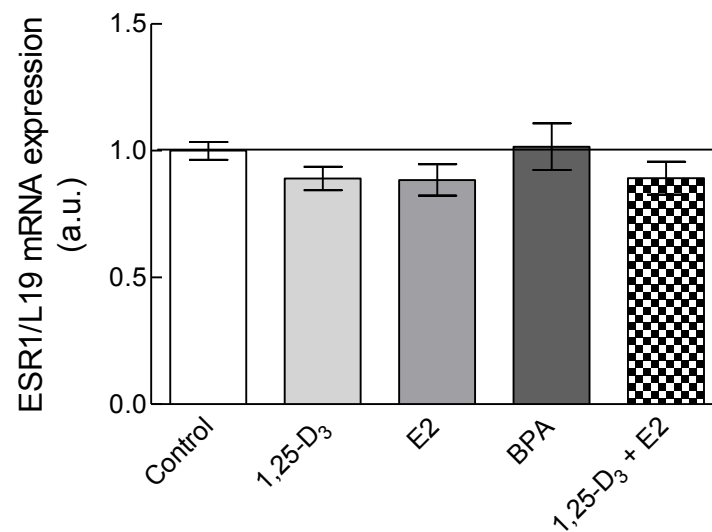
**Figure 2:** Semiquantitative real-time PCR analysis of CYP27A1 mRNA expression on Leydig cells from adult rats treated in vitro with 1,25-D<sub>3</sub> and/or E2. Incubation time: 6 h. Relative quantity of CYP27A1 mRNA was normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  when compared to control group.

**(A)****(B)**



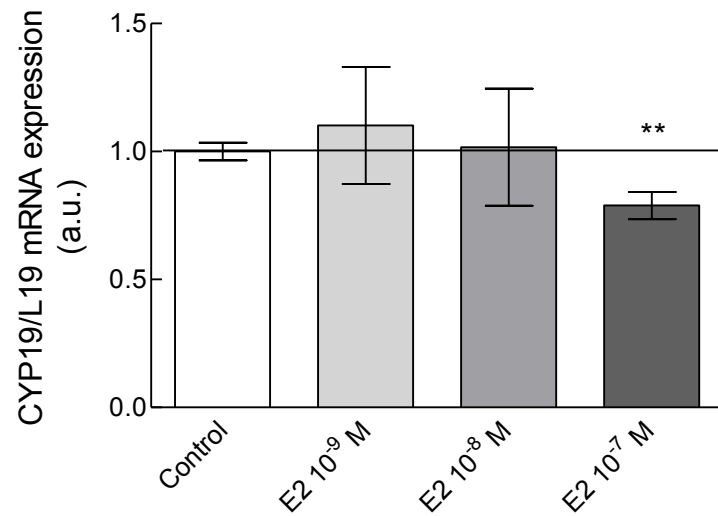


**Figure 3:** Semiquantitative real-time PCR analysis of CYP27A1 mRNA expression on Leydig cells from adult rats treated in vitro with 1,25-D<sub>3</sub> and/or E2 and BPA. Incubation time: (A) 3 h, (B) 6 h, (C) 10 h and (D) 24 h. Relative quantity of CYP27A1 mRNA was normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 when compared to control group; ## $p$  < 0.01 when compared do 1,25-D<sub>3</sub> group; @@ $p$  < 0.01 and @@@ $p$  < 0.001 when compared to E2 group.

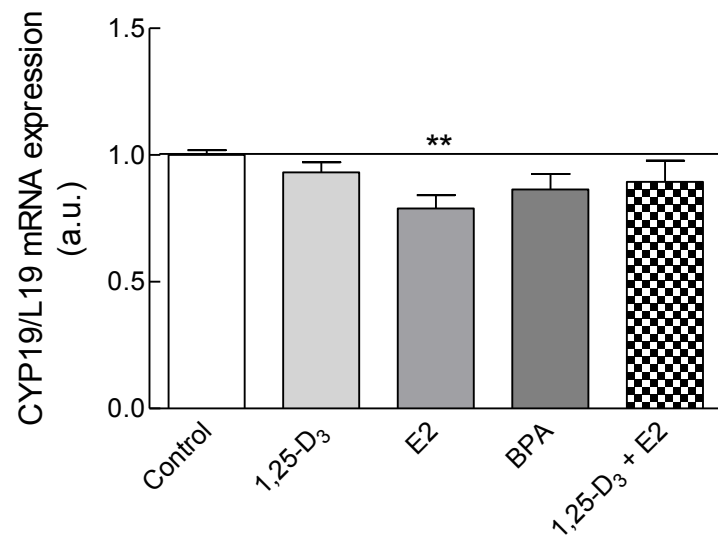
**(A)****(B)**

**Figure 4:** Semiquantitative real-time PCR analysis of ESR1 mRNA expression on Leydig cells from adult rats treated in vitro with 1,25-D<sub>3</sub> and/or E2 and BPA. Incubation time: (A) 3 h and (B) 6 h. Relative quantity of ESR1 mRNA was normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. \*\*  $p < 0.01$  when compared to control group.

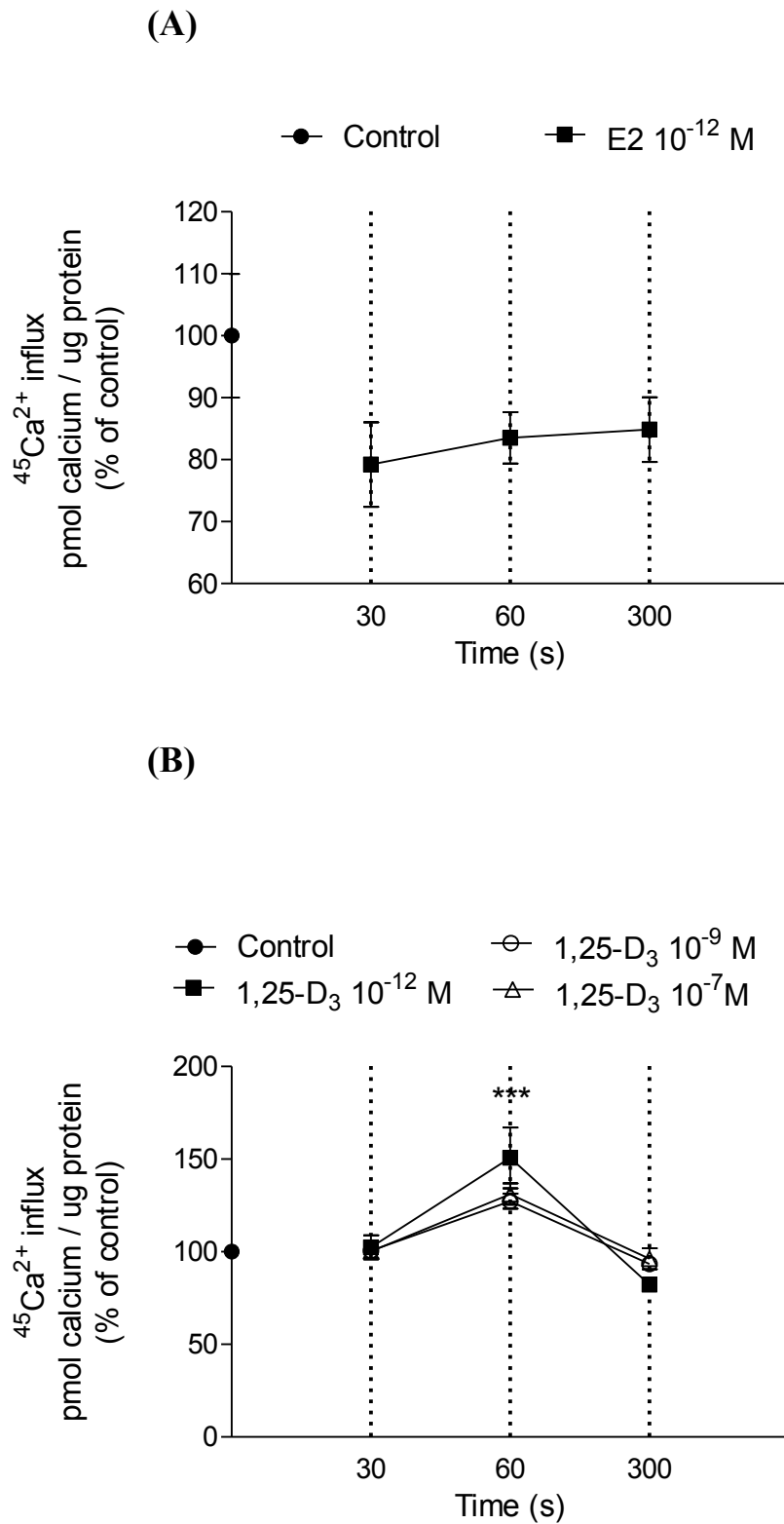
(A)



(B)



**Figure 5:** Semiquantitative real-time PCR analysis of CYP19 mRNA expression on Leydig cells from adult rats treated in vitro with 1,25-D<sub>3</sub> and/or E2 and BPA. Incubation time: (A, B) 6 h. Relative quantity of CYP19 mRNA was normalized by ribosomal protein L19 mRNA and results expressed as fold change compared with control values. Data are represented as mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. \*\*  $p < 0.01$  when compared to control group.



**Figure 6:** E2 and 1,25-D<sub>3</sub> effects on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in adult rat Leydig cells treated in vitro. A time-course curve was realized for E2 at  $10^{-12}$  M (A) and time and dose-response curves were realized for 1,25-D<sub>3</sub> (B). Values are means  $\pm$  S.E.M. of two independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control group.