

WIVIANE ALVES DE ASSIS

**Mapeamento de cofatores SRC1, NCoR e REA nos testículos, ductulos eferentes e
próstata de ratos**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Março/2018

WIVIANE ALVES DE ASSIS

**Mapeamento de cofatores SRC1, NCoR e REA nos testículos, ductulos eferentes e
próstata de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Biologia Celular.
Orientador: Dra. Cleida Aparecida de Oliveira.

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Março/2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Assis, Wiviane Alves de

Mapeamento de cofatores SRC1, NCoR e REA nos testículos, ductulos eferentes e próstata de ratos [manuscrito] / Wiviane Alves de Assis. - 2018.

125 f. : il.

Orientadora: Cleida Aparecida de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1.SRC1. 2.NCoR. 3.REA. 4.Sistema genital masculino.
I.Oliveira, Cleida Aparecida de. II.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III.Título.



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

WIVIANE ALVES DE ASSIS

190/2018
entrada
1º/2014
2014659596

Às treze horas e trinta minutos do dia 28 de março de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**MAPEAMENTO DE COFATORES SRC1, NCOR E REA NOS TESTÍCULOS, DÚCTULOS EFERENTES E PRÓSTATA DE RATOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cleida Aparecida de Oliveira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta	UFV	APROVADA
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADA
Dra. Mariana Machado Neves	UFV	APROVADA

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de março de 2018.**

Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira (Orientadora) Cleida

Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta _____

Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar Gleide

Dr^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida FRCb Almeida

Dr^a. Mariana Machado Neves Mariane

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, ICB/UFMG

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Cleida Aparecida de Oliveira, e contou com o auxílio financeiro Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq-UFMG).

- Aos meus pais e minhas irmãs que sempre me deram forças para ir em busca dos meus sonhos.

- À minha orientadora, Professora Cleida Aparecida de Oliveira por não medir esforços para que esse trabalho desse certo e por todos os valiosos ensinamentos ao longo de o meu doutorado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda oportunidade que me oferece e por me dar forças para enfrentar toda e qualquer dificuldade!

À minha família, que sem o apoio incondicional eu jamais teria chegado até aqui! Essa conquista eu dedico totalmente à minha mãe, Geny, meu pai Antônio (também conhecido pelos íntimos como “seu Assis” ou tio Tonho) e as minhas irmãs Wanessa e Walkíria. Obrigada por tudo!

À Cleida, minha orientadora, obrigada pela coragem de aceitar orientar uma pessoa que reiniciou a “vida científica” em pleno doutorado! Não tenho palavras por todo conhecimento profissional que me proporcionou e por abrir as portas da biologia da reprodução para mim, algo que eu buscava desde a iniciação científica. Serei eternamente grata por tudo!

À toda equipe de excelência do LABRE, pela convivência e pelos valiosos aprendizados diários. Sentirei saudades de ouvir os casos do Germán. À Mônica, Lelê, Elis, eternamente “labreanas”! Ao #perfeito Gabriel, e às mestrandas “pós-doc” Bruna e Hipácia. Vocês são tecnicamente impecáveis e admiráveis, além de pessoas de excelente convívio. Infinitamente obrigada por tudo! Queria deixar registrado que já doe minha lapiseira preta para o LABRE, mas não esquece onde colocou tá, Gabriel?

Aos vizinhos de laboratório, membros do LABER: fui tantas vezes nesse laboratório que me sentia até envergonhada! Obrigada por todo apoio não só técnico como, muitas vezes, emocional também! Aos Professores Hélio e Fernanda, sempre muito doces e gentis. Ao André que tem um coração proporcional à sua altura. As “Thaíses”, sempre queridas. E um agradecimento especial ao Fernando e ao agregado mais famoso do LABER, o Kennedy. Quem diria que participar de um evento científico iria me trazer duas grandes amigas! Tenho muito que agradecer vocês dois por me dar apoio todas as vezes que eu precisei, amizade para a vida toda! Os nossos cafés agora Fernando precisam ser em outro lugar, diferente da lanchonete do ICB. De preferência em um lugar que tenha açaí para chamar o Kennedy (owwwn! – P.S.: só eles vão entender essa).

À professora Gleide, obrigada pelo auxílio na identificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e pelas conversas sempre agradáveis! E a todos do Laboratório de Biologia Celular por me emprestar várias coisas, de água destilada a anticorpo!

Aos amigos que a UFOP me proporcionou! De 06.2 para a vida toda!

À minha tia, Tetê, obrigada por me abrigar aqui em BH no início do meu doutorado. E a minha prima Hérika, por me apresentar BH, principalmente o outro lado diferente da Pampulha!

Aos professores do programa e aos funcionários do departamento de Morfologia do ICB/UFMG e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos vocês, o meu mais sincero e profundo agradecimento. **MUITO OBRIGADA!**

Coragem não é ausência de medo, e sim avançar, apesar do medo.

Caio Carneiro

RESUMO

O sistema genital masculino é controlado por hormônios esteroides sexuais, entre eles andrógenos e estrógenos. Seus efeitos biológicos são mediados por receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ER α e ER β), membros da superfamília dos receptores nucleares. Esses receptores alternam entre os estados de ativação e repressão da transcrição, dependendo da presença ou ausência de hormônio, respectivamente. Suas atividades transcricionais ocorrem em associação com proteínas correguladoras, que podem ser coativadoras ou correpressoras da transcrição. Dentre esses cofatores, estão os membros da família de coativadores dos receptores esteroides SRC1, bem como o correpressor de receptores nucleares NCoR e os repressores de atividade de receptores de estrógenos REA. Acredita-se que diferenças tecido-específicas na composição de cofatores sejam responsáveis pelas diferentes respostas dos receptores esteroides a ligantes. Dessa forma, o objetivo da presente proposta foi de mapear e comparar a distribuição celular de SRC1, NCoR e REA, durante o desenvolvimento pós-natal até a senilidade, em órgãos chave do sistema genital masculino de ratos, que possuem expressão diferencial e/ou coexpressão de AR, ER α e ER β . Usando ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência, encontramos que nos testículos, as células de Sertoli foram positivas para NCoR e REA e, com variação estágio dependente, para SRC1. Nas células germinativas houve expressão diferencial dos cofatores, com variação estágio específica. A distribuição celular e subcelular para REA e ER β foi similar em espermatogônias indiferenciadas, paquítenos tardios (VII a XII), diplótenos e espermátides arredondadas. Os dados obtidos fornecem evidências de que REA e NCoR podem regular negativamente a proliferação e diferenciação espermatogonial, bem como as fases finais da meiose I e fases iniciais da espermiogênese, enquanto coativação por SRC1 pode modular mitose de espermatogônias indiferenciadas e eventos da prófase I, exceto os que envolvem paquítenos nas fases VII-VII, os quais não expressam a proteína. Durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento dos testículos, a expressão de REA não variou e foi semelhante a expressão de ER β . Nos ductos eferentes e próstata ventral, SRC1 e NCoR foram expressos no epitélio a partir do período pós-natal, e de forma intermitente no mesênquima e células musculares lisas e conjuntivas dele diferenciadas. As proteínas exploradas nesse estudo são cofatores de numerosos fatores transcricionais, de forma que sua expressão diferencial em células testiculares, dos ductos eferentes e prostáticas indicam que eles possam desempenhar funções específicas nesses órgãos alvo, modulando função transcricional tanto por AR, ER α e ER β . Em conjunto com a literatura, nossos dados fornecem evidência de distribuição diferencial desses cofatores, que não se limitam a células responsivas a andrógenos, mas houve destaque para a maior coincidência com expressão de ER β , reforçando assim uma fundamental participação dos estrógenos na reprodução masculina.

Palavras-chave: Receptores de estrógenos. Receptores de andrógenos. SRC1. NCoR. REA. Testículos. Ductos eferentes. Próstata.

ABSTRACT

The male genital system is controlled by sex steroid hormones, among them androgens and estrogens. Their biological effects are mediated by the androgen (AR) and estrogen (ER α and ER β) receptors, members of the nuclear receptor superfamily. These receptors alternate between states of activation and repression of transcription, depending on the presence or absence of hormone, respectively. Their transcriptional activities occur in association with coregulators proteins, which can be coactivators or corepressors the transcription process. These cofactors are members of the steroid receptor cofactor family (SRC), the nuclear receptor corepressor (NCoR) and repressor of estrogen receptor activity (REA) or prohibitin 2. The tissue-specific differences in the composition of cofactors are possibly responsible for the different responses of steroid receptors to ligands. Thus, the objective of this work was to evaluate and compare the cellular distribution of these cofactors in organs of the male genital system of rats, which have differential expression and/or coexpression of estrogen receptors ER α and ER β . Using immunohistochemistry and immunofluorescence assays, we found that in the testes, Sertoli cells were positive for NCoR and REA and presented stage-dependent positivity for SRC1. Germ cells were positive for all cofactors, with stage-specific variation. During postnatal development and aging of the testes, REA's subcellular localization was similar to ER β 's and did not change with aging. In the efferent ductules, SRC1 and NCoR were expressed in ciliated and non-ciliated epithelium cells in all regions of this segment, as well as in smooth muscle cells and the surrounding connective tissue. In the prostate, SRC1 and NCoR were similarly expressed in epithelial and mesenchymal cells, being present in epithelial and stromal cells after cytodifferentiation. In summary, the differential expression of these cofactors in testicular cells, efferent ductules and prostate indicates that they can perform specific functions in these target organs, modulating transcriptional function by AR, ER α and/or ER β . Our data provide evidence of differential distribution of these cofactors, which are not limited to androgen responsive cells, but there was a greater coincidence with ER β expression, thus reinforcing a fundamental participation of estrogens in male reproduction.

Keywords: Estrogen receptors. Cofactors. SRC. NCoR. REA. Testis. Efferent ductules. Prostate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do Sistema genital masculino de roedores	14
Figura 2 – Desenvolvimento e diferenciação do trato genital em mamíferos	19
Figura 3 – Representação esquemática dos ductulos eferentes de ratos	21
Figura 4 – Representação esquemática da organização da próstata de roedores	25
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura dos receptores de estrógenos AR, ER α e ER β	31
Figura 6 – Ligação dos cofatores ao DNA	35
Figura 7 – Representação esquemática da estrutura e interações dos coativadores da família p160	37
Figura 8 – Representação esquemática da estrutura do corepressor NCoR	40
Figura 9 – Western blotting dos cofatores NCoR, SRC1 e REA em próstata ventral (VP) e testículo (T) de ratos	50
Figura 10 – Expressão de SRC1 nos testículos de ratos Wistar de 1 a 10 dias de idade	54
Figura 11 – Expressão de SRC1 em testículos de ratos Wistar adultos	55
Figura 12 – Intensidade de SRC-1 em células de Sertoli de testículos de ratos Wistar ao longo do ciclo do epitélio seminífero	56
Figura 13 – Expressão de NCoR em testículos de ratos Wistar adultos	57
Figura 14 – Expressão de REA em testículos de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade	59
Figura 15 – Expressão de REA e ER β em testículos de ratos Wistar adultos	63
Figura 16 – Expressão de ER β em testículos de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade	65
Figura 17 – Expressão de SRC-1 nos ductulos eferentes de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade	70
Figura 18 – Expressão de SRC-1 nos ductulos eferentes e segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar adultos	71
Figura 19 – Proporção de células epiteliais imunopositivas e negativas para SRC-1 nos ductulos eferentes de ratos Wistar adultos	72
Figura 20 – Expressão de NCoR nos ductulos eferentes e segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar adultos	73
Figura 21 – Expressão de SRC-1 na próstata ventral de ratos Wistar de 1 a 60 dias de idade	75
Figura 22 – Expressão de SRC-1 na próstata ventral de ratos Wistar adultos	76
Figura 23 – Expressão de NCoR na próstata ventral de ratos Wistar de 1 a 30 dias de idade	78
Figura 24 – Expressão de NCoR na próstata ventral de ratos Wistar adultos	79
Figura 25 – Representação esquemática da expressão de cofatores SRC1, NCoR e REA e ER β ao longo do ciclo do epitélio seminífero de ratos	94

LISTA DE QUADROS

Quadro I – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência	49
Quadro II – Expressão do REA nos testículos de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal a adulto	61
Quadro III – Expressão do ER β nos testículos de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto	67
Quadro IV – Expressão de SRC1 e NCoR na próstata ventral de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal e adultos	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	SISTEMA GENITAL MASCULINO	14
1.1.1	Testículos	15
1.1.1.1	Morfologia e Função	15
1.1.1.2	Origem e Desenvolvimento	18
1.1.2	Dúctulos Eferentes	20
1.1.2.1	Morfologia	21
1.1.2.2	Origem e Desenvolvimento	22
1.1.2.3	Funções	23
1.1.3	Próstata	24
1.1.3.1	Próstata de Roedores	24
1.1.3.2	Morfologia e Função	26
1.1.3.3	Origem e Desenvolvimento	27
1.1.4	Regulação Hormonal	29
1.1.4.1	Distribuição dos Receptores de Andrógenos e Estrógenos	32
1.1.5	Coreguladores De Hormônios Nucleares	35
1.1.5.1	SRC	36
1.1.5.2	NCoR	39
1.1.5.3	REA	41
1.1.6	Justificativa	43
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	ANIMAIS	47
3.2	COLETA DE TECIDOS	47
3.3	MORFOLOGIA	47
3.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	47
3.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL	48
3.6	WESTERN BLOTTING	49
3.7	ANÁLISES QUANTITATIVAS	50
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
4	RESULTADOS	52
4.1	TESTÍCULOS	53
4.1.1	Imunolocalização de SRC1	53
4.1.2	Imunolocalização de Ncor	56
4.1.3	Imunomarcção para REA ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto	58
4.1.4	Imunomarcção para Erβ ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto.	64
4.2	DÚCTULOS EFERENTES	68
4.2.1	Imunomarcção Para SRC1	68
4.2.2	Imunomarcção Para Ncor	72
4.3	PRÓSTATA VENTRAL	74
4.3.1	Imunomarcção Para SRC1	74
4.3.2	Imunomarcção Para Ncor	77
5	DISCUSSÃO	81
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – SISTEMA GENITAL MASCULINO

O sistema genital masculino de mamíferos é composto pelas gônadas, os testículos, pelas vias genitais intra e extratesticulares - rede testicular, ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes e uretra, pelas glândulas sexuais acessórias - próstata, glândula vesicular e glândula bulbouretral, e pelo órgão copulador, o pênis (Figura 1) (Russell et al, 1990; Lee et al, 2009; Konoblaugh e True, 2012). Em seu conjunto, esses órgãos são responsáveis pela produção, transporte, estocagem, nutrição, proteção dos gametas masculinos, os espermatozoides e condução do sêmen para o exterior (Setchell e Breed, 2006). Por serem os principais alvos de nossos estudos, os testículos, os ductos eferentes e a próstata serão objeto de uma descrição mais detalhada.

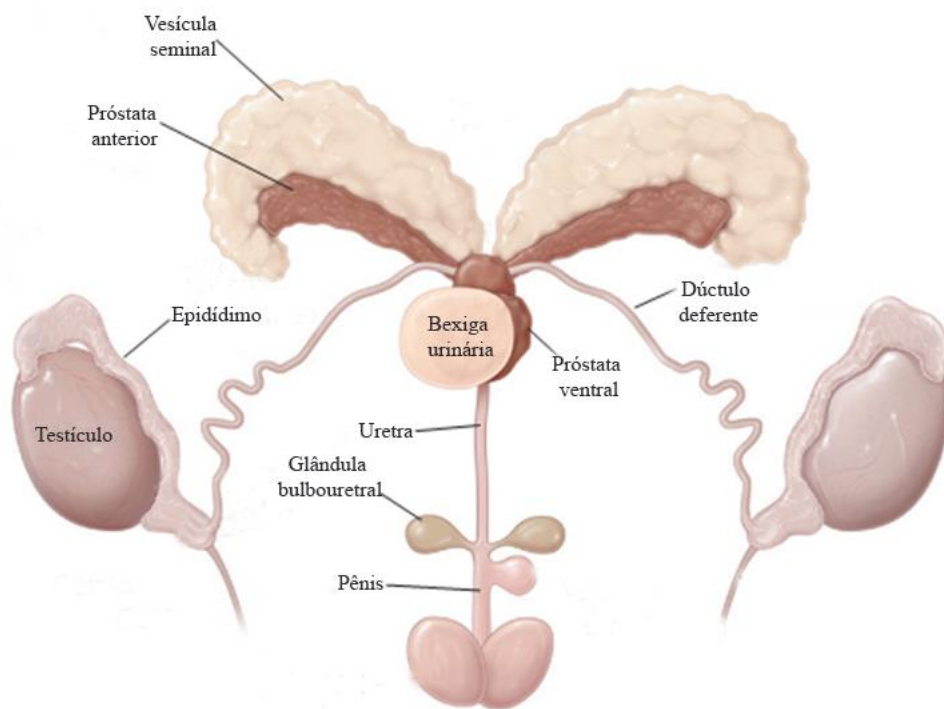


Figura 1 - Anatomia do sistema genital masculino de roedores.

Adaptado de Konoblaugh and True, 2012.

1.1.1 - Testículos

1.1.1.1 - Morfologia e Função

Os testículos de mamíferos são órgãos pares localizados no escroto, fora da cavidade abdominal, responsáveis pela produção dos espermatozoides e de hormônios que coordenam a reprodução masculina, especialmente andrógenos (Sharpe, 1983; Russell et al, 1990; Russell e França, 1995; Kerr et al, 2006; Weinbauer et al, 2010; Schlatta e Ehmcke, 2014). Possuem formato oval e são envoltos por espessa camada de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea. A camada mais interna da túnica albugínea, também conhecida como túnica vascular, é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, o qual contém vasos sanguíneos e linfáticos. Na superfície posterior dos testículos, a túnica albugínea se espessa para formar o mediastino testicular, o qual emite septos para o interior do testículo, delimitando os lóbulos testiculares. Cada lóbulo contém de um a quatro túbulos seminíferos, sustentados pelo estroma de tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, além de células de Leydig (Sharpe, 1983; Russell et al, 1990; Russell e França, 1995; Kerr et al, 2006; Weinbauer et al, 2010; Schlatta e Ehmcke, 2014).

Os túbulos seminíferos são convolutos e se dispõem em forma de alça terminando em tubos curtos denominados tubos retos. Os túbulos seminíferos são revestidos pelo epitélio seminífero, que se apoia na membrana basal e são envolvidos pela túnica própria (Russell et al, 1990; Kerr et al, 2006; Weinbauer et al, 2010).

O epitélio seminífero é formado por células somáticas e germinativas, estas responsáveis pela produção dos espermatozoides (Russell et al, 1990; Kerr et al, 2006; Weinbauer et al, 2010). As células de Sertoli são as células somáticas do epitélio seminífero. São células colunares que se estendem da base até o lúmen e possuem processos apicais e laterais, o que permite a elas suportarem as células germinativas nas diferentes fases ao longo do ciclo espermatogênico (Russell, 1998; Kerr, 2006; Hess e França, 2007; Weinbauer et al, 2010; Hess e Vogl, 2015). Seu núcleo é oval orientado muitas vezes em ângulo reto com a membrana basal, possuindo frequentemente profunda endentação e nucléolo proeminente (Russell et al, 1990).

Além da função de suporte, as células de Sertoli secretam uma série de fatores essenciais para a espermatogênese tais como: a proteína de ligação a andrógenos (ABP), que concentra a testosterona nos túbulos seminíferos; inibina, responsável por inibir a

produção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise; hormônio anti-mulleriano, o qual promove a regressão dos ductos paramesonéfricos no início da formação do sistema genital masculino; fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e moduladores da divisão celular (Russell, 1998; Griswold, 1998; Weinbauer et al, 2010; Chen e Liu, 2015). As células de Sertoli se unem umas às outras por junções de oclusão, formando a barreira das células de Sertoli, que impede que substâncias contidas no sangue e agentes nocivos entrem em contato com as células germinativas em etapas mais avançadas da diferenciação, além de criar um ambiente de isolamento para as espermatídes, as quais possuem diferença antigênica das células somáticas e poderiam desencadear resposta autoimune (Russell et al, 1990; Russell e Griswold, 1993; Hess e França, 2005). Essa barreira divide o epitélio seminífero em dois ambientes: um compartimento basal, onde são encontradas as espermatogônias e espermatócitos primários em pré-leptóteno e um compartimento adluminal, no qual localizam-se os espermatócitos primários a partir de leptóteno, espermatócitos secundários e espermatídes (Russell e Griswold, 1993). Outras funções atribuídas às células de Sertoli são fagocitose de células germinativas em degeneração e corpos residuais, resultantes da espermiogênese, e a produção do fluido testicular importante para a condução dos espermatozoides (Setchel et al, 1969; Chemes, 1983; Clermont, 1993).

As células germinativas compreendem espermatogônias, espermatócitos e espermatídes, que após passarem pelo processo de diferenciação ou espermiogênese, são liberadas no lúmen testicular, como espermatozoides (Russell & Griswold, 1993). As células germinativas se desenvolvem em estreita interação com as células de Sertoli, que desempenham importante papel na regulação da espermatogênese (Russell et al, 1990; Skinner e Anway, 2005).

A espermatogênese é um processo complexo que ocorre de forma cíclica e extremamente organizada, sendo dividida em três fases, baseado em características morfológicas e funcionais (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994; França e Russell, 1998; Godinho, 1999; O'Donnel et al, 2001, Hess e França, 2007). Na primeira fase, denominada proliferativa ou espermatogonial, as espermatogônias proliferam, seja para manter a população de células tronco, em um processo de autorenovação, ou para se comprometer com a espermatogênese. Neste caso, a última divisão espermatogênese dará origem aos espermatócitos primários (França e Russell, 1998; Kerr et al, 2006; Smith em Walker, 2014). Assim, na fase meiótica ou espermatocitária onde os espermatócitos passam pela divisão meiótica, na qual ocorre a duplicação, recombinação e segregação do material

genético, resultando na formação das espermátides arredondadas. E finalmente, na fase espermiogênica ou de diferenciação, as espermátides arredondadas sofrem modificações morfológicas, como formação do acrossomo, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda de grande parte do citoplasma, originando os espermatozoides, células responsáveis pela fertilização (Russell et al, 1990; França e Russell, 1998; Stevens e Lowe, 1999; Kerr et al, 2006). Ao longo de todo processo espermatogênico, as células de Sertoli fornecem suporte hormonal, nutricional e físico para as células germinativas.

As células espermatogênicas estão organizadas em associações típicas denominadas estádios (Perey et al, 1961; Leblond e Clermont, 1952; Russell et al, 1990). Esses estádios sucedem com o tempo em uma determinada área do epitélio seminífero de forma ordenada. Uma série completa e ordenada de alterações nas associações celulares (estádios) que ocorre em um determinado segmento do epitélio nos testículos em um intervalo de tempo é denominado ciclo do epitélio seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al, 1990; O'Donnell et al, 2001). A duração total deste ciclo varia entre as espécies, mas sabe-se que 4,5 ciclos, aproximadamente, são necessários para que o processo espermatogênico se complete. Nos mamíferos, esse processo tem duração de cerca de 30 a 78 dias (Russell et al, 1990; Queiroz e Nogueira, 1992; França e Russell, 1998). Os estádios podem ser identificados pelo método da morfologia tubular, que leva em conta a localização e forma do núcleo das espermátides, presença de divisões meióticas e a composição de epitélio seminífero, ou pelo método acrossômico, que avalia a formação do acrossomo nas espermátides (Leblond e Clermont, 1952; Berndtson, 1977; Hess, 1990).

A túnica própria dos túbulos seminíferos é formada por tecido conjuntivo composto por componentes celulares e acelulares (Bustus-Obregon, 1976; Christl, 1990). Os componentes celulares compreendem as células peritubulares mioides e uma camada limitante de células indiferenciadas podendo ser consideradas fibroblastos, mais externamente (Dym, 1988), enquanto os componentes acelulares incluem fibras colágenas e elásticas e substância fundamental amorfa, constituindo a lâmina basal (Christl, 1990). As células peritubulares mioides são células finas, alongadas, possuindo núcleos geralmente heterocromáticos, elípticos ou fusiformes (Maekawa et al, 1996, Haider et al, 1999). Elas se encontram ao redor dos túbulos seminíferos, podendo formar uma ou mais camadas, dependendo da espécie. Possuem características estruturais de fibras musculares lisas e fibroblastos, como filamentos de actina, além de miosina, α -actinina, desmina e vimentina (Holstein et al, 1996; Maekawa et al, 1996; Albrecht et al, 2006; Kerr et al, 2006;

Weinbauer et al, 2010). Devido a essas características, as células peritubulares mioídes são capazes de contrair e auxiliar na propulsão dos espermatozoides e de fluido testicular pelos túbulos seminíferos, além de possuir a capacidade de sintetizar colágeno (Russell et al, 1990; Maekawa et al, 1996).

No compartimento intertubular ou intersticial estão localizadas as células de Leydig, além de vasos sanguíneos, linfáticos importantes para o transporte de hormônios e nutrientes, além de nervos, fibroblastos e células de defesa, como macrófagos, e raros leucócitos (Fawcett et al, 1973; Russell et al, 1990; Hedger, 1997; O'Donnell et al, 2001; Kerr et al, 2006). As células de Leydig, sob ação do hormônio luteinizante (LH), são responsáveis pela produção de esteroides sexuais, principalmente testosterona. Essas células possuem núcleo arredondado ou oval, abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares (Kerr et al, 2006; Weinbauer et al, 2010). São descritas duas populações de células de Leydig: fetais e adultas. Nas primeiras, ocorre produção de andrógenos que vão atuar para o normal desenvolvimento da gônada no feto. Nas células de Leydig adultas, a produção de andrógenos é importante para a manutenção da espermatogênese e para as características sexuais masculinas (Benton et al, 1995; Goymann et al, 2007; Chen et al, 2009; Weinbauer et al, 2010; Wen et al, 2006).

1.1.1.2 - Origem e Desenvolvimento

Nos mamíferos, os estágios iniciais do desenvolvimento das gônadas ocorrem aproximadamente no 11º dia de desenvolvimento embrionário em ratos ou na quinta semana de gestação em humanos, através da formação das cristas genitais, as quais se desenvolvem como um espessamento do mesotélio medial ao mesonefron e do mesênquima adjacente (Torrey, 1945; McLaren, 1991; Buehr et al, 1993; Kierszenbaum, 1994; Karl e Capel, 1998; Parker et al, 1999; Staack et al, 2003; Cool e Capel, 2009; Cool et al, 2012; Wilhelm et al, 2013; Dolci et al, 2015). Seu desenvolvimento ocorre em duas fases (Figura 2): inicialmente é formada uma gônada bipotencial, sem diferenças morfológicas para machos e fêmeas. Posteriormente, fatores genéticos promovem a diferenciação dessa gônada em testículos ou ovários (Wilhelm et al, 2007).

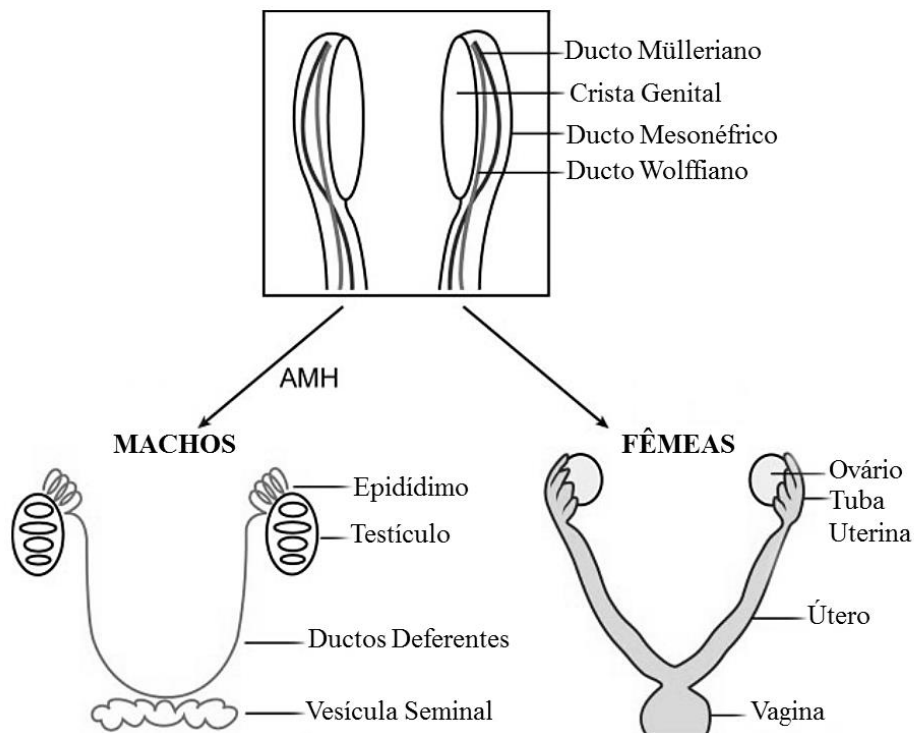


Figura 2 - Desenvolvimento e diferenciação do trato genital em mamíferos. Adaptado de Wilhelm et al, 2007.

As células germinativas primordiais se originam do epiblasto, próximo da base do alantoide e migram por meio do mesentério dorsal, onde atingem o mesênquima adjacente se inserindo nas cristas gonadais. Posteriormente, elas vão se diferenciar em gonócitos, que darão origem às espermatogônias (Kierszenbaum, 1994; Larsen et al, 1997, William, 1997; Staack et al, 2003; Wilhelm et al, 2007). Após a sua chegada nas gônadas, ainda indiferenciadas, as células germinativas primordiais estabelecem conexões com as células do epitélio celomático e com as células mesenquimais, formando agregados celulares, os cordões testiculares (Kierszenbaum, 1994). As células mesenquimais originam as células peritubulares mioides e as células do epitélio celomático originam as células de Sertoli. As células de Leydig ainda não têm sua origem definida (Buehr et al, 1992, Merchant-Larios et al, 1993; Martineau et al, 1997 Gisburg et al, Kapel et al, 1998; Staack et al, 2003; Wilhelm et al, 2007; Wilhelm et al, 2013). Quando ocorre a diferenciação da gônada em testículo, dois compartimentos são identificados: os cordões testiculares, que darão origem aos túbulos seminíferos, compostos por células de Sertoli fetais e gonócitos, e o compartimento intersticial, composto pelas células de Leydig (Parker et al, 1999).

Além das gônadas, os rins mesonéfricos também originam outras estruturas que serão importantes para a formação do sistema genital de ambos os sexos, sob influência hormonal, sendo os ductos mesonéfricos ou de Wolff, que darão origem a estruturas das vias genitais masculinas, e os ductos paramesonéfricos ou de Müller, importantes para a formação das vias genitais femininas (Koopman et al, 2000; Staack et al, 2003; Wilhelm et al, 2007). O principal evento para a determinação sexual em mamíferos é a diferenciação da gônada bipotencial em testículos ou ovários. As outras estruturas do sistema genital são dependentes da ação de hormônios ou fatores produzidos pela gônada diferenciada (Koopman et al, 1991). A diferenciação gonadal é dependente da ação de vários genes, dentre eles o SRY, que se encontra no braço curto do cromossomo Y (Koopman et al, 1991). Sob influência desse gene, expresso pelas células de Sertoli, ocorre a produção de andrógenos pelas células de Leydig, que por sua vez promovem a formação dos testículos bem como a diferenciação do ducto mesonéfrico em estruturas outras do sistema genital masculino, como epidídimo, vesícula seminal e ductos ejaculatórios (Staack et al, 2003; Smith et al, 2014; Wen et al, 2016). As células de Sertoli também são estimuladas a produzir o hormônio anti-Mülleriano que promove a degeneração dos ductos paramesonéfricos, que dariam origem às estruturas femininas (Kuroda et al, 1990; Munsterberg e Lovell-Badge, 1991; Josso et al, 1998).

1.1.2 - Dúctulos Eferentes

Os dúctulos eferentes consistem de pequenos ductos convolutos que conectam os testículos à cabeça do epidídimo (Figura 3). Seu número varia entre as espécies, sendo de 4 a 8 dúctulos nos pequenos mamíferos, como camundongos e ratos, e de 12 a 23 em grandes mamíferos e primatas (Robaire e Hermo, 1988; Ilio e Hess, 1994; Wang et al, 1994; Goyal et al, 2000; Hess et al, 2011; Hess et al, 2014). Eles constituem parte da cabeça do epidídimo em algumas espécies como no homem, morcego, suínos e grandes mamíferos, apesar desses dois segmentos possuírem diferenças embriológicas, funcionais e estruturais (Yeung et al, 1991; Ilio & Hess, 1994; Stoffel & Friess, 1994; Cooper, 1999, Oliveira et al, 2012).

Os dúctulos eferentes surgem individualmente da rede testicular e, nos roedores, esses ductos individuais convergem para formar um único ducto que se conecta ao epidídimo (Guttroff et al, 1992; Wang et al, 1993; Ilio e Hess, 1994). Em outras espécies, como

ocorre em grandes mamíferos e no homem, os ductulos eferentes chegam ao epidídimo em múltiplas entradas (Saitoh et al, 1990; Joseph et al, 2009).

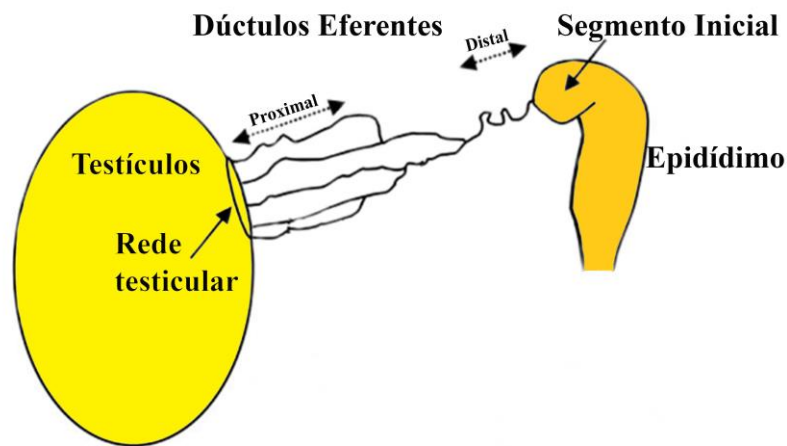


Figura 3 - Representação esquemática dos ductulos eferentes de ratos. Adaptado de Hess et al, 2001.

1.1.2.1 – Morfologia

O lúmen dos ductulos eferentes é revestido por epitélio simples colunar, constituído por células ciliadas e não ciliadas (Guttruff et al, 1992; Ilio e Hess, 1994; Hess, 2002; Ford e Hess, 2014), sendo as células não ciliadas o tipo celular mais abundante (Lohiya e Mathur, 1983; Ilio e Hess, 1994).

As células ciliadas têm como característica longos cílios apicais, aparelho endocítico pouco desenvolvido e núcleo oval, localizado no terço apical do citoplasma (Hoffer & Greenberg, 1978; Hermo et al, 1985; Ilio e Hess, 1994; Stoffel e Friess, 1994). Acreditava-se inicialmente que os cílios estavam relacionados com a propulsão do conteúdo luminal, mas há indícios de que seu batimento em diferentes direções promovem a agitação do fluido luminal, facilitando dessa forma sua reabsorção (Hermo et al, 1985; Ilio e Hess, 1994; Stoffel e Friess, 1994; Chen et al, 1998).

As células não ciliadas são responsáveis pela reabsorção do fluido testicular e possuem elevada capacidade de endocitose de fase fluida, adsortiva e mediada por receptores. Dessa forma, apresentam como principais características um aparato endocítico muito desenvolvido e abundantes microvilosidades apicais, além de abundantes grânulos,

vacúolos citoplasmáticos e lisossomos localizados no citoplasma apical (Hoffere Greenberg, 1978; Hermo e Morales 1984; Hermo et al, 1985; Jones e Jurd, 1987; Hermo et al, 1988; Veeramachaneni e Amann 1991; Ilio e Hess, 1994; Stoffel e Friess, 1994; Goyal et al, 2000). Seu núcleo é oval ou esférico, eucromático e situado no terço basal da célula (Flickinger et al, 1978; Hoffer e Greenberg, 1978; Ilio e Hess, 1994).

Ambos os tipos celulares são unidos por complexos juncionais, como zônula de oclusão, zônula de adesão e desmossomos (Suzuki & Nagano, 1978). A ocorrência de complexos juncionais permeáveis sugere que a permeabilidade do epitélio pode ser alta e facilitar o movimento de fluido. A presença de abundantes interdigitações nas membranas basolaterais e de dilatações nos espaços intercelulares durante a absorção ativa, sugere que exista transporte de fluido acoplado a transporte ativo de soluto (Suzuki & Nakano, 1978; Ilio & Hess, 1992; Stoffel & Friess, 1994).

Ocorrem variações histológicas ao longo do comprimento dos ductos eferentes. Na região proximal, os ductos possuem lúmen mais amplo, o epitélio com abundância de células não ciliadas e rico em lisossomos, ao contrário da região distal, onde os ductos são mais estreitos e não possuem tantos lisossomos nas células não ciliadas (Jones & Jurd, 1987; Guttroff et al, 1992; Ilio e Hess, 1994). Ocorre uma súbita transição do epitélio dos ductos eferentes para o epidídimo, onde o epitélio passa a ser pseudoestratificado com células altas e microvilosidades longas, anteriormente denominados de estereocílios (Lohiya & Mathur, 1983).

O epitélio dos ductos eferentes é sustentado por fina camada de tecido conjuntivo frouxo, onde se encontram vasos sanguíneos, linfáticos, linfócitos e células mononucleares, seguido por três a quatro camadas concêntricas de células musculares lisas (Jones e Jurd, 1987; Ilio e Hess, 1994; Hess, 2002; Ford e Hess, 2014). Geralmente, o lúmen dos ductos eferentes aparenta-se vazio na região proximal devido ao grande volume de fluido testicular presente no local, mas é comum observar maior concentração de espermatozoides luminiais na região distal, onde a maior parte do fluido testicular já foi reabsorvida (Talo, 1981).

1.1.2.2 - Origem e Desenvolvimento

Os ductos eferentes se originam da região anterior dos túbulos mesonéfricos, próximos aos testículos (Robaire and Hermo, 1988; Ilio e Hess, 1994; Joseph et al, 2009; Snyder et al, 2010; Arrotéia et al, 2012). Em ratos, após o nascimento, os ductos eferentes são constituídos por túbulos convolutos em uma região análoga ao cone

vasculoso e seus ductos terminais se unem ao canal epididimário (Reid, 1959). O lúmen é revestido por epitélio cúbico, que é sustentado por uma fina camada de tecido conjuntivo (Reid, 1979). Os ductulos eferentes passam por um processo exclusivo de maturação morfológica, ocorrendo em duas etapas: em torno do oitavo dia pós-natal ocorre a diferenciação do aparelho endocitótico e depois do aparelho de transporte - a ciliogênese e a musculatura peritubular, o que ocorre em torno de quinze dias de idade (Francavilla et al, 1986; Hermo et al, 1992). A partir de 28 dias de idade, é possível identificar as regiões proximal e terminal dos ductulos eferentes. A região do cone vasculoso surge aos 32 dias de idade (Reid, 1959; Ilio e Hess, 1994).

Os mecanismos que controlam o desenvolvimento dos ductulos eferentes a partir dos túbulos mesonéfricos são pouco conhecidos, mas recentemente foi demonstrado que 4 genes *Hox* atuam em diferentes etapas do desenvolvimento: os genes *Rhox2a* e *Tlx2* atuam na fase inicial e os genes *Hoxa2* e *Hoxa4* atuam nas fases finais do desenvolvimento (Hess, 2002; Snyder et al, 2010).

1.1.2.3- Funções

A principal função atribuída aos ductulos eferentes é a reabsorção da maior parte do fluido testicular, o que permite um aumento da concentração dos espermatozoides no epidídimo, onde eles serão estocados e completarão sua maturação (Clulow et al, 1994; Ilio & Hess, 1994). Além da reabsorção de fluido, os ductulos eferentes realizam endocitose, secreção de proteínas e condução de espermatozoides até o epidídimo (Herme et al, 1992; Clulow et al, 1994; Ilio & Hess, 1994; Hess, 2002).

A reabsorção de fluido testicular é mediada por transporte ativo de sódio via bombas de sódio e potássio (Na^+ , K^+ -ATPase), localizadas na membrana basolateral do epitélio. Canais de sódio/hidrogênio (NHE), localizados na membrana apical das células não-ciliadas promovem a captação luminal de sódio, de maneira simultânea as bombas de sódio e potássio. A NHE3 é a única isoforma funcional para a reabsorção de sódio na região (Clulow et al, 1998; Leung et al, 2001; Zhou et al, 2001).

Além do transporte iônico, o epitélio dos ductulos eferentes realiza a reabsorção transepitelial passiva de água através de proteínas denominadas aquaporinas (Brown et al, 1993; Fisher et al, 1998; Pastor-Soler et al, 2001; Hess, 2002; Hermo et al, 2004). Existem treze tipos de aquaporinas descritas de acordo com o tipo de substância a que são permeáveis (Verkman, 2005). As aquaporinas AQP1 e AQP9 são encontradas no epitélio

dos ductos eferentes, contribuindo para a reabsorção de fluido testicular. As AQP1 estão localizadas principalmente na borda apical das células não-ciliadas (Brown et al, 1993; Fisher et al, 1998; Badran e Hermo, 2002; Oliveira et al, 2005; Da Silva et al, 2006; Domeniconi et al, 2008; Lu et al, 2008; Arrighi et al, 2010). Essas células também expressam a AQP9 em todas as espécies estudadas, sendo essas proteínas reguladas por andrógenos e estrógenos (Elkjaer et al, 2000; Pastor-Soler et al, 2001; Badran & Hermo; Zaniboni et al, 2004; Oliveira et al, 2005; Domeniconi et al, 2007; Hermo et al, 2008; Arrighi et al, 2010; Hashem, 2010).

1.1.3 – Próstata

A próstata é uma glândula anexa ao sistema genital masculino, presente em todos os mamíferos. Ela encontra-se localizada na cavidade pélvica, abaixo do colo da bexiga, circundando a porção inicial da uretra, denominada uretra prostática (Amüller, 1979; Kumar e Majumder, 1995). Seu parênquima possui várias glândulas tubuloalveolares exócrinas, cuja disposição difere entre humanos e roedores, sendo concêntricas ao redor da uretra nos primeiros e disposta em lobos em roedores (Hayashi et al, 1991; Risbridger e Taylor, 2006).

1.1.3.1- Próstata de Roedores

Em roedores, a próstata é composta por quatro pares de lobos classificados de acordo com sua posição anatômica relativa à uretra, definidos como complexo prostático: próstata ventral (VP), próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP) e próstata anterior (AP) ou glândula de coagulação (Figura 4) (Hayashi et al, 1991; Hayward et al, 1996a; Risbridge e Taylor, 2006). Cada lobo é envolvido por tecido conjuntivo, que os delimitam em compartimentos individualizados, além de conectar os ductos prostáticos de um mesmo lobo, que desembocam na uretra prostática (Hayashi et al, 1991).

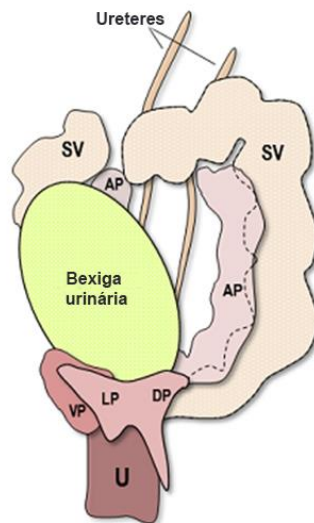


Figura 4 – Representação esquemática da organização da próstata de roedores. AP = próstata anterior; DP = próstata dorsal; LP = próstata lateral; SV = vesícula seminal; VP = próstata ventral. Adaptado de Oliveira et al, 2016.

A próstata ventral consiste de um par de lobos localizados ventralmente à uretra. Cada lobo possui 2 a 3 ductos principais que desembocam na porção ventral da uretra. Os adenômeros ou ductos terminais da próstata ventral são formados por um epitélio pseudoestratificado prismático pouco pregueado (Hayashi et al, 1991).

A próstata dorsal está localizada dorsalmente à uretra, possuindo de 5 a 6 ductos principais em cada lobo que desembocam na porção dorsal da uretra. Seus adenômeros possuem estrutura tubuloalveolar constituído por epitélio cilíndrico a cúbico com poucas pregas epiteliais (Hayashi et al, 1991).

A próstata lateral margeia a superfície lateral da uretra, dispendo-se entre as próstatas ventrais e dorsais. Seus adenômeros tubuloalveolares são formados por epitélio colunar mais baixo e mais pregueado em comparação às próstatas ventral e dorsal (Hayashi et al, 1991).

Finalmente, a próstata anterior ou glândula de coagulação localiza-se adjacente à concavidade medial da vesícula seminal. Diferente dos outros lobos, possui uma estrutura tubular, composta por um ducto principal formado pela união de vários ductos distais ramificados. Possui um epitélio simples colunar com altura e pregueamento variados, que indica diferente atividade secretora ao longo da glândula (Hayashi et al, 1991).

Mesmo possuindo diferenças anatômicas, roedores são clássicos modelos de estudo para fisiopatologia prostática, uma vez que possuem semelhanças no desenvolvimento fetal com a próstata humana, além de desenvolverem alterações patológicas com o envelhecimento, semelhante ao que ocorre em humanos (Pollard, 1973; Hayward e Cunha, 2000; Morais-Santos et al, 2015). Além disso, a próstata de ratos, com exceção da próstata ventral, possui correspondência histológica e patológica com a de humanos, sendo a próstata anterior correspondente a zona central e as próstatas dorsolaterais correspondentes à zona periférica, características que fazem dos roedores bons modelos experimentais (Pollard, 1973; Danielpour et al, 1994).

1.1.3.2 - Morfologia e Função

A próstata de roedores, assim como de humanos, possuem características histológicas semelhantes (Hayward e Cunha, 2000; Risbridger e Taylor, 2006). Os seus vários ductos, originam unidades secretoras de formato tubular ou alveolar contendo três tipos de células epiteliais funcional e morfologicamente distintas: as células secretoras ou luminais, as células basais e as células neuroendócrinas.

As células luminais ou secretoras são as mais abundantes e possuem um aparelho de Golgi muito desenvolvido, abundância em retículo endoplasmático rugoso e numerosos grânulos de secreção apicais. São responsáveis pela produção dos principais componentes do líquido prostático, entre eles o antígeno prostático específico (PSA) e a fosfatase alcalina, que podem ser utilizados em humanos como marcadores de diferenciação dessas células. Os hormônios esteroides, andrógenos e estrógenos, influenciam a atividades dessas células e dessa forma, expressam os receptores de ambos os hormônios (Hayward et al, 1996a; El-Alfy et al, 2000; Risbridger e Taylor, 2006).

As células basais possuem pouco citoplasma e núcleo pequeno, de formato irregular e cromatina muito condensada, e encontram-se localizadas na região basal do epitélio, apoiadas na membrana basal (El-Alfy et al, 2000; Risbridger e Taylor, 2006). Pela definição clássica, acreditava-se que essas células não alcançavam o lúmen prostático, mas recentemente foi demonstrado que essas células são responsáveis por emitir projeções longas e delgadas até o lúmen, assim como já demonstrado em outros tipos epiteliais (El-Alfy et al, 2000; Risbridger e Taylor, 2006; Shum et al, 2008). Existem diferentes tipos de células basais no epitélio prostático. Umas possuem características de células tronco, sendo responsáveis por originar novas células secretoras (El-Alfy et al, 2000). Outras expressam

enzimas esteroideogênicas, o que pode indicar seu possível papel na regulação do epitélio (El-Alfy et al, 2000; Risbridger e Taylor, 2006).

O terceiro tipo celular do epitélio prostático são as células neuroendócrinas. Elas são mais abundantes no início do desenvolvimento da glândula, mas ao longo de envelhecimento elas são mais esporádicas, podendo ser encontradas isoladamente ou em pequenos grupos no epitélio (Abrahamsson, 1999; Rodríguez et al, 2003). Essas células são responsáveis por secretar serotonina e calcitonina, dentre outros neuropeptídeos. Acredita-se que essas células são responsáveis pela regulação do crescimento e da atividade secretora da próstata (Abrahamsson, 1999; Rodríguez et al, 2003; Risbridger e Taylor, 2006).

A próstata ainda é constituída por estroma composto por tecido conjuntivo, com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de defesa e fibras musculares lisas, que sustentam o parênquima glandular (Hayward et al, 1996b). A contração da musculatura auxilia na liberação para a uretra durante a ejaculação de uma secreção produzida pela glândula: o líquido prostático. Este consiste em uma secreção homogênea, leitosa, levemente ácida (pH 6.6), produzida pelas células secretoras (Amüller, 1979; Kumar e Majumder, 1995). O líquido prostático fornece condições favoráveis para a sobrevivência dos espermatozoides durante o seu transporte ao longo do sistema genital masculino, bem como no sistema genital feminino (Kumar e Majumder, 1995). Essa secreção possui altos níveis de zinco, que atua como antioxidante e bactericida, promovendo a proteção dos espermatozoides. O citrato de cálcio presente no líquido prostático atua como alcalinizador do pH vaginal, garantindo a sobrevivência dos espermatozoides nas vias genitais femininas. A presença de enzimas como a fibrinolisinase, coagulase e o PSA são responsáveis pela liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando o transporte dos gametas masculinos. A fosfatase ácida realiza a conversão enzimática da fosforilcolina em colina, sendo essa última responsável pela nutrição dos espermatozoides juntamente com o colesterol e outros lipídios (Amüller, 1979; Kumar e Majumder, 1995).

1.1.3.3 - Origem e Desenvolvimento

Diferente de outros órgãos do sistema genital masculino, como epidídimo, ducto deferente e glândula vesicular, que têm origem mesodérmica a partir dos ductos de Wolff, o endoderma também participa da formação da próstata, a partir do seio urogenital (Lasnistki e Mizuno, 1980; Lasnistki e Mizuno, 1986; Thomson et al, 2008).

O seio urogenital é uma estrutura encontrada caudalmente à bexiga, constituída por uma camada epitelial derivada do endoderma e circundada pelo mesênquima (Marker et al, 2003; Cunha et al, 2004). Essa estrutura surge tanto em machos quanto em fêmeas e permanece morfológicamente indiferenciada em ambos os sexos até o momento de formação da próstata, que ocorre por volta de 18º dia embrionário em ratos (Price, 1936; Hamilton et al, 1959; Timms et al, 1995; Marker et al, 2003).

O desenvolvimento da próstata inicia com o surgimento de cordões epiteliais sólidos provenientes do seio urogenital que se invaginam no mesênquima circundante, sob estímulo de andrógenos produzidos pelo testículo fetal, num processo semelhante tanto em roedores quanto em humanos (Lowsley, 1912; Timms et al., 1994a; Kellokumpu-Lehtonen, 1985; Cunha et al, 1987; Marker et al, 2003; Georgas et al, 2015; Aaron et al, 2016). Ao nascimento a próstata dos roedores é rudimentar, sendo que as principais etapas do desenvolvimento ocorrem nos primeiros quinze dias de vida pós-natal se estendendo até a maturidade sexual (Marker et al, 2003).

A ramificação dos lobos prostáticos inicia-se entre 1 a 5 dias após o nascimento, sendo bem avançado aos 10 dias de idade, quando já é possível identificar os principais lobos prostáticos (Hayashi et al, 1991; Kinbara e Cunha, 1996; Marker et al, 2003). A formação do lúmen dos adenômeros inicia na próstata ventral, logo após o nascimento até o segundo dia de vida, mas na próstata anterior esse processo só ocorre entre o quinto e sexto dia de nascimento (Hayward et al, 1996). As células epiteliais iniciam sua diferenciação nas primeiras duas semanas de vida em ratos e camundongos, formando duas populações celulares distintas: uma população de células basais que se localizam ao longo da membrana basal, para formar uma camada descontínua de células que expressam citoqueratinas 5 e 14 e p63. A outra população é formada por células luminiais colunares altas, que expressam citoqueratinas 8 e 18, revestindo o lúmen dos ductos (Hayward et al, 1996a; Cunha et al, 2004). Concomitante a este processo, algumas células do mesênquima prostático se diferenciam em uma camada de músculo liso que envolve os ductos e tecido conjuntivo do estroma (Hayward et al, 1996b; Hayward et al, 1997). As proteínas de secreção prostáticas são detectáveis a partir dos 20 dias de idade, se tornando mais abundantes à medida que aumentam os níveis de testosterona, completando o processo de maturação na puberdade (Price, 1936; Lopes et al, 1986; Hayashi et al, 1991).

A interação epitélio-mesênquima é essencial para o desenvolvimento da próstata e esse processo sofre ação de andrógenos (Takeda et al, 1991; Prins e Birch, 1995). Apesar de

ser clássico alvo de andrógenos, o desenvolvimento da próstata ventral também sofre ação de estrógenos (Kuiper et al, 1996; Prins et al, 1998; Makela et al, 2000; Horvath et al, 2001; Prins et al, 2001; Omoto et al, 2005; Pelletier, 2008).

1.1.4 - Regulação Hormonal e Receptores Esteróides

O início e a manutenção da espermatogênese necessitam da ação de hormônios produzidos pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. No hipotálamo, é produzido o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é secretado no sangue chegando em altas concentrações na parte distal da adenohipófise, induzindo a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Gnessi et al, 1997; Amory e Bremner, 2007).

A secreção de GnRH é controlada por ação de peptídeos denominados kisspeptinas, que agem como ligantes naturais para o receptor órfão acoplado a proteína G, conhecido como gpr-54 em ratos e AXOR12 em humanos (Lee et al., 1999; Muir et al, 2001; Roux et al, 2003; Seminara et al, 2003). Essas kisspeptinas também atuam no *feedback* (ou sistema de retroalimentação) positivo e negativo do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, onde o *feedback* positivo estimula a secreção de LH e o *feedback* negativo controla a ação da testosterona sobre a secreção de GnRH (Navarro et al, 2004; Smith et al, 2005; Roa et al, 2009).

O FSH atua nas células de Sertoli, via receptores específicos, estimulando a produção de inibina, ativina e ABP, entre outros. A ativina estimula a produção de FSH, enquanto a inibina exerce efeito negativo na liberação de FSH (Ling et al, 1986; Robertson et al, 1986; Gnessi et al, 1997). A ABP é uma glicoproteína que se liga a andrógenos e é responsável pelo transporte e proteção desses hormônios contra a degradação, facilitando sua concentração nos testículos e sua veiculação pelas vias genitais masculinas (Bardin et al, 1981; Jeyaraj et al, 2005; Sofikitis et al, 2008). O FSH é o principal determinante para a capacidade espermatogênica do testículo adulto, uma vez que esse hormônio também controla a proliferação das células de Sertoli durante o período perinatal (Means et al, 1980).

O LH atua diretamente nas células de Leydig, estimulando a produção da testosterona, o principal hormônio para o controle da espermatogênese, juntamente com o FSH, uma vez que a iniciação e manutenção desse processo é dependente desses hormônios. Além disso, o LH exerce efeito *feedback* negativo, quando os níveis de testosterona no sangue estão elevados,

reduzindo ou inibindo a liberação de GnRH pelo hipotálamo, que por sua vez diminui a produção de LH e FSH pela hipófise (Amory e Bremner, 2007).

Após sua síntese, a testosterona pode ser metabolizada pela enzima 5α -redutase em 5α -dihidrotestosterona (DHT), um andrógeno metabolicamente mais ativo que a testosterona (Russell e Wilson, 1994), ou ainda pode passar pelo processo de aromatização pela ação da enzima P450-aromatase e formar o 17β -estradiol, principal estrógeno obtido do metabolismo da testosterona (Carreau et al, 2003).

Os efeitos dos hormônios esteroides sexuais, andrógenos e estrógenos, são exercidos por meio da regulação transcricional de genes responsivos, sendo esses efeitos genômicos mediados através dos receptores de andrógenos (AR) e receptores de estrógenos ER α (ESR1) e ER β (ESR2), respectivamente. Tanto AR quanto ERs são membros de uma superfamília de fatores de transcrição, conhecidos como receptores nucleares (NR) (Gibson e Saunders, 2012).

Como os demais membros da família de receptores nucleares, os AR e ERs contêm estrutura modular, composta de seis domínios estruturalmente e funcionalmente distintos, denominados de A a F (Figura 5) (Nilsson et al, 2001). O domínio A/B está localizado na região N-terminal e possui a função de ativação transcricional 1 (AF1), que influencia a atividade transcricional de maneira independente de ligante. Esse domínio é o menos conservado entre os receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na sequência de aminoácidos (Beato e Klug, 2000; Petterson e Gustafsson, 2001; Prins e Korach, 2008).

O domínio C, denominado domínio de ligação ao DNA (DBD) é o mais conservado entre os receptores nucleares e está envolvido no reconhecimento e ligação aos segmentos específicos do DNA, os elementos responsivos a estrógenos (ERE) ou andrógenos (ARE) (Weatherman et al, 1999; Beato e Klug, 2000; Petterson e Gustafsson, 2001; Prins e Korach, 2008).

O domínio D, também conhecido como região de dobradiça, contém o sinal de localização nuclear. É uma região flexível responsável por ligar o domínio DBD ao domínio E. Esse último, também conhecido como domínio de ligação ao ligante (LBD), é o segmento onde o hormônio se liga ao receptor (Beato e Klug, 2000). Após se ligar aos hormônios correlatos, este domínio induz uma mudança conformacional do receptor, aumentando sua estabilidade pelo DNA, além de possuir ainda a função de ativação transcricional 2 (AF-2) (Danielian et al, 1992). Ambos domínios AF-1 e AF-2 recrutam proteínas corregulatórias que participam do processo da transcrição (Beato e Klug, 2000; Petterson e Gustafsson, 2001).

O domínio F, localizado na região C-terminal do receptor, comparado aos outros domínios é relativamente menor e possui pequena homologia entre $ER\alpha$ e $ER\beta$, indicando que este domínio esteja envolvido nas diferenças das funções biológicas de ambos os receptores. Acredita-se que este domínio participe na modulação da ligação do ligante, no recrutamento de proteínas regulatórias e na atividade de transcrição do receptor (Prins e Korach, 2008; Skafar et al, 2008).

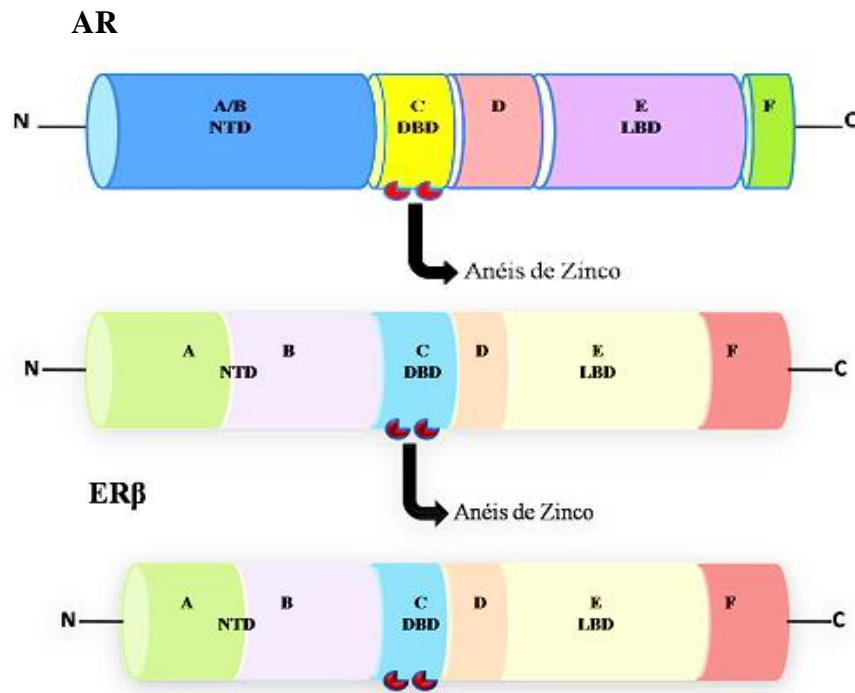


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura dos receptores de andrógenos (AR) e estrógenos ($ER\alpha$ e $ER\beta$).

Adaptado de Beato e Klug, 2000 e Akingbemi, 2005.

O AR é uma proteína monomérica de 110kDa, localizado no cromossomo X, portanto os machos possuem apenas uma única cópia (Brinkmann et al, 1988; Gelmann, 2002; Davey e Grossmann, 2016). Já o receptor $ER\alpha$ é uma proteína de peso molecular de cerca de 66 kDa e contém aproximadamente 595 aminoácidos (Enmark et al, 1997). O gene que a codifica se localiza no braço longo do cromossomo 6 em humanos e cromossomo 1 em ratos (Enmark e Gustafsson, 1999). E finalmente, o $ER\beta$ possui peso molecular de aproximadamente 54,2 kDa e cerca de 485 aminoácidos, pois possui uma região N-terminal mais curta. Essa proteína é codificada pelo cromossomo 14, em humanos, e cromossomo 6, em ratos (Walter et al, 1985; Enmark et al, 1997; Tremblay et al, 1997; Enmark e Gustafsson, 1999; O'Donnell et al, 2001). Ambos os receptores apresentam grande homologia entre eles, especialmente no domínio de

ligação ao DNA (cerca de 96% em ratos e 95% em humanos), porém o domínio de ligação ao ligante apresenta apenas cerca de 55% de homologia (Mosselman et al, 1996; Kuiper et al, 1997). As diferenças observadas no domínio de ligação ao ligante podem justificar algumas alterações nas atividades transcricionais tanto de ER α quanto de ER β (Kuiper et al, 1998).

1.1.4.1 - Distribuição dos Receptores de Andrógenos e Estrógenos

a) Testículos

Os andrógenos são hormônios esteroides secretados pelos testículos e glândulas adrenais, que exercem funções importantes no desenvolvimento e expressão de características sexuais secundárias masculinas. A testosterona e a diidrotestosterona (DHT) são andrógenos mais importantes para a fisiologia do sistema genital masculino, exercendo suas funções através da ligação a receptores de andrógenos (AR) (Hipakka e Liao, 1998; Roy et al, 2001; Stocco e MacPhaul, 2006; Centenera et al, 2008). Esses receptores são expressos nas células de Leydig, células peritubulares mioides e nas células de Sertoli, não sendo encontrados nas células germinativas (Bremner et al, 1994; Vornberger et al, 1994). A regulação da espermatogênese por andrógenos é realizada diretamente pelas células de Sertoli e células peritubulares mioides, sendo as primeiras as mais prováveis por realizar essa função devido a sua interação direta com as células germinativas em desenvolvimento (Bremner et al, 1994; Vornberger et al, 1994; Sharpe, 2010). Nos estádios mais avançados da espermatogênese, a ocorrência dos AR nas células de Sertoli é mais evidente, demonstrando a importância de andrógenos nas últimas etapas da diferenciação espermática (Vornberger et al, 1994; Suárez-Quian et al, 1999; Zhou et al, 2002).

Os testículos são a principal fonte de estrógenos nos machos, expressando também ambos os receptores. Os ER α são restritos às células de Leydig descritos em várias espécies como cães, gatos, morcegos, roedores, equinos e primatas, incluindo os humanos (Fisher et al, 1997; Hess et al, 1997; Pelletier e El-Alfy, 2000; Sar e Welsch, 2000; Nie et al, 2002; Zhou et al, 2002; Hemej et al, 2005; Shapiro et al, 2005; Oliveira et al, 2009; Joseph et al., 2011). Acredita-se que os ER α participem da inibição da esteroidogênese atuando sobre as células de Leydig (Delbés et al, 2005).

Já os ER β são encontrados tanto nas células somáticas como nas células germinativas, mas apesar de sua ampla distribuição nos testículos e sistema genital masculino, seu papel fisiológico não está bem estabelecido (Saunders et al, 1998 e 2001; van Pelt et al, 1999; Zhou et al, 2002; Oliveira et al, 2009).

b) Dúctulos eferentes

Nos dúctulos eferentes, a regulação hormonal é realizada tanto por andrógenos quanto por estrógenos, sendo esses últimos os principais hormônios reguladores da função desse segmento (Ilio e Hess, 1994; Hess et al, 1997; Oliveira et al, 2001; Hess, 2002; Oliveira et al, 2002; Picciarelli-Lima et al, 2006; Hess et al, 2011). Em roedores, os dúctulos eferentes correspondem a primeira região extratesticular que expressam AR, os quais são encontrados nas células epiteliais 16 dias após o nascimento, enquanto os receptores de estrógenos (ER) são encontrados no epitélio dos dúctulos eferentes ainda na vida intrauterina (Cooke et al, 1991; Bentvelsen et al, 1995).

O epitélio dos dúctulos eferentes apresentam elevados níveis de RNAm dos receptores de estrógenos, uma concentração aproximadamente 3,5 vezes maior do que as concentrações encontradas no útero, clássico alvo de estrógenos. Esse segmento do trato genital masculino expressa altos níveis de ER α , além de também expressar ER β , mas a função específica deste receptor no local ainda não está determinada (Hess et al, 1997; Hess et al, 2011; Joseph et al, 2011). Foi demonstrado através da inativação química ou genética dos receptores ER α , que os estrógenos participam da manutenção da citoarquitetura epitelial e da função de reabsorção dos dúctulos eferentes, sendo que distúrbios nesta função levam a efeitos secundários, como a atrofia testicular e infertilidade (Hess et al, 1997; Zhou et al, 2001; Oliveira et al, 2001; Oliveira et al, 2002; Oliveira et al, 2005; Hess et al, 2011).

c) Próstata

A morfologia e fisiologia da próstata sofre influência de andrógenos, sendo o DHT o andrógeno mais potente, com uma afinidade dez vezes maior ao AR em comparação à testosterona (Labrie et al, 2000; Grossmann et al, 2001; Risbridger et al, 2001; Penning et al, 2007). Os andrógenos participam do desenvolvimento da genitália externa e da próstata durante o período fetal, estimulam o crescimento da glândula na puberdade e no adulto e estimulam a atividade secretora da próstata (Cunha et al, 1992; Russell e Wilson, 1994). Em roedores, durante o desenvolvimento intrauterino, apenas as células do mesênquima expressam receptores de andrógenos antes e durante a formação de brotos prostáticos, sugerindo um papel fundamental desses hormônios nas primeiras fases do desenvolvimento da glândula (Takeda et al, 1991; Prins e Birch, 1995). Após o nascimento, as células epiteliais começam a expressar AR, sendo intensamente expressos a partir de 15 dias de idade (Prins e Birch, 1995). No adulto, os receptores de andrógenos são intensamente expressos nas células luminiais do epitélio prostático e nas células do estroma (Thompson et al, 1986; Prins et al,

1991; Prins et al, 1995; Prins et al, 1996). No entanto, a maioria das células basais são negativas para AR, assim como também demonstrado em cães e humanos, sugerindo que essas células não sofrem influência dos andrógenos (Weber et al, 1989; Ruizeveld et al, 1990; Prins et al, 1991). A dependência química da próstata a andrógenos foi demonstrada em estudos com ratos castrados química e/ou cirurgicamente, que resultou em uma regressão da próstata devido à queda dos níveis de andrógenos e inativação dos AR (Kiplesund et al, 1998; Prins e Birch, 1993; Oliveira et al, 2007).

Apesar de sua dependência a andrógenos, a próstata também é alvo de estrógenos, atuando nos processos de diferenciação e crescimento da glândula, bem como nos processos patológicos, sendo o principal estrógeno atuante o 17β -estradiol (E2) (Prins et al, 1993; Prins et al, 2001; McPherson et al, 2007). Ambos os receptores de estrógeno são encontrados na próstata, diferenciando na localização e intensidade de expressão (Makela et al, 2000; Imanov et al, 2004; Prins e Korach, 2008). Em ratos recém-nascidos, o epitélio prostático expressa ER α , exercendo importante papel na morfologia da ramificação dos ductos prostáticos. Após o nascimento, à medida que as células epiteliais se diferenciam, a expressão desse receptor é reduzida e ocorre um aumento progressivo da expressão do ER β (Omoto et al, 2005). Nos animais sexualmente maduros, o ER α é encontrado apenas em algumas células do estroma, enquanto que o ER β atinge a máxima expressão no epitélio prostático, além de também estar presente em algumas células do estroma, se tornando o principal receptor de estrógeno nesse órgão (Kuiper et al, 1996; Prins et al, 1998; Makela et al, 2000; Horvath et al, 2001; Prins et al, 2001; Omoto et al, 2005; Pelletier, 2008).

Estudos com animais *knockouts* para ambos os ER têm fornecido informações sobre a função desses receptores na próstata. Em animais *knockouts* para o ER β , o ER α participa da indução da metaplasia escamosa e prostatites quando expostos a estrógenos sintéticos, sendo atribuídos a esse receptor um papel proliferativo e pró-inflamatório (Prins et al, 2001; Risbridger et al, 2001). Corroborando com esses dados, estudos com ratos senis demonstrou que nas áreas de proliferação intraepitelial, metaplasia escamosa e prostatites, as células epiteliais mostram-se positivas para ER α e as células basais positivas para a enzima aromatase, sugerindo uma possível produção local de estrógenos atuando via ER α , levando a alterações patológicas em próstata nesses animais (Morais-Santos et al, 2018). Com relação ao ER β , ainda não se sabe ao certo o seu papel na próstata, mas tem sido atribuído esse receptor um papel antiproliferativo, além de também exercer funções pró-apoptóticas e de participar da diferenciação celular (Weihua et al, 2001; Weihua et al, 2002; Cheng et al, 2004; Imanov et al, 2004; McPherson et al, 2007; McPherson et al, 2010; Yun et al, 2015).

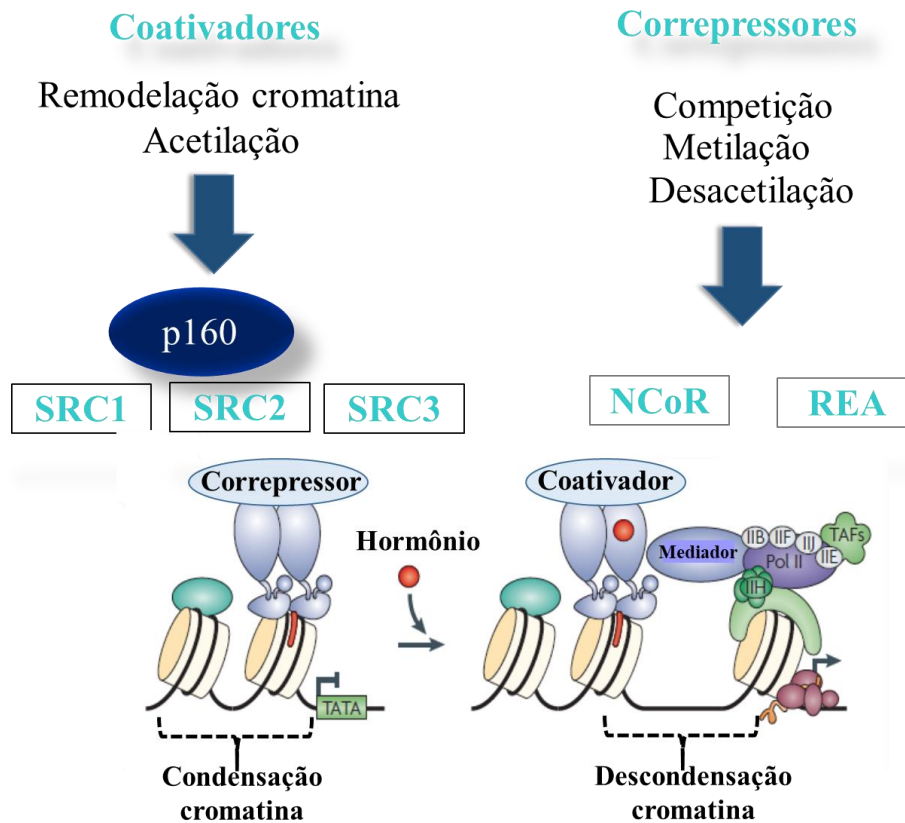


Figura 6 - Ligação dos cofatores ao DNA. Adaptado de Perisi et al, 2010.

1.1.5 - Correguladores de Hormônios Nucleares

A transcrição gênica é o processo pelo qual as células expressam seus genes por meio da produção de RNAm (Nevins, 1983; Laudet e Gronemeyer, 2002). Os receptores nucleares atuam como fatores de transcrição e alternam entre os estados de ativação e repressão da transcrição gênica, dependendo, respectivamente, da presença ou ausência dos hormônios cognatos. A estimulação do processo de transcrição é constituída por uma série de eventos sequenciais, incluindo a fosforilação do receptor, alterações em sua conformação, dimerização e associação do receptor à região promotora dos genes alvo, desencadeando o recrutamento de proteínas correguladoras da transcrição (Figura 6) (Leo e Chen 2000; Li e Shang, 2007).

Para que os receptores nucleares, como os AR e ERs possam ativar a transcrição gênica, é necessário a sua ligação ao DNA em regiões específicas, os ERE no caso dos receptores de estrógeno e os ARE, para os receptores de andrógenos (Figura 7) (Heggeler-Bordier et al, 1997; McKenna, 1999; Dilworth e Chambon, 2001; Hall et al, 2001; Laudet e Gronemeyer, 2002; Feng e O'Malley, 2014). Após a ligação ao DNA, os receptores nucleares recrutam o complexo enzimático RNA polimerase II, que iniciam a montagem de um estável

complexo de pré-iniciação, que inclui o fator de transcrição IID (TFIID), que é um complexo multiproteico formado pela proteína de ligação ao TATA-box (TBP), outras proteínas de ligação ao TBP (TAFs) e outros fatores gerais da transcrição (Figura 7) (Horwitz et al, 1996; Jenster, 1998). Além desses TAFs, outras proteínas interagem no domínio de ativação da transcrição AF-2 dos receptores nucleares e são essenciais para o processo da transcrição. Essas proteínas são denominadas cofatores dos receptores nucleares, as quais podem agir como coativadoras ou correpessoras (McKenna et al, 1999; Glass e Rosenfeld, 2000; Leo e Chen, 2000; Laudet e Gronemeyer, 2002; Li e Shang, 2007). Na ausência de hormônio, a interação dos receptores nucleares com correpessores inibe a transcrição de genes-alvo. Após a ligação do hormônio, essas proteínas se dissociam dos receptores, os quais, então recrutam coativadores, que aumentam a ativação de transcrição pelo receptor (Leo e Chen, 2000; Li e Shang, 2007).

Entre os cofatores mais conhecidos estão membros da família de coativadores dos receptores esteroides (SRC), bem como os corepressores de receptores nucleares (NCoR), os mediadores do silenciamento de receptores de retinoides e hormônios da tireoide (SMRT) e os repressores de atividade de receptores de estrógenos (REA), os quais serão abordados com mais detalhes a seguir.

1.1.5.1 - SRC

A família de coativadores dos receptores esteroides (SRC), também conhecidos como proteínas p160, compreende três membros distintos, mas estrutural e funcionalmente relacionados: SRC1 (coativador do receptor nuclear 1 - NCoA1), SRC-2 (= NCoA-2; TIF2; GRIP-1) e SRC-3 (=NCoA-3; RAC3; p/CIP) (Leo e Cheng, 2000; Linja et al, 2004; Kishimoto et al, 2006; Li e Shang, 2007). Entre os receptores nucleares, as proteínas da família SRC interagem com os receptores de andrógenos, de estrógeno, de progesterona, da vitamina D, entre outros (Feng e O'Malley, 2014).

Os membros da família SRC participam na remodelação e descondensação da cromatina, criando um ambiente adequado para a transcrição. A ativação do processo da transcrição por essas proteínas ocorre pela acetilação de resíduos de lisina na porção N-terminal de histonas, seja pelo recrutamento de histona acetilases ou pela atividade acetilase intrínseca de SRCs, fazendo com que o DNA modifique a estrutura da cromatina, tornando-a mais acessível às proteínas transcricionais (Getzenberg et al, 1991; Adams and Workman, 1993; Wolffe and Pruss, 1996; Jenster, 1998; Xu, 2005; Li e Shang, 2007). Após a acetilação de histonas, os SRCs são substituídos pelo complexo mediador, o qual recruta o complexo de

pré-iniciação para dar início à transcrição do DNA (Dilworth e Chambon, 2001; Belakavadi e Fondell, 2006).

As proteínas da família SRC possuem peso molecular de 160kDa e compartilham características estruturais (Figura 7) (Xu, 2003). A região N-terminal é a mais bem conservada e contém o domínio bHLH-PAS, que interage com proteínas responsáveis pelo recrutamento de co-coativadores para potencializar a ativação da transcrição pelos receptores nucleares (Leo e Chen, 2000; Xu, 2003; Johnson e O'Malley, 2012). Esse domínio também possui o sinal de localização nuclear dos SRCs (Li et al, 2007). Na região central dessa proteína encontram-se três domínios α -hélice LXXLL (onde L representa o aminoácido leucina e X representa qualquer aminoácido), responsável pela ligação ao receptor nuclear e as sequências ao redor desses domínios são importantes para a seletividades dos tipos de SRC (Chang et al, 1999; Mackenna et al, 1999; Coulthard et al, 2003; Xu, 2003; Johnson e Omalley, 2012). A região C-terminal possui dois domínios de ativação AD1 e AD2, responsáveis pelo recrutamento de outros co-coativadores que promovem a remodelação do DNA e a modificação de histonas para o processo da transcrição (Johnson e Omalley, 2012).

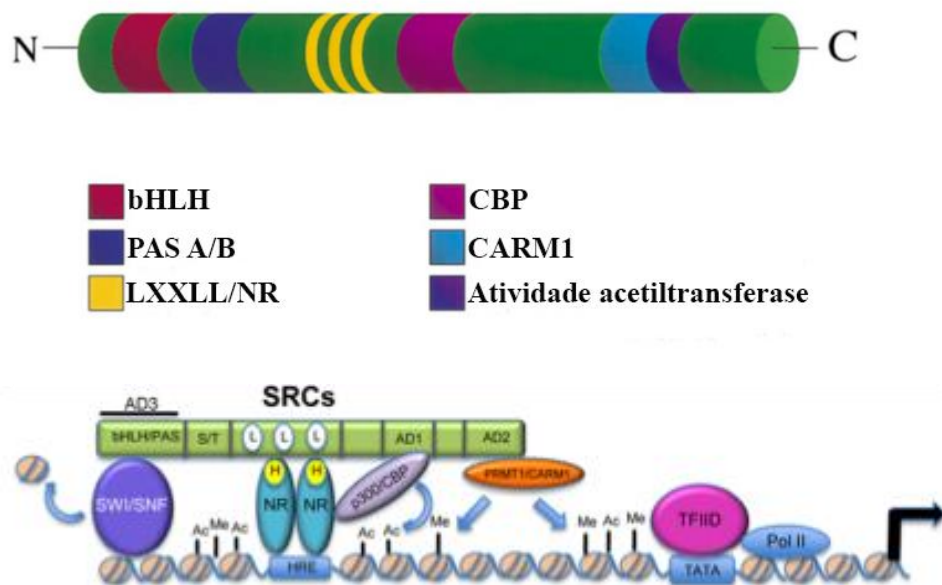


Figura 7 - Representação esquemática da estrutura e interações dos coativadores da família p160. Adaptado de MacKenna et al, 2002 e Johnson e O'Malley, 2012.

As proteínas SRC são amplamente expressas em diversos órgãos, como sistema nervoso, músculo esquelético, rins, pulmão, órgãos do sistema digestivo, testículo, placenta e tireoide (Li e Chen, 1998; Misiti et al, 1998). O SRC1 foi o primeiro membro da família das proteínas p160 a ser descoberto (Oñate et al, 1995). Ele interage de maneira dependente de hormônios aumentando a atividade transcricional de muitos receptores nucleares, como os receptores de progesterona, andrógeno, estrógeno, hormônio da tireoide, ácido retinóico e glicocorticoides (Webb et al, 1991; Alen et al, 1999; Bevan et al, 1999; Ma et al, 1999). Além disso, o SRC1 também aumenta a atividade transcricional de outros fatores, como NFkB, SMAD3 e AP-1 (Lee et al, 1998; Yanagisawa et al, 1999).

Estudos com camundongos mutantes para SRC1 tem fornecido informações sobre as suas funções. Animais *knockout* para esse coativador possuem testículos menores e redução do crescimento da próstata em resposta a andrógenos, sugerindo uma relação dos SRCs e os receptores de andrógenos nesses órgãos (Xu et al, 1998; Xu e O'Malley, 2002).

O SRC-2, também é conhecido como TIF2 (fator intermediário da transcrição 2) ou GRIP1 (proteína de interação ao receptor de glicocorticoide 1), foi o segundo membro da família p160 a ser descoberto (Leo e Chen, 2000). Assim como o SRC1, essa proteína aumenta atividade das regiões AF-1 e AF-2 dos receptores nucleares (Ma et al, 1999). O SRC-2 é o principal membro da família SRC presente nos testículos. Animais *knockout* para essa proteína apresentaram alterações na morfologia testicular, comprometimento da espermatogênese e infertilidade (Gehin et al, 2002; Xu e O'Malley, 2002; Ye et al, 2005). Vija e colaboradores (2013) demonstraram que o SRC-2 está presente nas células de Sertoli de testículos humanos a partir da 14^a semana de gestação.

O SRC-3 foi identificado por muitos autores como uma proteína de interação ao receptor do ácido retinóico (RAC3), em um gene amplificado em células do câncer de mama (ALB1) ou uma proteína de interação ao hormônio da tireoide (TRAM-1), de onde derivam suas diferentes nomenclaturas (Anzick et al, 1997; Chen et al, 1997; Li et al, 1997; Takeshita et al, 1997; Torchia et al, 1997). Além de interagir com muitos receptores nucleares e ativar a transcrição, essa proteína também interage com interferon- α e proteínas de ligação a elemento regulatório do cAMP (CREB), sugerindo que esse membro da família SRC pode atuar em várias vias de sinalização (Torchia et al, 1997). Além disso, a expressão de RAC3/TRAM-1 pode ser aumentada em tratamento hormonais, indicando outro mecanismo de ação desse coativador (Li and Chen, 1998; Misiti et al, 1998). Camundongos nocautes para SRC-3 demonstraram baixos níveis de estrógeno, atraso no crescimento e puberdade, queda dos níveis de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina-1), que é importante para o

crescimento e redução da função reprodutiva de fêmeas (Xu e O'Malley 2000; Wang et al, 2000). Também tem sido atribuído ao SRC-3 um papel oncogênico, uma vez que altos níveis dessa proteína foram detectados em vários casos de câncer, como o de mama e ovário e a deleção dessa proteína inibe o crescimento celular dependente de estrógeno (Anzick et al, 1997; Planas-Silva et al, 2001; Yan et al, 2006). Em casos de câncer de próstata, o SRC-3 é altamente expresso aumentando a atividade transcricional do AR e sua expressão está relacionada ao grau do tumor e ao estágio da doença (Gnanapragasam et al, 2001; Zhou et al, 2005).

1.1.5.2 - NCoR

Embora a ativação da transcrição seja essencial na regulação de genes alvo, a repressão é igualmente importante na modulação do processo transcricional. Fatores repressivos usam vários mecanismos distintos, incluindo competição com proteínas ativadoras de ligação ao DNA, sequestro de tais ativadores, interação com os complexos proteicos que participam do processo de transcrição, metilação do DNA e recrutamento de enzimas que promovem a desacetilação de histonas (Jepsen et al, 2002). Dois dos correpressores mais estudados são o correpressor do receptor nuclear (NCoR) e o mediador do silenciamento de receptores de retinoides e hormônios da tireoide (SMRT) (Wu et al, 2006).

Os correpressores NCoR é considerada uma proteína de suporte para a ação de um complexo enzimático inibidor da transcrição (Figura 8) (Privalsky, 2004; Watson et al, 2012). Na região N-terminal e central da proteína existem três a quatro domínios de repressão transcricional (domínios RD), que recrutam componentes importantes para a repressão da transcrição (Chen e Evans, 1995; Seol et al, 1996). A região C-terminal é formada por três domínios de ligação ao receptor nuclear, denominados ID1 e ID2 e ID3 (Webb et al, 2000). Cada um desses domínios possui sequências denominadas CoRNR box, semelhante a sequência presente nos coativadores, mas forma uma α -hélice mais extensa (Downes et al, 1996; Hu e Lazar, 1999; Nagy et al, 1999; Perissiet al, 1999; Cohen et al, 2000; Webb et al, 2000). Os eventos moleculares que regulam a interação dos receptores nucleares a essa região do corepressor determinam o recrutamento ou liberação de todo o complexo corepressor (Varlakhanova et al, 2010).

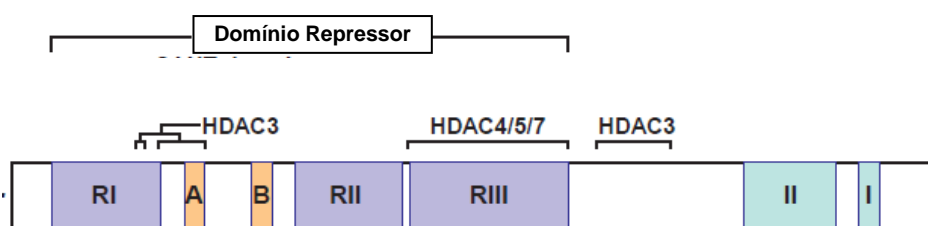


Figura 8 - Representação esquemática da estrutura do corepressor NCoR. Adaptado de Jepsen, 2002.

NCoR é uma proteína de 270kDa que se localiza principalmente no núcleo, mas ocorre um recrutamento para a superfície das células, através da proteína TAB2 em resposta a interleucina-1 β e por uma proteína quinase IKK, atuando como segundo mensageiro (Baek et al, 2002; Gallardo et al, 2015). Esse corepressor interage fortemente com o receptor do hormônio da tireoide e com o receptor do ácido retinóico (Horlein et al, 1995; Kurukawa et al, 1995). Porém, estudos *in vitro* têm demonstrado que a presença de agonistas promove a interação desse corepressor com receptores esteroides, como os receptores de estrogênio, progesterona e andrógenos (Zhang et al, 1998; Dotzalaw et al, 2002; Trtková et al, 2010). Uma das funções atribuídas ao NCoR é o recrutamento de complexos histona-desacetilase (HDAC) para reduzir o nível de acetilação de histonas e reprimir a transcrição. Além disso, esse corepressor pode competir com coativadores na interação com receptores de hormônios esteroides, na presença de antagonistas (Wu et al, 2006).

Animais nocautes ou transgênicos para o NCoR permitem avaliar as consequências da perda da atividade repressora dessa proteína. Camundongos nocaute para o NCoR tem comprometimento no desenvolvimento de células de defesa e eritrócitos, levando a letalidade na metade da gestação (Jepsen et al, 2000). Camundongos transgênicos expressando NCoR sem a região N-terminal mostrou um aumento na proliferação de hepatócitos e uma desregulação de genes hepáticos regulados pelo triiodotironina (T3) (Feng et al, 2001). Estudos utilizando as mesmas deleções da região N-terminal do NCoR em *Xenopus* resultou fenótipos similares ao tratamento com ácido retinóico, com um comprometimento na formação da região do cérebro anterior, sugerindo que a repressão do receptor do ácido retinóico é crítica para a formação do sistema nervoso nesses indivíduos (Koide et al, 2001). Alteração na expressão do NCoR também podem levar a várias alterações metabólicas. A resistência ao hormônio da tireoide é uma doença genética humana caracterizada por uma falha na resposta fisiológica a esse hormônio e está associada a mutações em seu receptor

(T3R- β) que não conseguem desfazer sua interação ao NCoR ou SMRT após tratamento hormonal (Safer et al, 1998).

Os moduladores seletivos dos ER como o tamoxifeno, um antagonista de ER α , são muito utilizados no tratamento inicial do câncer de mama, inibindo a progressão da doença. A atividade desse antagonista é em parte atribuída à sua capacidade de estabilizar a ligação de ER α aos correpressores e uma redução na expressão tanto de NCoR como de SMRT aumenta a resistência das células cancerígenas da mama a esse modulador (Brzozowski et al, 1997; Smith e O'Malley, 1997; Shiau et al, 1998; Heldring et al, 2007). Nos casos de câncer de próstata, a terapia de privação de andrógenos em combinação com o tratamento de antagonistas de AR, como flutamida é muito utilizada, devido a este antagonista competir com os agonistas para ligação ao AR, bem como estabilizar a ligação de NCoR/SMRT a esse receptor, inibindo sua ação (Denmeade e Isaacs, 2002; Salesi et al, 2005). A redução da expressão desses corepressores ativam a via transcricional pelo AR, levando a progressão do câncer. Da mesma forma, uma elevada expressão do ambos correpressores também ativa os genes dependentes da ação do AR, demonstrando que uma superexpressão dessas proteínas nem sempre induz a sua atividade repressora (Berrevoets et al, 2004; Yoon e Wong, 2006; Laschak et al, 2011). Nos testículos, foi demonstrado a presença do NCoR nas células de Leydig e animais tratados com o desregulador endócrino bisfenol A mostraram queda na expressão dessa proteína, mas os seus efeitos ainda são indeterminados (Salian et al, 2009).

1.1.5.3 - REA

O repressor de atividade de receptores de estrógenos (REA), também é um importante correpressor, o qual interage especificamente com ambos ER (Montano et al, 1999). É membro da família das proteínas denominadas proibitinas, sendo conhecido também como Proibitina 2. A família inclui a proteína homóloga Proibitina 1, com a qual possui 60% de similaridade. REA é uma proteína de 37kDa encontrada no cromossomo 6 de camundongos e na região 12p13 em humanos (Montano et al, 1999; Nijtmans et al, 2002; Paria et al 2002; Artal-Sanz et al, 2009a; Artal-Sanz et al, 2009b; Merkwirth e Langer, 2009). Essas proteínas foram identificadas em vários organismos, como bactérias, plantas, animais e humanos (McClung et al, 1995; Snedden e Fromm, 1997; Mishra et al, 2006).

As proibitinas possuem uma região N-terminal que é um domínio transmembrana necessário para localização mitocondrial, conservado ao longo da evolução, e uma região C-terminal em espiral responsável pela interação entre as proibitinas (Thuaud et al, 2013; Bavelloni et al, 2015). No entanto, a região C-terminal do REA possui um domínio de ligação

ao ER e, dentro desse domínio, há uma sequência de importação nuclear, que possivelmente se origina por modificações pós traducionais e determina o recrutamento nuclear dessa proteína (Kasashima et al, 2006; Bavelloni et al, 2015). REA possui duas regiões importantes para a sua atividade: uma, que compreende os aminoácidos 19 à 49 e 150 à 174, está relacionada à atividade repressora desse cofator, enquanto que a região dos aminoácidos 175-198 compreende a ligação do cofator à região AF-2 dos ER (Delage-Mourroux et al, 2000).

As proibitinas podem ser encontradas no núcleo, citoplasma e mitocôndrias, exercendo funções distintas (Thuaud et al, 2013). Nas mitocôndrias, além de participarem de sua biogênese, as proibitinas também formam complexos responsáveis pela estabilidade mitocondrial, além de participarem de outros processos mediados por esse componente citoplasmático, como inibição da apoptose, morte celular e senescência (Mishra et al, 2006; Artal-Sanz et al, 2009a; Artal-Sanz et al, 2009b; Osman et al, 2009; Thuaud et al, 2013). O nocaute do gene das proibitinas são letais para embriões de camundongos, indicando que essas proteínas exercem papéis fundamentais nos estágios iniciais do desenvolvimento dos vertebrados e em fêmeas adultas, onde promove a infertilidade (Park et al, 2005).

No núcleo, elas atuam de forma independente, inibindo a transcrição de genes (Mishra et al, 2006; Thuaud et al, 2013). Foi demonstrado que na presença de estrógeno, antiestrógenos e ER α , o REA é translocado das mitocôndrias para o núcleo, atuando como um correpressor específico da atividade transcricional desse receptor (Montano et al, 1999; Kasashima et al, 2006). O REA não afeta diretamente a ligação do ER ao DNA, mas exerce seu efeito repressor competindo com SRC1 pela ligação a ER, além de recrutar histona-desacetilases das classes I e II, reprimindo a transcrição (Delage-Mourroux et al, 2000; Kurtev et al, 2004; Park et al, 2005). Nas glândulas mamárias, o equilíbrio entre a ativação da transcrição via o coativador SRC-3 e a inibição do processo por ambas as proibitinas é essencial para a homeostase da glândula (He et al, 2008). Apesar de interagir com a proibitina I formando complexos proteicos, apenas as formas isoladas do REA possuem ação correpressora dos ER (He et al, 2008).

As proteínas da família p160 interagem com vários receptores nucleares e as mesmas são recrutadas apenas quando os mesmos estão ligados a agonistas (Onate et al, 1995; Smith et al, 1996; Voegel et al, 1996; Heery et al, 1997; Li e Chen, 1997; Shibata et al, 1997). As outras proteínas correpressores NCoR e SMRT, apesar de interagirem com os ER, possuem ações específicas nos receptores dos hormônios nucleares não esteroides, como o receptor dos hormônios tereoidianos, receptor de ácido retinóico e receptor de vitamina D, interagindo com esses receptores apenas na ausência dos hormônios cognatos. As específicas interações com

os receptores de estrógeno diferem o REA das outras proteínas correguladoras (Chen e Evans, 1995; Horlen et al, 1995; Zamir et al, 1997).

1.1.6 - Justificativa

Acredita-se que diferenças tecido-específicas na composição de cofatores sejam responsáveis pelas diferentes respostas dos ARs e ERs a ligantes. Por exemplo, altos níveis de SRC1 no endométrio e baixos níveis na mama determinam diferenças na resposta a 4-hidroxitamoxifeno, que comporta, respectivamente, como agonista no endométrio e antagonista na mama (Shang e Brown 2002). Além de tamoxifeno, outros moduladores seletivos de receptores de estrógenos (SERM), como o raloxifeno, também apresentam atividade antagonista em alguns tecidos (ex: mama), mas agonista em outros (ex: ossos e vasos).

Pouco se sabe sobre cofatores de receptores esteroides no sistema genital masculino, sendo que a maioria das investigações se limita às interações entre cofatores e receptores de andrógenos (AR). Muito menos é conhecido sobre as interações entre receptores de estrógenos e seus cofatores, sendo que nada se conhece sobre esse tema nos ductos eferentes.

Dessa forma, nossa proposta foi de investigar os cofatores SRC1, NCoR e REA em diferentes órgãos alvo de andrógenos e estrógenos em ratos: (a) os testículos, que oferecem oportunidade de diferenciar os mecanismos reguladores de transcrição em células que coexpressam AR, ER α e ER β (células de Leydig), AR e ER β (células de Sertoli) ou só ER β (células espermatogênicas), (b) os ductos eferentes, com elevadas concentrações de ER α ; (c) a próstata, com elevadas concentrações de ER β . Nossa hipótese é de que esses diferentes alvos expressam padrões distintos de cofatores que correlacionam com a abundância de AR, ER α e/ou ER β . Essas diferenças na expressão de receptores e cofatores transcricionais podem representar elementos chave para o desenvolvimento de agonistas ou antagonistas de AR e ER que poderão ser úteis no controle de importantes patologias, como o câncer de próstata e de testículos, ou servir como base para o desenvolvimento de fármacos que atuem na (in)fertilidade masculina.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Mapear e comparar a distribuição celular de cofatores de receptores esteroides nucleares em órgãos do sistema genital masculino de ratos, que possuem expressão diferencial e/ou coexpressão de receptores de estrógenos ER α e ER β e receptores de andrógenos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Mapear a expressão do coativador SRC1 e correpressor NCoR nos testículos, ductos eferentes e próstata ventral de ratos adultos;
- b) Averiguar possíveis alterações na expressão de SRC1 e NCoR nos testículos, ductos eferentes e próstata ventral de ratos ao longo do desenvolvimento pós-natal;
- c) Mapear a expressão do correpressor REA nos testículos de ratos neonatos a idosos;
- d) Relacionar a expressão de REA nos testículos com a expressão de ER β .

MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Para o presente estudo, foram utilizados ratos Wistar machos de diversas idades, entre elas neonatais, pré-púberes, adultos e senis (1, 5, 10, 20, 30 40, 50, 60 dias, 3, 6 12, 18 e 24 meses de idade; n = 6 para cada grupo), obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). Os períodos escolhidos objetivaram cobrir as principais fases do desenvolvimento pós-natal testicular, prostático e dos ductulos eferentes de ratos (Ojeda, Advis & Andrews, 1980; Francavilla et al, 1986; Prins e Birch, 1995; Ojeda & Skinner, 2006).

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, sob condições de iluminação e temperatura constantes, 12 horas de claro e 12 horas de escuro, a 22°C, e receberam água e ração comercial peletizada, Nuvilab (Nuvital nutrientes S.A., Colombo, PR), *ad libitum*. Os procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG seguiram o protocolo publicado pelo CEUA/UFMG (<https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/inicial/>).

3.2 - COLETA DE TECIDOS

Após atingirem as idades desejadas, os animais foram eutanasiados pela administração intraperitoneal de anestésico em concentração (pentobarbital sódico 50mg/Kg e cloridrato de quetamina 10 mg/kg), precedido de heparinização. A seguir, os animais foram perfundidos com solução de formalina neutra tamponada a 10% por via transcardíaca. Os testículos, ductulos eferentes e próstata ventral foram então dissecados e destinados à inclusão em parafina, para os estudos histológicos, de imunohistoquímica e de imunofluorescência.

3.3 - MORFOLOGIA

Após fixação, fragmentos de testículos, ductulos eferentes e próstata ventral foram desidratados em série de etanóis em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão em parafina. Foram obtidas secções de 4 - 5 µm de espessura, os quais foram submetidos à coloração com Hematoxilina/Eosina (HE).

3.4 - IMUNOHISTOQUÍMICA

Cortes de testículos, ductulos eferentes e próstata ventral incluídos em parafina foram colocados em lâminas silanizadas e submetidos à análise de imunohistoquímica para detecção

da proteína coativadora SRC1 e da proteína correpressora NCoR. Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com solução de metanol/H₂O₂ 0,6%. Posteriormente, os mesmos foram submetidos à recuperação antigênica em solução tampão citrato 0,01M pH 6,0, aquecidos em forno microondas por 20 minutos. Os cortes foram incubados com soro normal de cabra ou soro normal de coelho a 10% e a seguir com os anticorpos primários policlonais anti-SRC1 e anti-NCoR, conforme listados no quadro I. Como controle negativo, os cortes foram incubados apenas com PBS ou TBS. Após lavagens, foi realizada a incubação dos cortes por 1h com o anticorpo secundário biotilado coelho anti-cabra ou coelho anti-camundongo (Dako, Carpinteria, CA, USA), na diluição de 1:100, seguido de incubação com solução do complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) por 30 min. A imunomarcagem foi visualizada após exposição a 3,3'-diaminobenzidina contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCL, 0,05M, pH 7,6. Os cortes foram finalmente contracorados com hematoxilina de Meyer, desidratados, diafanizados e montados, para posterior observação e documentação.

3.5 - IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Cortes de testículos foram colocados em lâminas polarizadas e submetidos à imunofluorescência para detecção das proteínas repressoras REA e dos receptores de estrógeno ER β .

Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos à recuperação antigênica em solução tampão citrato 0,01M pH 6,0, aquecidos em forno micro-ondas por 30 minutos. Após resfriamento, os cortes foram permeabilizados com solução tampão. Os tecidos foram incubados com soro normal de coelho ou de cabra, em BSA/TBS 5% ou BSA/PBS 1% por 90 min, para bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos, seguido de incubação por 48h a 4°C com os anticorpos primários anti-REA ou anti-ER β . A relação dos anticorpos utilizados é apresentada na tabela 1. Após a incubação, os cortes foram lavados em solução tampão por 20 minutos e incubados com os anticorpos secundários específicos por 90 minutos. Os controles negativos foram incubados na ausência de anticorpo primário. A marcação nuclear foi visualizada após exposição ao DAPI (*4,6'-diamino-2-phenylindole staining* – DI306, Life Technology, Carlsbad, EUA). As lâminas foram montadas em glicerol contendo Tris-HCl 0,1M na proporção 9:1 e seladas. Os fragmentos de tecido foram analisados utilizando o microscópio confocal Apotome.2 (Zeiss,

Alemanha) e as imagens exportadas para o programa ZEN lite (Zeiss, Alemanha) para o processamento.

Variações na expressão testicular das proteínas analisadas foram investigadas nas diferentes fases do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método acrossômico, que se baseia na descrição morfológica das etapas da formação do acrossomo (Leblond e Clermont, 1952; Russell 1990). Por esse método é possível identificar em ratos 14 estádios do ciclo do epitélio seminífero, denominados estádios I ao XIV.

Quadro I – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência

Proteína Alvo	Nome do Anticorpo	Empresa	Espécie/Tipo	Diluição
SRC1	anti-SRC1 (1135/H4)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Camundongo/ monoclonal	1:300 (ED) 1:800 (VP)
NCoR	anti-NCoR (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Cabra/policlonal	1:50
REA	anti-REA (N-13)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Cabra/policlonal	1:50
ER β	anti-ER β (NCL-ERbeta)	Leica Biosystems, Wetzlar, Germany	Camundongo/ monoclonal	1:25

3.6 - WESTERN BLOTTING

Ensaio de Western blotting foram realizados para comprovar a especificidade dos anticorpos utilizados para detectar NCoR, SRC1 e REA nesse estudo. A β -actina foi utilizada como controle interno dos ensaios. Para isso, fragmentos de testículo e próstata ventral de ratos adultos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em gelo seco, e 100 mg do tecido pulverizado foi homogeneizado em 300 μ L de tampão de extração contendo ureia 8M, Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 0,5mM pH 8.0, e 10% de inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 14.000g e temperatura de 4°C, e a fração sobrenadante contendo as proteínas extraídas foi recolhida.

O total de 40 μ g de proteínas de cada tecido, as quais foram mensuradas por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Fremont, CA, EUA), foi diluído em tampão de amostra contendo sódio dodecil-sulfato 1%, Tris-HCl 30 mM pH 6.8, 2-mercaptoetanol (1x), glicerol 12% (v/v) e azul de bromofenol 0,1%. Após banho sônico e fervura, por 10 e 5 min, respectivamente, as amostras foram submetidas à eletroforese contínua em gel de poliacrilamida 7,5% (para NCoR e SRC1) ou 10%, (para REA e β -actina)

seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio com 10% de soro normal de coelho (para NCOR) ou de cabra (para SRC1 e REA) as membranas foram incubadas em câmara fria *overnight* com anticorpo primário monoclonal anti-NCOR (diluído 1:200 em PBS), anti-REA (diluído 1:1000 em PBS), anti-SRC1 (diluído 1:1000 em PBS) ou anti- β -actina (clone AC-74, diluído 1:5000 em PBS). Após lavagens em PBS-Tween 0,05%, realizou-se a incubação com anticorpo secundário biotilado coelho anti-cabra (para NCOR), cabra anti-coelho (para REA) ou cabra anti-camundongo (para SRC1 e β -actina) (Dako, Carpentaria, CA, EUA), todos diluídos 1:1000 em PBS, *overnight* (para NCoR e SRC1) ou por 1 hora na temperatura ambiente (para o REA e β -actina). Seguiu-se incubação dos cortes com complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Por fim, após lavagens com PBS-Tween 0,05%, a marcação foi visualizada por meio da solução de 0,1% de 3,3' diaminobenzidina em PBS contendo 0,05% de cloronaftol, 9% metanol e 0,04% de H₂O₂.

As bandas principais com peso molecular compatível com o previamente descrito para as proteínas alvo do estudo foram detectadas conforme figura abaixo (Oñate et al, 1995; Montano et al, 1999; Webb et al, 2003).

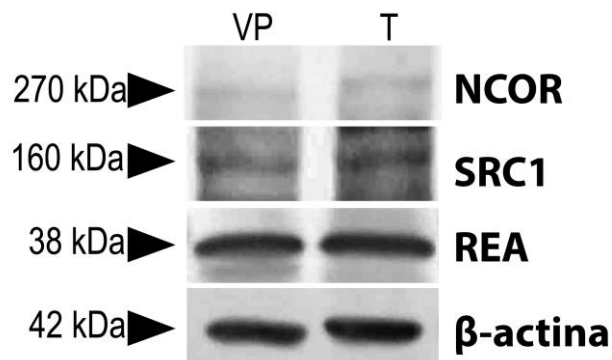


Figura 9 - Western blotting dos cofatores NCoR, SRC1 e REA em próstata ventral (VP) e testículo (T) de ratos. β -actina foi utilizada com o controle interno do ensaio.

3.7 - ANÁLISES QUANTITATIVAS

Foi realizada estimativa da intensidade de expressão de SRC1 nas células de Sertoli ao longo do ciclo do epitélio seminífero, baseado em protocolo previamente estabelecido

(Oliveira et al, 2007, Morais-Santos, 2015). Imagens do testículo de três animais foram obtidas com o auxílio do programa Case Viewer (3DHISTEC Ltd., Budapest, Hungary), transformadas em escala de cinza e o padrão de cores invertido utilizando o Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Para tal, traçou-se a área do núcleo de 10 células de Sertoli de três túbulos seminíferos em cada estágio do ciclo, por animal. A intensidade média de pixels por área de núcleos foi mensurada e os resultados apresentados como média \pm erro padrão.

Para determinar a quantidade de células reativas e não reativas para o SRC-1 no epitélio dos ductos eferentes, cinco ductos da região proximal foram selecionados aleatoriamente, por animal, e foram contadas 10 células por ducto, totalizando 50 células por animal. Foram utilizados os programas Case Viewer (3DHISTEC Ltd., Budapest, Hungary), para a captura das imagens, e ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), para o processamento das imagens e estimativa de células positivas e negativas. Os resultados foram expressos como porcentagem dessas células.

3.8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados referentes a expressão das proteínas foram analisados estatisticamente. Após o teste de normalidade, os dados contendo mais de dois parâmetros foram submetidos ao teste de múltipla variância *One-Way ANOVA*, seguido do teste de Tukey, para comparação *post-hoc* entre grupos para comparações entre dois parâmetros, através do GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Os dados foram expressos em médias e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - TESTÍCULOS

4.1.1 - Imunolocalização de SRC1

Em testículos de animais de 1 a 5 dias de idade, as células de Sertoli, que constituem a população mais numerosa dos cordões seminíferos, foram intensamente positivas para SRC1 (Figura 10 A-B). Os gonócitos centrais apresentaram positividade moderada. As células precursoras das células mioides e células de Leydig apresentam-se em sua maioria positivas para o SRC1.

Com 10 dias de idade, intensa positividade foi observada nas células de Sertoli dos cordões seminíferos, bem como nas células mioides e de Leydig. Algumas células germinativas (gonócitos e espermatogônias) aparentam moderadamente positivas (Figura 10 C). Em adultos, a proteína coativadora SRC1 foi imunolocalizada no núcleo de células de Sertoli e algumas células espermatogênicas nos túbulos seminíferos, apresentando variação estágio-específica (Figura 11 A-N). As células de Leydig apresentaram moderada positividade e as células mioides mostraram positividade intermitente para essa proteína.

Nas células de Sertoli houve marcação para SRC1 em túbulos seminíferos de todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero, no entanto, nos estádios XIV ao VI essas células apresentaram mais intensa positividade para a proteína, a qual gradativamente reduziu do estágio X ao XII (Figura 11 e 12). Destaca-se que nos estádios V e VI as células de Sertoli foram as únicas células imunorreativas no epitélio seminífero (Figura 11 E-F).

As espermatogônias apresentaram-se negativas na maioria dos estádios, exceto nos estádios XII a XIV, onde a imunomarcação das espermatogônias do tipo A foi moderadamente positiva (Figura 11 L-N).

Quanto aos espermatócitos, houve intensa positividade para SRC1 nos espermatócitos em préleptóteno e leptóteno nos estádios VII ao IX, enquanto os espermatócitos em zigóteno apresentaram-se moderadamente positivos nos estádios XII ao XIV (Figura 11 G-H e L-N). Os espermatócitos em paquíteno apresentaram-se fortemente positivos no estágio I, reduzindo a reatividade até os estádios VII e VIII, quando atingiram padrão de *background*, retomando a positividade moderada nos estádios subsequentes. Não foi detectada marcação em espermatócitos em diplóteno nem nas espermátides arredondadas e alongadas ao longo de todo ciclo (Figura 11 A-N).

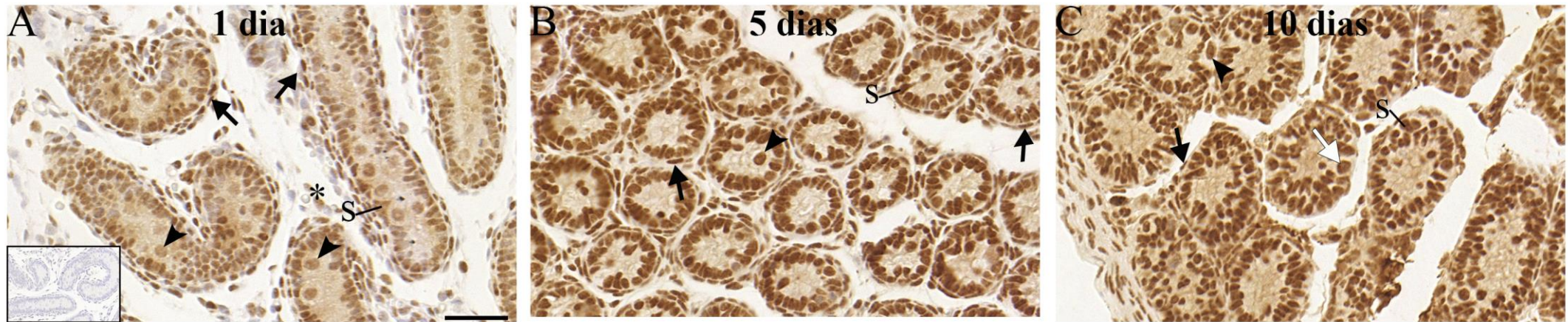


Figura 10 - Expressão de SRC1 nos testículos de ratos Wistar de 1 a 10 dias de idade (A - C). Inseto em A = controle negativo. Asteriscos = células Leydig; cabeça de seta = gonócitos; setas pretas = células mioídes; S = células Sertoli; setas brancas = espermatogônia. Barra: 50 μ m.

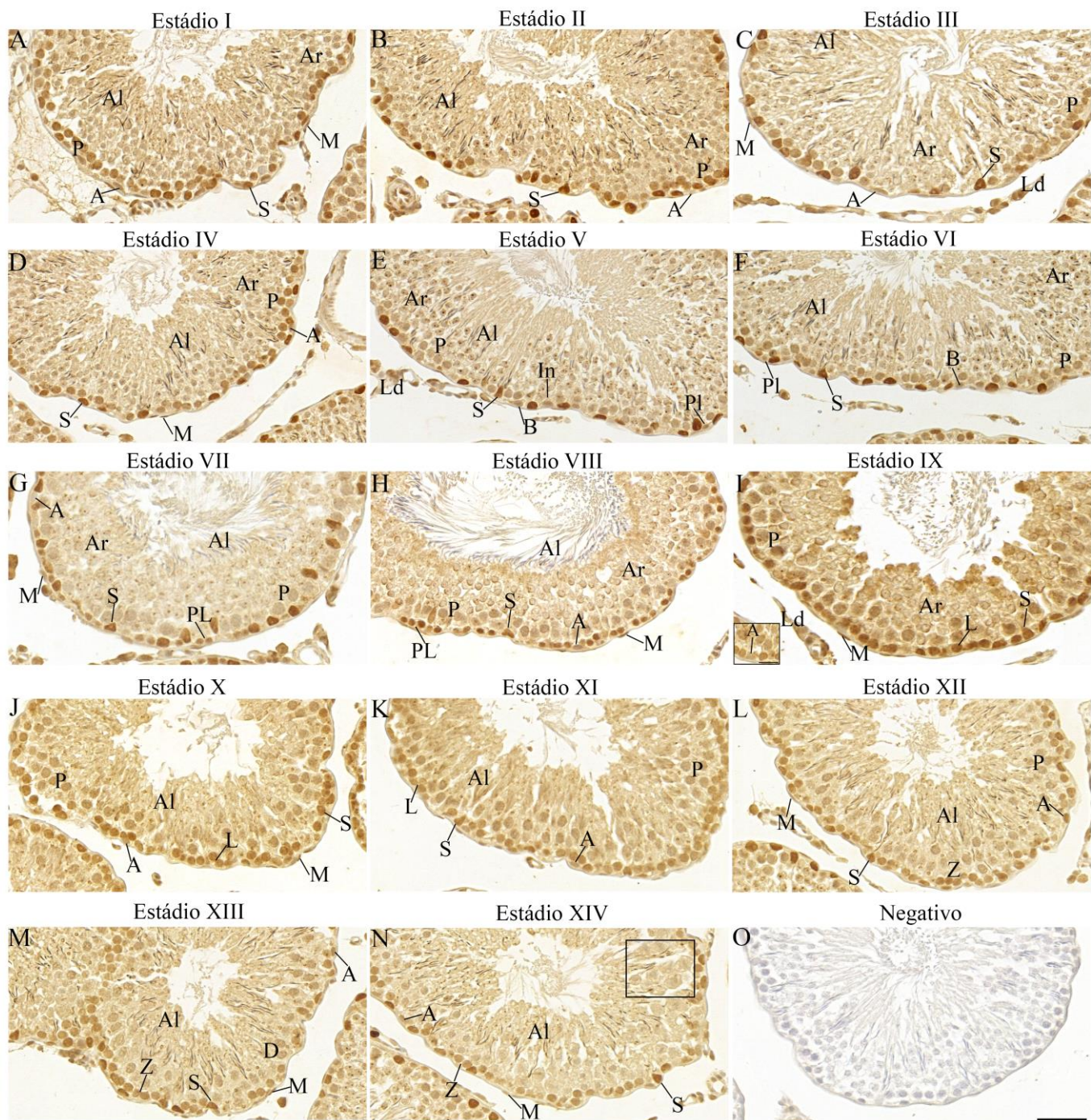


Figura 11 - Expressão de SRC1 em testículos de ratos Wistar adultos. (A-N) Estádios representativos do ciclo do epitélio seminífero com imunomarcção estádio-específica para SRC1. (O) Controle negativo da imunohistoquímica. Inseto em I destaca espermatogônia A negativa no estágio XI. Retângulo em N destaca os espermatócitos em fase final de meiose no estágio XIV. A = espermatogônia A; Al = espermátides alongadas; Ar = espermátides arredondadas; B = espermatogônia B; D = diplótomo; In: intermediária; L = leptótomo; Ld = células de Leydig; M = células mióides; P = paquíteno; Pl = préleptótomo; S = células de Sertoli; Z = zigótomo. Barra = 50µm. Barra no inseto = 20µm.

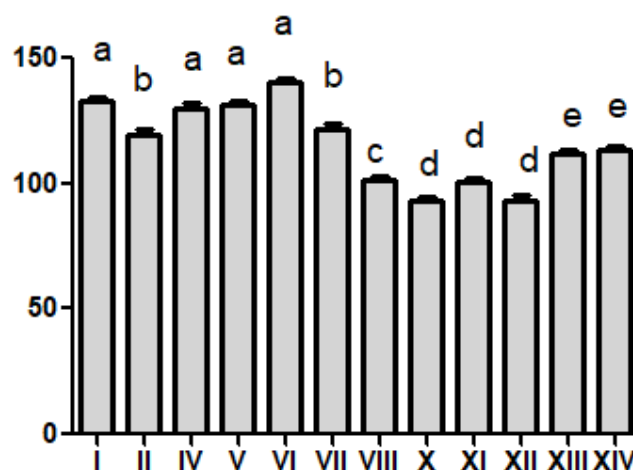


Figura 12 – Intensidade de SRC1 em células de Sertoli de testículos de ratos Wistar ao longo do ciclo do epitélio seminífero. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as fases do ciclo. $p \leq 0,05$.

4.1.2 - Imunolocalização de NCoR

Em testículos de animais neonatos de até 10 dias de idade, as células de Sertoli bem como os gonócitos foram moderadamente positivos para NCoR. A partir de 10 dias de idade, as espermatogônias do tipo A já podiam ser observadas e também apresentaram reatividade moderada. Moderada a fraca expressão do NCoR foi observada nas células precursoras das células mioides e das células de Leydig em todas as idades.

Em testículos de ratos adultos, imunoreatividade fraca a moderada para a proteína NCoR foi observada em núcleo de células de Sertoli em todos estádios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 13A-N). Células peritubulares mioides e células de Leydig foram em sua maioria positivas para a proteína.

As espermatogônias A, B e intermediárias mostraram-se moderadamente positivas para NCoR, assim como os espermatócitos em paquíteno nos estádios I a VI (Figura 13 A-E). Os pré-leptótenos, leptótenos e zigótenos aparentaram moderadamente positivos, exceto no estádio XIV quando ocorreram zigótenos ligeiramente mais reativos. Os paquítenos nos estádios VII a XII, assim como os diplótenos no estádio XIII foram mais fortemente positivos (Figura 13 H-I e M). Positividade nuclear intensa foi observada nas espermátides arredondadas nos estádios I a VIII, mas não nos estádios

subsequentes, nem nas espermátides alongadas ou em alongamento ao longo do ciclo (Figura 13 A-N).

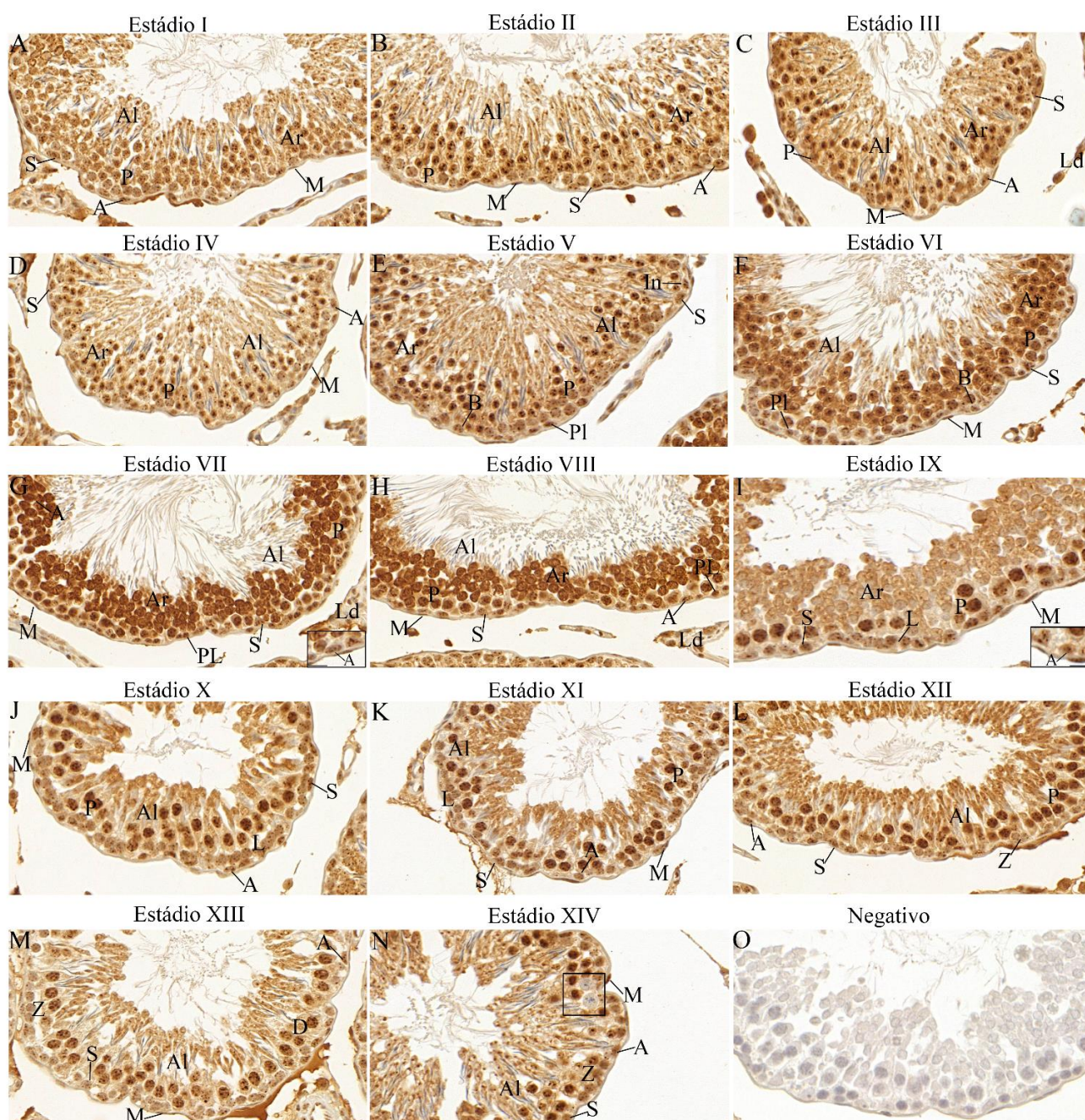


Figura 13 - Expressão de NCoR em testículos de ratos Wistar adultos. (A-O) Estádios representativos do ciclo do epitélio seminífero de testículos de ratos 18 meses de idade. Retângulo em N destaca os espermátócitos em fase final de meiose no estágio XIV. A = espermatogônia A; Al = espermátides alongadas; Ar = espermátides arredondadas; B = espermatogônia B; D = diplóteno; L = leptóteno; Ld = células de Leydig; M = células mioides peritubulares; P = paquíteno; Pl = préleptóteno; S = células de Sertoli; Z = zigóteno. Insertos em G e I = Espermatogônia A. Barra = 50μm. Barra do inserto = 20μm.

4.1.3 - Imunomarcção para REA ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto

A proteína repressora de atividade de receptores de estrógenos (REA) foi imunolocalizada no núcleo de células de Sertoli e células germinativas nos cordões ou túbulos seminíferos, mas não foi detectada nas células de Leydig e células mioides peritubulares nas idades analisadas (Figura 14 A-D).

Em testículos de animais neonatos (5 e 10 dias), intensa imunoreatividade para REA foi detectada nas células de Sertoli, que constituem a população mais numerosa dos cordões seminíferos (Figura 14A e B). Os gonócitos apresentaram-se negativos, exceto quando essas células estavam em proliferação, onde foi identificada marcação citoplasmática. Raras espermatogônias foram observadas em cordões seminíferos de animais com 10 dias de idade, as quais mostraram-se imunonegativas para REA (Figura 14 B).

Em animais de 20 dias de idade, as células de Sertoli apresentaram-se intensamente positivas e as espermatogônias foram negativas para o REA (Figura -14 C). Não foi detectada marcação nuclear em espermátocitos iniciais que povoam o centro dos túbulos, mas foi comumente visualizada positividade citoplasmática.

Aos 30 dias de idade, foram reconhecidas espermatogônias tipo A, espermátocitos em paquíteno e espermátides arredondadas positivas para REA, enquanto os espermátocitos iniciais (pré-leptóteno a zigóteno) mostraram-se negativos para REA (Figura 14 D).

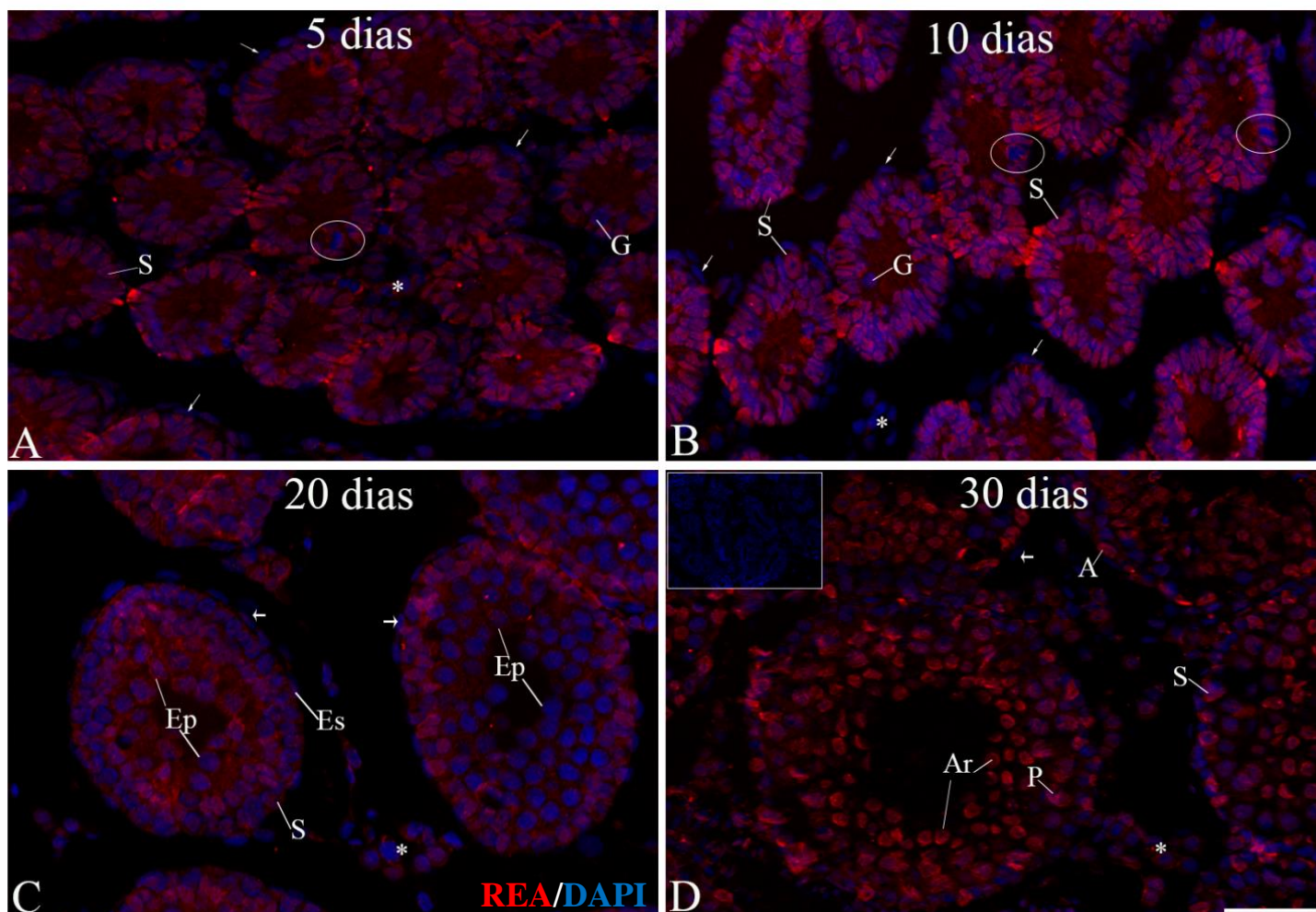


Figura 14 - Expressão de REA (vermelho) em testículos de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade. Os círculos nas imagens A e B destacam a intensa expressão citoplasmática de REA nas células em proliferação. As setas em A e B indicam as células mióides peritubulares e os asteriscos, as precursoras das células de Leydig. As setas em C e D indicam as células peritubulares mióides e os asteriscos, as células de Leydig. Inseto em D = controle negativo. A = espermatogônia A; Ar = espermátides arredondadas; G = gonócitos; Es = espermatogônias; Ep = espermatócitos; S = células de Sertoli; DNA foi marcado pelo DAPI (azul). Barra = 50 μ m.

A partir de 40 dias de idade foi possível distinguir nos túbulos seminíferos os estádios do ciclo do epitélio seminífero, sendo que a expressão de REA nos mesmos foi semelhante nos animais adultos até a velhice (Figura 15 A-I). Nas células de Sertoli a positividade para REA foi intensa em túbulos seminíferos de todos os estádios do ciclo. Nas células germinativas, a expressão de REA apresentou variação estágio específica como se segue.

As espermatogônias do tipo A apresentaram positividade intermitente para REA, enquanto as espermatogônias intermediárias e do tipo B foram negativas (Figura 15 A-I). Quanto aos espermátócitos, não foi detectada marcação nuclear em pré-leptótenos, leptótenos, zigótenos e paquítenos do estágio I a VI (Figura 15 A-D). Por outro lado, houve positividade para REA nos espermátócitos em paquítenos a partir do estágio VII e em diplóteno (Figura 15 E-I). No estágio XIV foi observada intensa marcação citoplasmática nos espermátócitos primários em fases mais tardias da meiose I, tais como metáfase e anáfase, assim como em espermátócitos secundários em meiose II, esses vistos mais raramente (Figura 15 I).

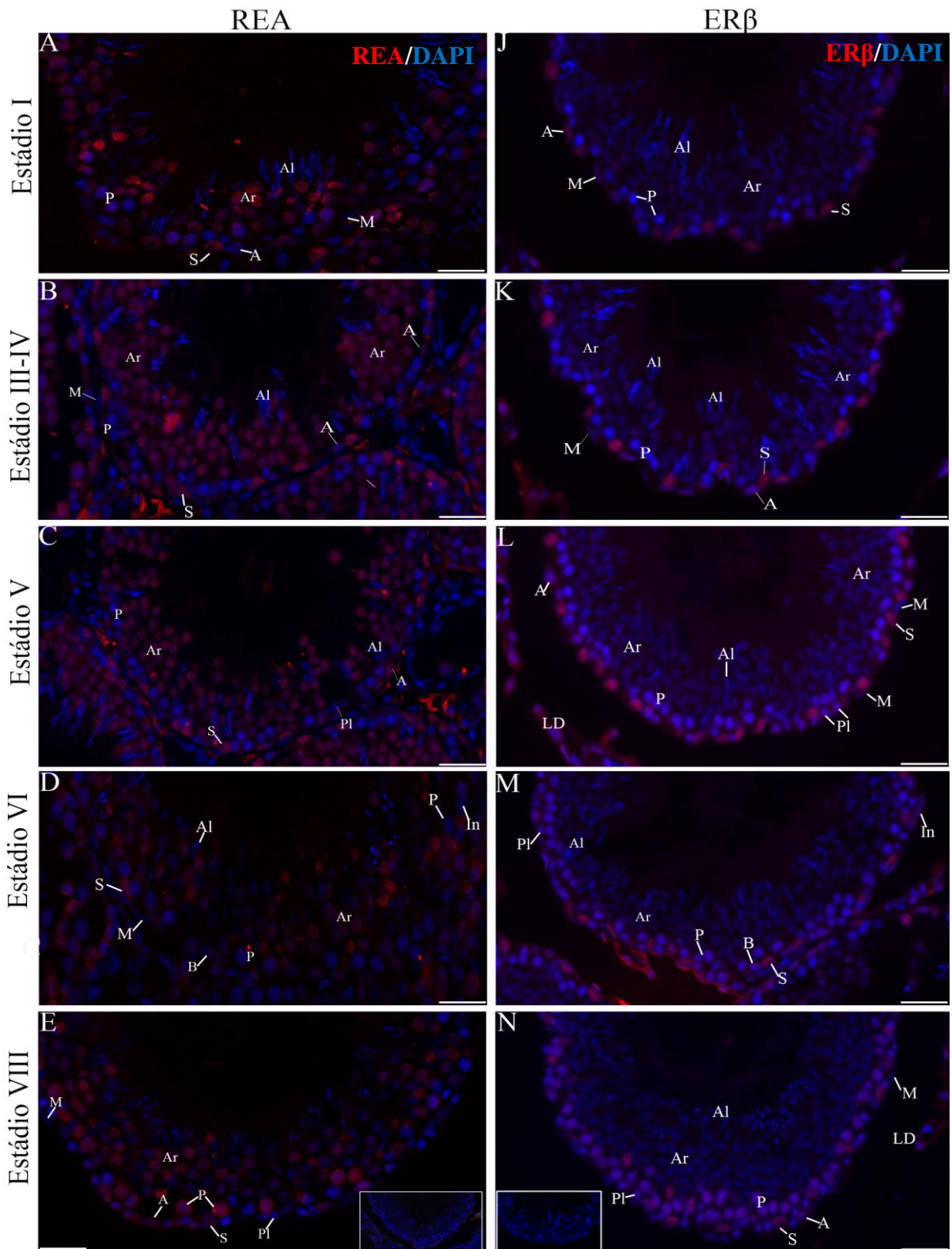
As espermátides arredondadas mostraram-se positivas para REA nos estádios I a VIII (Figura 15 A a E). Nos estádios IX ao XI, quando as espermátides estão em alongamento, foi detectada marcação citoplasmática para REA na fina margem de citoplasma perinuclear (Figura 15 F e G). As espermátides alongadas foram negativas em todos os estádios.

Um resumo da expressão de REA nos testículos ao longo do desenvolvimento pós-natal e senescência encontra-se no quadro II.

Quadro II: Expressão de REA nos testículos de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto.

Idades/Estádio	Neonatal-Juvenil	Púberes a Senis														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	
Células Leydig	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Células Mióides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Células Sertoli	+++/*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Espermatogônia A	-/*	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Espermatogônia In e B	-/++	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Espermatócitos	-/++															
Préleptóteno	-/*	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Leptóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	-	-	NSA	NSA	NSA	
Zigóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	-	
Paquíteno	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NSA	+++
Diplóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	+++	**
Espermátides arredondadas	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	NSA	NSA	NSA	
Espermátides alongadas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NSA	NSA	-	-	-	-	

Neonatais a juvenis (5 a 30 dias de idade) e púberes a senis (40 dias a 24 meses de idade); I a XIV indicam os estádios do ciclo do epitélio seminífero; (+++): intensa marcação nuclear; (++): moderada marcação nuclear; alternância de núcleos moderadamente positivos e núcleos negativos em um mesmo estágio; (+/-): marcação nuclear intermitente; (-): negativo; (*): marcação citoplasmática; NSA: não se aplica.



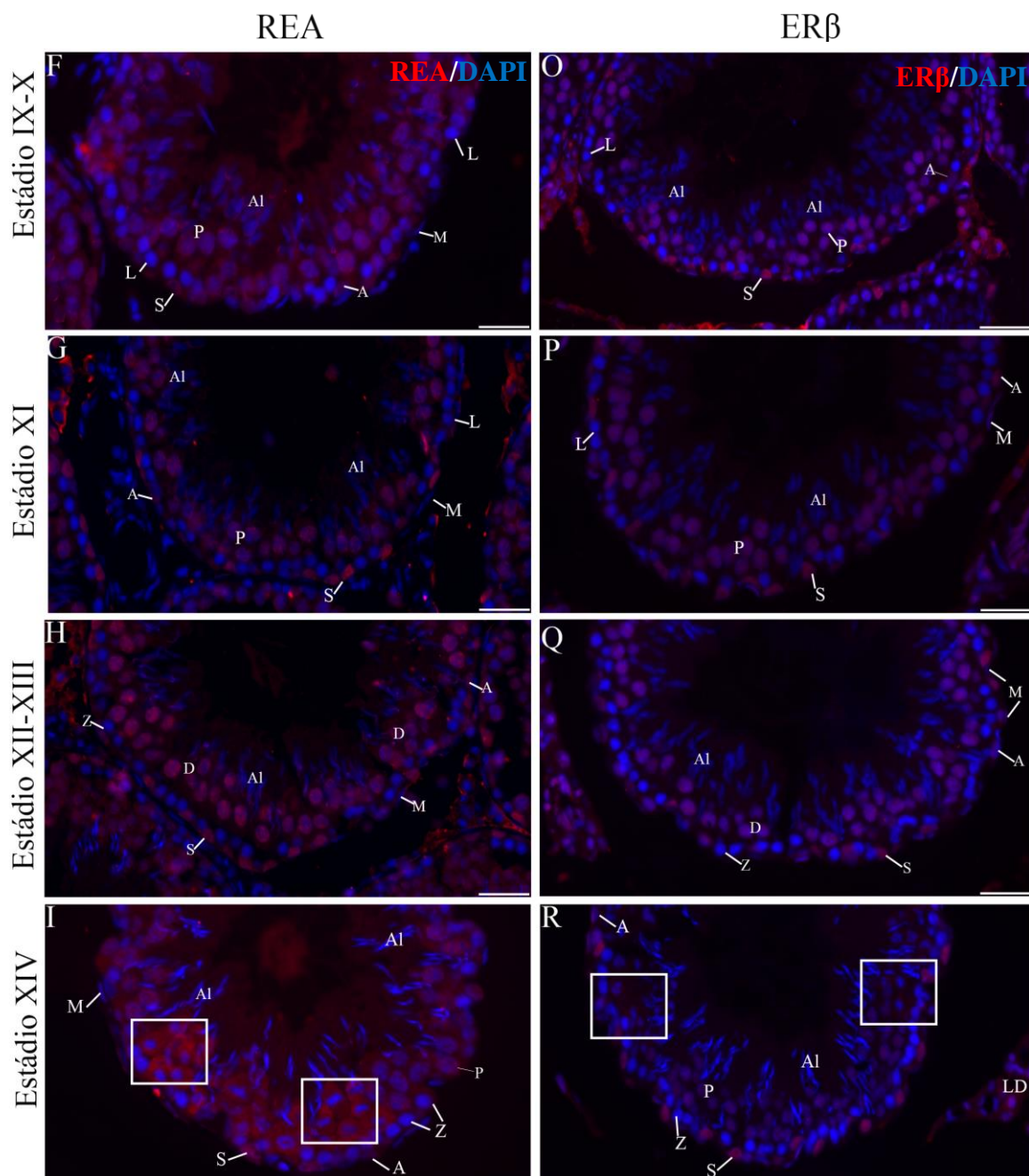


Figura 15 - Expressão de REA e ER β em testículos de ratos Wistar adultos. (A-I) Expressão de REA (vermelho) em estádios representativos do ciclo do epitélio seminífero de testículos de ratos de 18 meses de idade. (J-R) Expressão de ER β (vermelho) em estádios representativos do ciclo do epitélio seminífero de testículos de ratos de 18 meses de idade. Retângulo em I e R destaca os espermatócitos em fase final de meiose no estágio XIV. A = espermatogônia A; AI = espermatídes alongadas; Ar = espermatídes arredondadas; B = espermatogônia B; D = diplóteno; LD = células de Leydig; M = células peritubulares mioides; P = paquíteno; PI = préleptóteno; S = células de Sertoli; Z = zigóteno. Inseto em E e N = controle negativo; DNA foi marcado pelo DAPI (azul). Barra = 50 μ m.

4.1.4 - Imunomarcção para ER β ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto

Nos testículos de animais neonatais (5 e 10 dias), intensa imunoreatividade nuclear e citoplasmática para ER β foi detectada nas células de Sertoli, que constituem a população mais numerosa dos cordões seminíferos (Figura 16 A-B). Os gonócitos também apresentaram citoplasma intensamente positivo, principalmente quando essas células estavam em proliferação (Figura 16 A-B). Não foi detectada reatividade nos precursores das células peritubulares mioides, enquanto no interstício algumas células, possivelmente precursoras de células de Leydig, apresentaram discreta positividade para ER β .

Em animais de 20 dias de idade, as células de Sertoli apresentaram-se intensamente positivas para o ER β tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 16 C). Não foi detectada marcação nuclear em espermatogônias nem em espermátocitos iniciais que povoam o centro dos túbulos, mas foi comumente visualizada intensa positividade citoplasmática nas células em fase final da divisão celular.

Aos 30 dias de idade, foram reconhecidas espermatogônias tipo A, espermátocitos em paquíteno e espermátides arredondadas positivos para ER β , enquanto os espermátocitos iniciais (préleptóteno a zigóteno) mostraram-se negativos (Figura 16 D). As células peritubulares mioides apresentaram positividade intermitente. As células de Leydig apresentaram positividade nuclear e citoplasmática em ambas as idades, sendo mais intensa aos 30 dias de idade.

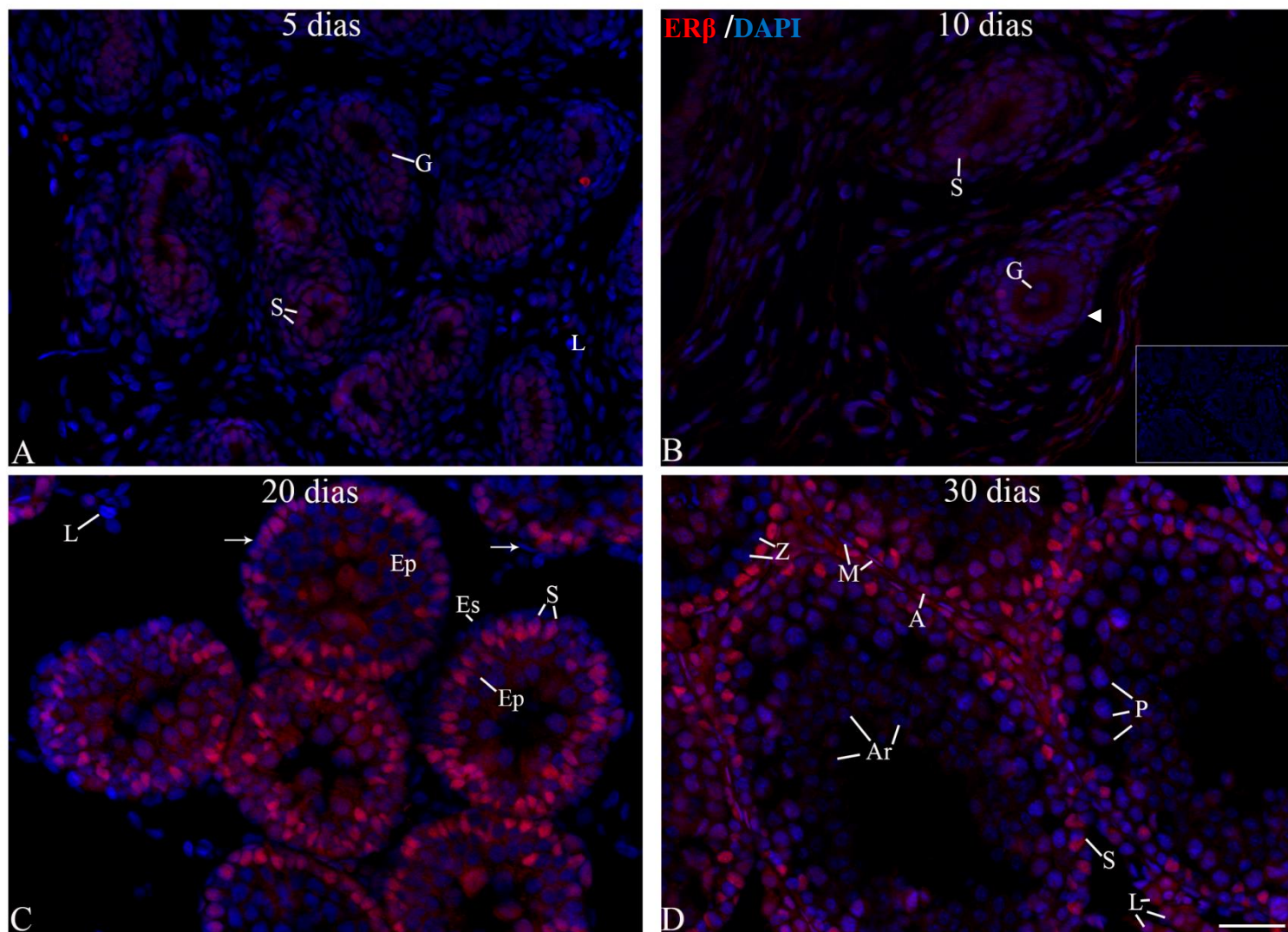


Figura 16 - Expressão de ER β (vermelho) em testículos de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade (A-D). Cabeça de seta em B indica precursores de células mióides. As setas em C indicam as células mióides. Inseto em B = controle negativo. A = espermatogônia; Ar = espermatídes arredondadas; L = células de Leydig; G = gonócitos; Es = espermatogônias; Ep = espermatócitos; S = células de Sertoli; DNA foi marcado pelo DAPI (azul). Barra = 50 μ m.

Dos 40 dias de idade até a senescência (24 meses de idade), a expressão de ER β nos túbulos seminíferos foi semelhante (Figura 15 J-R). O receptor foi intensamente imunolocalizado no núcleo das células de Sertoli em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero. Nas células germinativas, a expressão para essa proteína apresentou variação estágio-específica. As espermatogônias apresentaram moderada positividade para ER β em todos os estádios do ciclo (Figura 15 J-R). Os espermatócitos em préleptótenos foram positivos para o ER β nos estádios V ao VIII, enquanto os

espermátocitos em leptótenos e zigótenos foram negativos para ER β (Figura 15 L-R). Por outro lado, houve positividade evidente para ER β nos espermátocitos em paquíteno a partir do estágio V até diplóteno no estágio XIV (Figura 15 J-R). No estágio XIV foi observada intensa marcação citoplasmática nos espermátocitos primários em fases tardias da meiose, tais como metáfase e anáfase (Figura 15 R). As espermátides arredondadas foram discretamente positivas para ER β nos estádios I-VI, mas a positividade desapareceu nos demais estádios em que essas células se apresentaram (Figura 15 J-N). As espermátides alongadas foram negativas para ER β em todas as fases do ciclo em que elas se encontravam. As células mioídes peritubulares apresentaram positividade intermitente e no compartimento intertubular, as células de Leydig apresentaram positividade para ER β (Figura 15 L).

Um resumo da expressão do ER β nos testículos encontra-se no quadro III.

Quadro III: Expressão do ER β nos testículos de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal até adulto.

Idades/Estádio	Neonatal -Juvenil	Púberes a Senis														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	
Células Leydig	+	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+++	++/+++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+++	
Células Mióides	-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	
Células Sertoli	+++/*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Gonócitos	-/*	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Espermatogônia A	-/++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
Espermatogônia In e B	-/++	NSA	NSA	NSA	NSA	++	++	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Espermatócitos	-/++															
Préleptóteno	-/*	NSA	NSA	NSA	NSA	++	++	++	++	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Leptóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	-	-	NSA	NSA	NSA	
Zigóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	-	-	NSA	
Paquíteno	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NP	**
Diplóteno	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	+++	**
Espermátides arredondadas	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	
Espermátides alongadas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NSA	NSA	-	-	-	-	

Neonatais a juvenis (5 a 30 dias de idade) e púberes a senis (40 dias a 24 meses de idade); I a XIV indicam os estádios do ciclo do epitélio seminífero; (+++): intensa marcação nuclear; (++): moderada marcação nuclear; (++/-): alternância de núcleos moderadamente positivos e núcleos negativos em um mesmo estágio; (+/-): marcação nuclear intermitente; (-): negativo; (*): marcação citoplasmática; NSA: não se aplica.

4.2 - DÚCTULOS EFERENTES

Foi realizado mapeamento da expressão de cofatores SRC1 e NCoR nos ductulos eferentes ao longo do desenvolvimento pós-natal e adulto. O segmento inicial do epidídimo de ratos adultos também foi analisado como uma referência para as regiões morfológicas dos ductulos eferentes.

4.2.1 - Imunomarcção para SRC1

Os ductulos eferentes de 1 dia de idade são revestidos por epitélio cúbico a cilíndrico indiferenciado, o qual apresenta intensa positividade nuclear para SRC1 (Fig. 17). O epitélio é circundado por uma bainha de células mesenquimais peritubulares, dispostas concentricamente, as quais são também intensamente positivas para SRC1. As células mesenquimais entre os ductulos em formação apresentam positividade intermitente para o coativador.

Com 5 dias de idade, o epitélio ainda sem a diferenciação em células ciliadas e não ciliadas permanece fortemente positivo, bem como as células peritubulares que já se organizam em 3 a 4 camadas de células com núcleos alongados, semelhante a células musculares lisas (Figura 17).

No epitélio dos ductulos com 10 dias de idade, é possível identificar esporádicas células com núcleos negativos para SRC1 interpostos entre as células epiteliais positivas (Figura 17). Com 15 dias de idade, núcleos em posição apical, correspondentes ao conhecido para células ciliadas, apresentam-se com positividade moderada a intensa para o coativador.

Nos animais de 20 dias de idade, os ductulos apresentam epitélio de revestimento com células ciliadas e não ciliadas diferenciadas e fortemente positivas para SRC1. A camada muscular lisa é bem definida, com 2 a 3 camadas celulares, as quais são em sua maioria positivas para a proteína. No tecido conjuntivo intertubular, as células possuem núcleo com positividade intermitente.

A partir de 30 dias de idade, o padrão de coloração mantém-se similar ao anterior, sendo que o epitélio dos ductulos eferentes apresenta características de epitélio maduro, com evidente diferenciação das células epiteliais ciliadas e não ciliadas. Forte marcação para o SRC1 foi observada em ambos tipos celulares (Figura 17).

Nos adultos, as células epiteliais ciliadas e não ciliadas ao longo dos ductos eferentes apresentaram forte imunomarcção nuclear para SRC1 (Figura 18 A-B). Algumas células negativas foram observadas, principalmente na região proximal dos ductos (Figura 19). As células musculares lisas peritubulares e as células do tecido conjuntivo circundante apresentaram marcação intermitente.

Marcação nuclear intensa foi também observada nas células epiteliais do segmento inicial do epidídimo, incluindo células principais, basais, apicais e estreitas (Figura 19 C). As células musculares lisas peritubulares e as células do tecido conjuntivo circundante apresentaram marcação intermitente (Figura 19 A-C).

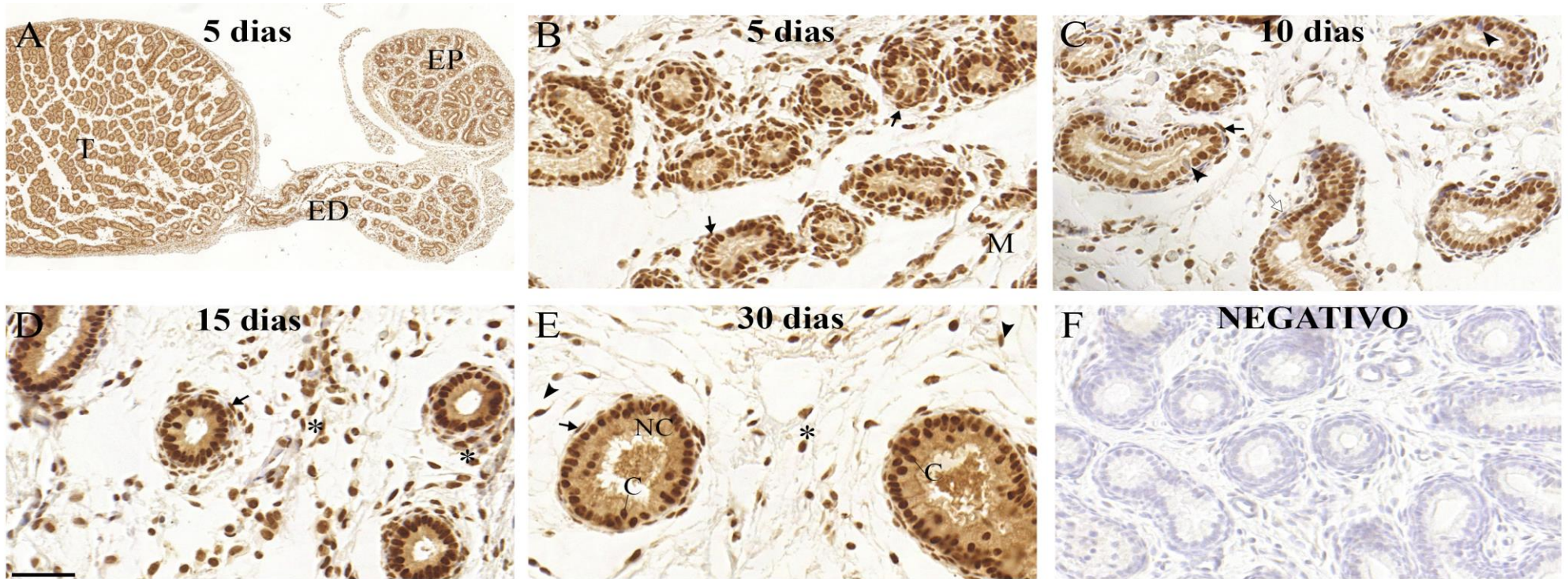


Figura 17 - Expressão de SRC-1 nos ductulos eferentes de ratos Wistar de 5 a 30 dias de idade (A - E). A = visão panorâmica dos ductulos eferentes de animais pré-púberes; F = controle negativo. Asteriscos = tecido conjuntivo; C = células ciliadas; cabeça de seta em C = células epiteliais negativas; ec = células epiteliais; ED = ductulos eferentes; EP= epidídimo; NC = células não ciliadas; M = células mesenquimais; setas = células mesenquimais peritubulares/células musculares lisas; T = testículo. Barra: 50 μ m.

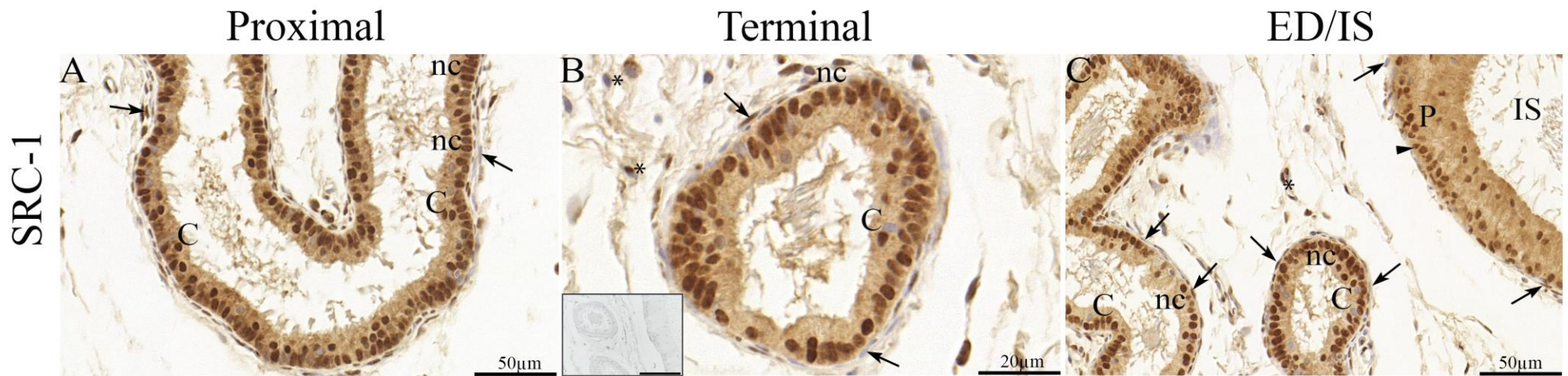


Figura 18 - Expressão de SRC1 nos ductos eferentes e segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar adultos. (A e B) Porção proximal e terminal dos ductos eferentes. (C) Transição dos ductos eferentes (ED) para segmento inicial do epidídimo (IS). Inseto em B = controle negativo. Asteriscos = tecido conjuntivo; C = células ciliadas; cabeça de seta = células basais; IS = segmento inicial; nc = células não ciliadas; P = células principais; Setas = células musculares lisas. Barra no inseto = 50µm.

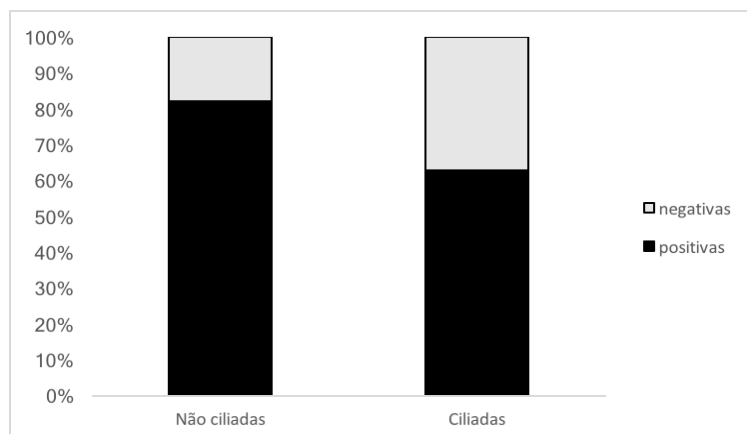


Figura 19 – Proporção de células epiteliais imunopositivas e negativas para SRC1 nos ductos eferentes de ratos Wistar adultos. $p \leq 0,05$.

4.2.2 - Imunomarcção para NCoR

Os ductos eferentes de 5 dias de idade possuem epitélio com moderada positividade nuclear e citoplasmática para o NCoR. A bainha de células peritubulares e intertubulares apresentam positividade intermitente para o coativador.

Com 10 dias de idade o epitélio mantém o mesmo padrão de positividade anterior, exceto pela camada de células peritubulares que já se organizam em 2 a 3 camadas de células delgadas.

Nos animais de 20 dias de idade, o epitélio dos ductos eferentes permanece em sua maioria positivo para o NCoR, tanto no núcleo quanto citoplasma, mas foi comum observar células com núcleos negativos interpostos entre as células epiteliais positivas.

A partir de 30 dias de idade, o padrão de positividade mantém-se similar ao anterior, mas já é possível distinguir no epitélio as células ciliadas e não ciliadas, ambas positivas para NCoR.

Em adultos, imunomarcção para NCoR foi observada no núcleo das células ciliadas e células não ciliadas do epitélio dos ductos eferentes (Figura 20 A-C). Não foi detectada alteração na positividade epitelial para o NCoR ao longo dos ductos.

No segmento inicial do epidídimo, forte marcação nuclear foi observada nas células epiteliais incluindo células principais, basais, apicais e estreitas. Esporádicas células negativas foram observadas no epitélio de ambos os segmentos (Figura 20 A-C).

As células musculares lisas que circundam os ductos eferentes e o epidídimo bem como as células do tecido conjuntivo adjacente apresentaram marcação intermitente para NCoR (Figura 20 A-C).

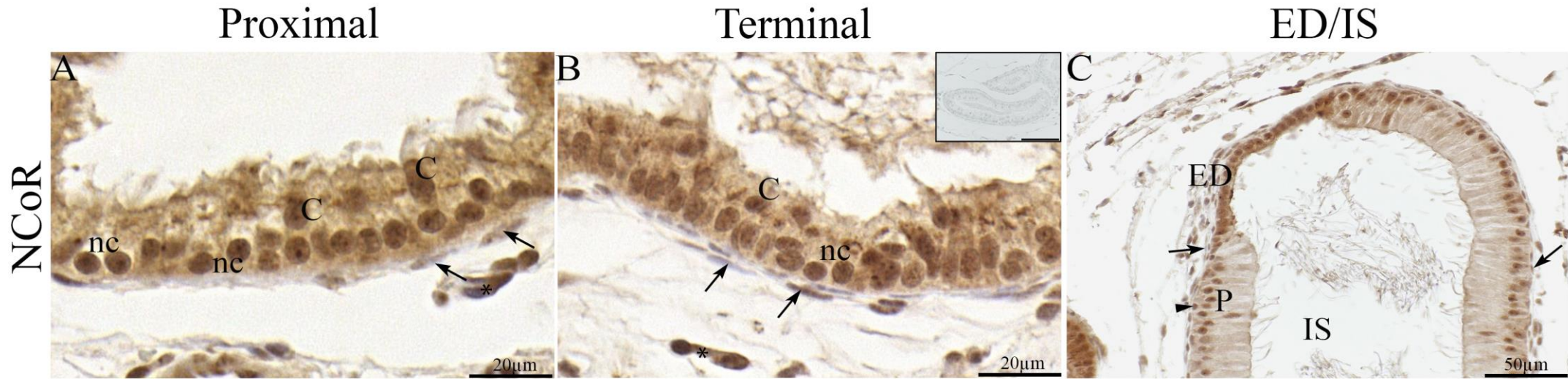


Figura 20 - Expressão de NCoR nos ductulos eferentes e segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar adultos. (A e B) Porção proximal e terminal dos ductulos eferentes. (C) Transição dos ductulos eferentes (ED) para segmento inicial do epidídimo (IS). Inseto em B = controle negativo. C = células ciliadas; cabeça de seta = células basais; nc = células não ciliadas; P = células principais; Setas = células musculares lisas.

4.3 - PRÓSTATA VENTRAL

Foi realizado mapeamento da expressão do coativador SRC1 e correpressor NCoR na próstata de ratos neonatos e adultos, conforme resumido no quadro IV.

4.3.1 - Imunomarcção para SRC1

Animais de 1 dia de idade apresentaram próstata ventral rudimentar ainda sem adenômeros diferenciados, sendo evidenciados apenas primórdios de glândulas, com maciços celulares entremeados por abundante mesênquima (Figura 21 A). Os maciços celulares dos primórdios glandulares, bem como as células mesenquimais circundantes, apresentaram intensa marcação nuclear para o SRC1.

Com 5 de idade já é possível delinear melhor o epitélio em formação, bem como no mesênquima circundante distinguem-se algumas células com distribuição peritubular concêntrica, e outras que se mantêm aleatoriamente dispostas entre os componentes glandulares. A positividade nuclear para SRC1 se mantém no epitélio, enquanto as células peritubulares e do estroma apresentam positividade intermitente (Figura 21 B).

Aos 10 dias de idade, os adenômeros da próstata ventral apresentam lúmen bem definido e revestido por epitélio com núcleo bem corado para o SRC1 (Figura 21 C). A camada de células musculares lisas peritubulares são em sua maioria positivas para SRC1 e as células do estroma apresentaram marcação intermitente.

A partir de 15 dias de idade até os animais pós-púberes, o perfil de expressão do SRC1 se manteve similar, sendo possível identificar as células basais e luminais no epitélio dos adenômeros, as quais apresentaram intensa marcação nuclear (Figura 21 D). A camada de células musculares lisas que circundam os adenômeros são em sua maioria positivas para SRC1, enquanto as células do estroma prostático apresentam positividade intermitente. Não houve alteração do perfil de expressão do SRC1 com o desenvolvimento da próstata até adultos (Figura 22 A-C).

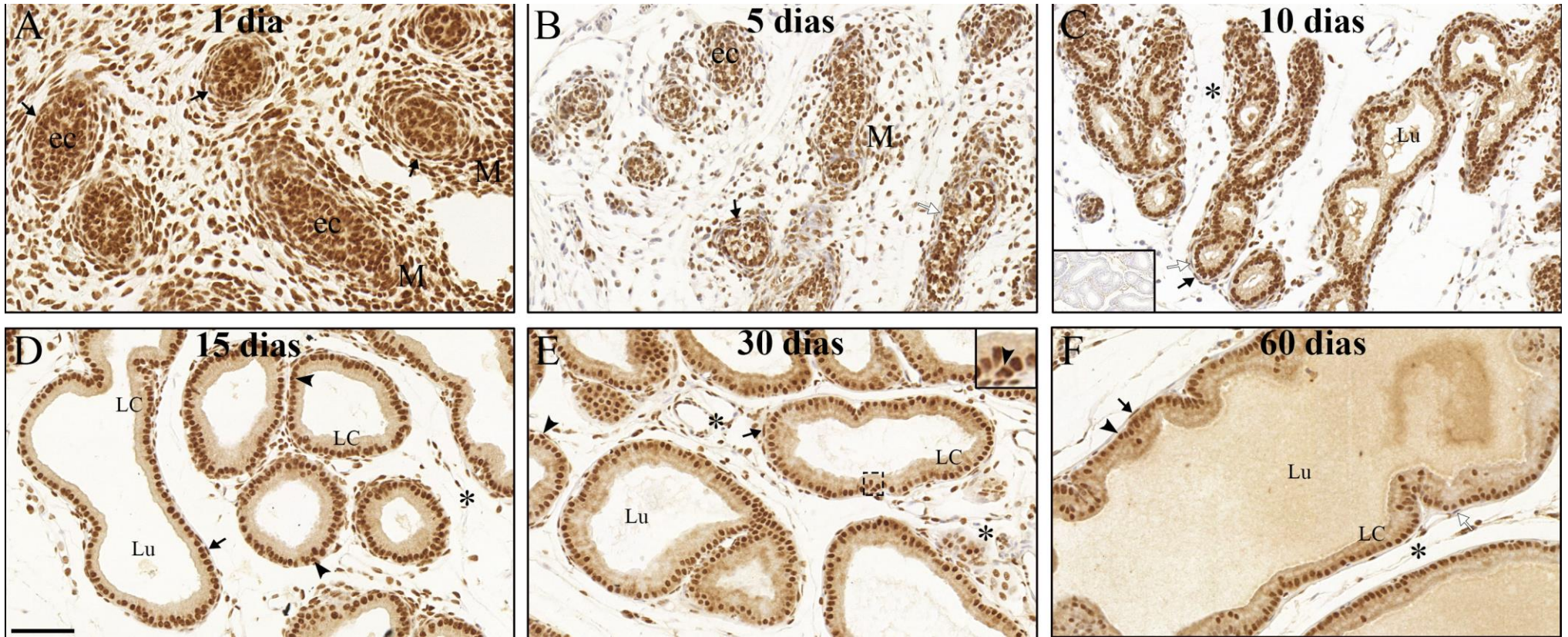


Figura 21 - Expressão de SRC1 na próstata ventral de ratos Wistar de 1 a 60 dias de idade (A - F). Inseto em C = controle negativo. Inseto em E mostra em detalhe a célula basal. Asteriscos = tecido conjuntivo do estroma; cabeça de seta = células basais; ec = células epiteliais indiferenciadas; LC = células luminais; Lu = lúmen; M = células mesenquimais peritubulares; setas = células musculares lisas. Barra: 50 μ m.

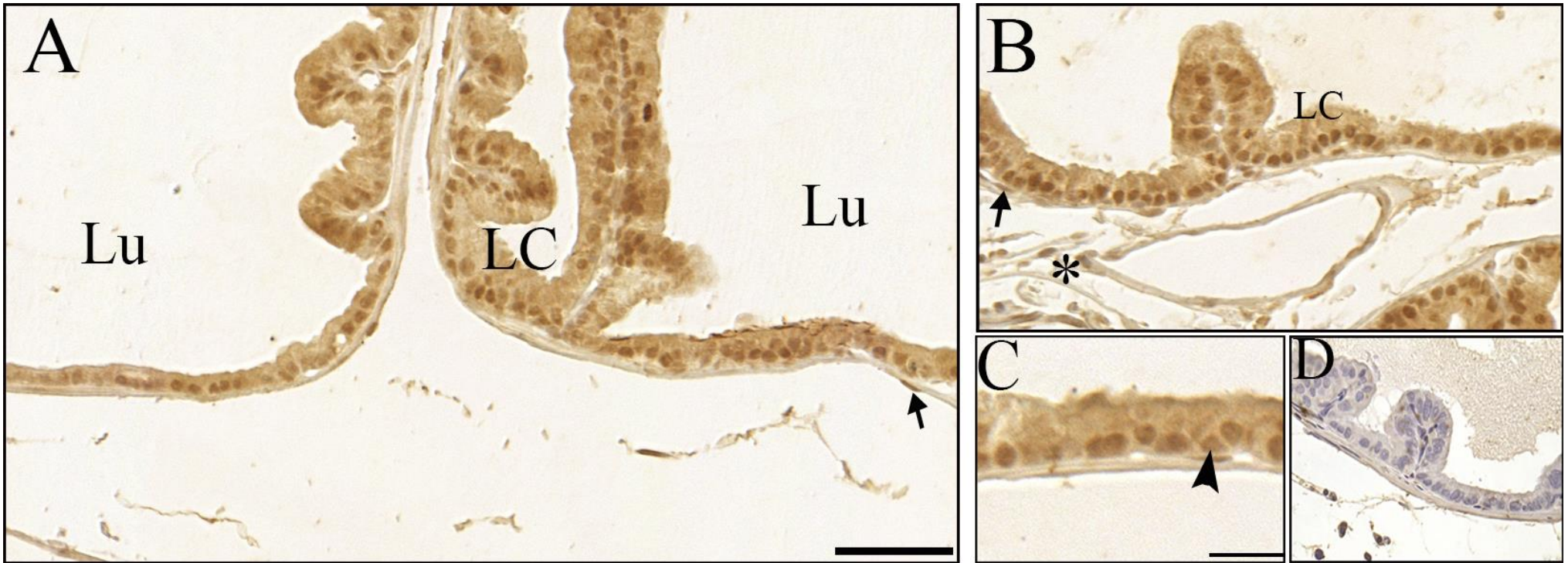


Figura 22 - Expressão de SRC1 na próstata ventral de ratos Wistar adultos (A - D). Asteriscos = estroma; cabeça de seta = células basais; LC = células luminiais; Lu = lúmen; setas = células musculares lisas. Barra = 50 μ m. Barra em C = 20 μ m.

4.3.2 - Imunomarcação para NCoR

Nos animais de 1 dia de idade, NCoR foi fortemente expresso nos maciços celulares dos primórdios glandulares, tanto no núcleo quanto no citoplasma, bem como nas células mesenquimais circundantes (Figura 23 A). No entanto, as células mesenquimais presentes entre os primórdios glandulares apresentaram positividade nuclear intermitente.

Com 5 dias de idade, quando já é possível delinear melhor o epitélio em formação, a positividade epitelial manteve-se semelhante aos animais recém-nascidos, mas houve definição de uma camada de células peritubulares subepiteliais negativas para NCoR (Figura 23 B).

Aos 15 dias de idades, os adenômeros já com lúmen bem definido e revestido por epitélio formado por células basais e luminais, apresentaram núcleo bem marcados (Figura 24 C). A camada de células musculares lisas peritubulares e as células do estroma possuem positividade intermitente para NCoR (Figura 23 C).

O padrão de expressão manteve-se semelhante nos animais a partir de 30 dias de idade até nos adultos, com positividade nas células epiteliais luminais e basais, mas células musculares lisas e do estroma intermitentes para NCoR (Figura 23 D e 24 A-C).

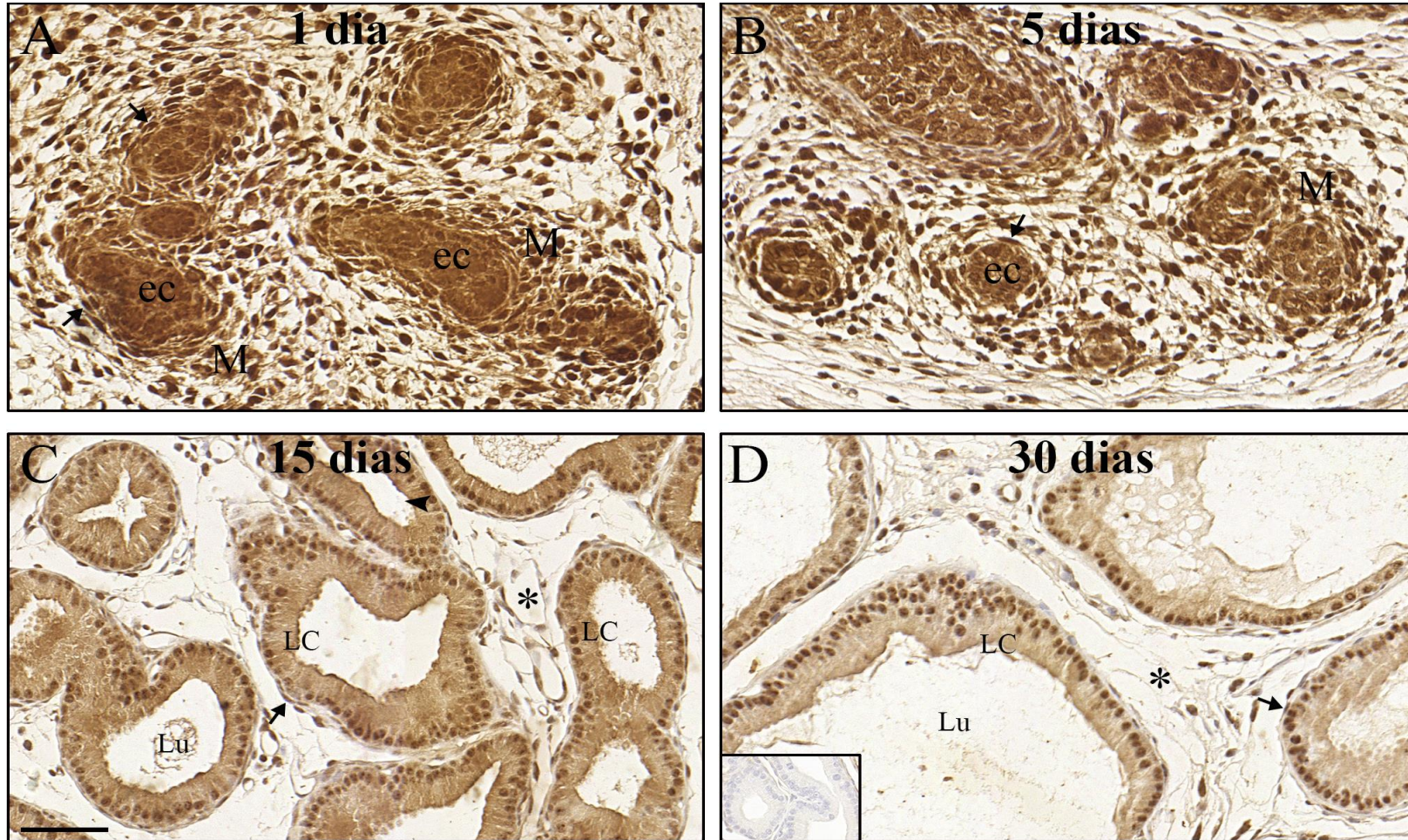


Figura 23 - Expressão de NCoR na próstata ventral de ratos Wistar de 1 a 30 dias de idade (A - D). Inseto em D = controle negativo. Asteriscos = estroma; cabeça de seta = células basais; ec = células epiteliais indiferenciadas; LC = células luminiais; Lu = lúmen; M = células mesenquimais; setas = células musculares lisas. Barra = 100 μ m.

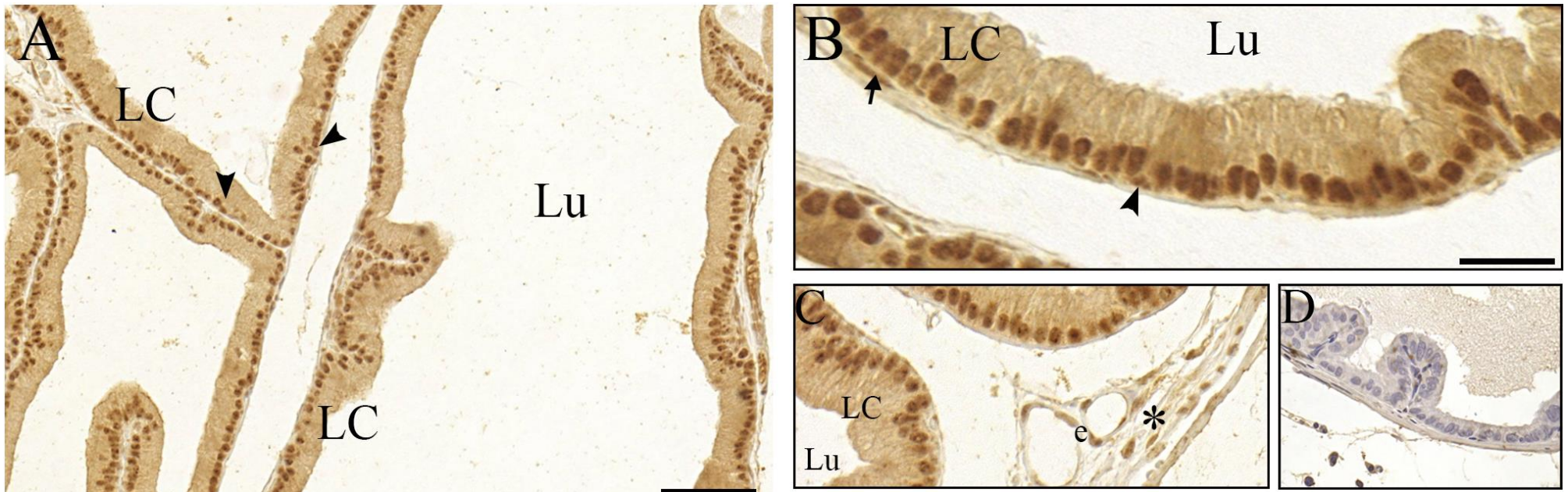


Figura 24 - Expressão de NCoR na próstata ventral de ratos Wistar adultos (A - C). (D) Controle negativo. Asteriscos = estroma; cabeça de seta = células basais; e = endotélio; LC = células luminiais; Lu = lúmen; setas = células musculares lisas. Barra em A: 100 μ m. Barra (B-D) = 50 μ m.

Quadro IV: Expressão de SRC1 e NCoR na próstata ventral de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal e adultos.

Idades	Epitélio indiferenciado	Células basais	Células luminais	Células musculares lisas perialveolares	Células mesenquimais/estromais
SRC1					
Neonatais	+++	+++	NSA	+++/-	+++/-
Juvenis	NSA	+++	+++	++/-	+/-
Adultos	NSA	+++	+++	++/-	+/-
NCoR					
Neonatais	+++	+++	NSA	-	+++/-
Juvenis	NSA	+++	+++	+/-	+/-
Adultos	NSA	+++	+++	+/-	+/-

Neonatais (5 a 10 dias de idade), pré-púberes e adultos (15 a 60 dias de idade) e idosos (3-24 meses); (+++): intensa marcação nuclear; (++/-): alternância de núcleos moderadamente positivos e núcleos negativos; (+/-): marcação nuclear intermitente; (-): negativo; NSA: não se aplica.

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, determinamos de forma sistemática a expressão do coativador SRC-1 e do correpressor NCoR em três importantes órgãos do sistema genital masculino de ratos, que apresentam expressão diferencial de receptores para seus principais moduladores, que são andrógenos (AR) e estrógenos (ER α e ER β). Os dados sobre expressão de cofatores em ductulos eferentes são inéditos. Demonstramos também pela primeira vez a ocorrência e distribuição celular da proteína repressora de atividade de receptores de estrógenos (REA) nos testículos de ratos Wistar desde o período pré-natal e ao longo da vida do indivíduo.

Testículos

As células de Sertoli mostraram-se positivas para todos os cofatores analisados, desde o período neonatal até adulto, enquanto as células mioides e células de Leydig apresentaram marcação intermitente. Nos adultos, os correpressores NCoR e REA não variaram sua expressão ao longo do ciclo do epitélio seminífero, enquanto SRC1 apresentou variação estádio dependente nas células de Sertoli, sendo mais expressa nos estádios pós-meióticos e pré-espermição (I a VIII). Destaca-se que no estádio V-VI as células de Sertoli foram as únicas células imunorreativas para SRC1 no epitélio seminífero. Positividade para SRC1 em células de Sertoli e de Leydig foi previamente descrita em testículo de ratos, mas sem menção sobre variação com o ciclo do epitélio seminífero (Igarashi-Migitaka et al, 2005). Por outro lado, Salian et al (2009) encontraram máxima expressão de SRC1 em células de Sertoli nos estádios III e VIII, reduzindo do estádio IX ao XIV, corroborando nossos resultados.

Sabe-se que as células de Sertoli expressam importantes receptores nucleares, incluindo receptores de andrógenos e estrógenos, que requerem cofatores para modular sua ação. A distribuição de AR é estádio dependente, sendo mais expressa nos estádios VI-VIII (Sar et al, 1990; Bremner et al, 1994; Oliveira et al, 2009). Dados sobre a ocorrência de ER α em células de Sertoli são controversos, sendo descrita para algumas espécies (Ramesh et al, 2007 – fetos de suíno), mas considerada não reativa para outras (Fisher et al, 1997 – sagui; Saunders et al, 2001 – homem e primatas; Nie et al, 2002 – gato e cão; Zhou et al, 2002 - camundongo; Hejmej et al, 2005 - equinos; Oliveira et al, 2009 – morcego), incluindo ratos (Fisher et al, 1997; Oliveira et al, 2003). Como aqui demonstrado e corroborado por dados consensuais da literatura, a expressão de ER β nas

células de Sertoli é intensa e homogênea, independente da idade e do estágio do ciclo (Saunders et al, 1998 e 2001; van Pelt et al, 1999; Nie et al, 2002; Zhou et al, 2002; Ramesh et al, 2006; Condé et al 2009; Oliveira et al, 2009), paralelo ao encontrado no presente estudo para REA e NCoR. Pelo exposto, é possível que tanto REA quanto NCoR possam interagir com esse receptor e modular a resposta a estrógenos nos testículos.

A expressão de SRC1 aqui descrita contrasta com a ocorrência de AR, a qual é também estágio-específica, mas se expressa mais fortemente nos estádios VI-VIII (Bremner et al, 1994; Zhou et al, 2002; Oliveira et al, 2009), onde o coativador é menos reativo para SRC1. Embora SRC1 seja reconhecido como importante no mecanismo de ativação da transcrição induzida por andrógenos nas células de Sertoli, é possível que existam coativadores alternativos a SRC-1, que medeiam a ativação de AR nas fases mais responsivas a andrógenos.

As características da expressão do REA observadas nas células de Sertoli e nas células germinativas ao longo do desenvolvimento do testículo coincidiu com a expressão de ER β nas mesmas células testiculares. Estudos com animais *knockouts* para o REA demonstraram a importância desse corressor para o desenvolvimento, uma vez que a deleção do gene provoca a letalidade dos embriões (Park et al, 2005). Esses resultados reforçam uma possível participação dos estrógenos no desenvolvimento dos testículos e que o REA seria um importante regulador de suas atividades, atuando pela interação com o ER β .

Positividade para o SRC1 foi observada em gonócitos nos testículos de animais neonatos, permanecendo reativo quando essas diferenciam-se em espermatogônias A. No entanto, nos animais adultos, as espermatogônias foram, em sua maioria, negativas para SRC1, exceto nos estádios XII a XIV quando moderada expressão foi detectada em espermatogônias A. Quanto aos corepressores, os gonócitos e as espermatogônias apresentaram positividade para NCoR e REA. Considerando que espermatogônias são positivas para ER β , mas não para AR ou ER α (Bremner et al, 1994; Saunders et al, 1998 e 2001; van Pelt et al, 1999; Zhou et al, 2002; Zhou et al, 2002; Oliveira et al, 2009), NCoR e REA podem ser importantes na modulação da ação estrogênica via ER β . Corroborando esse ponto de vista, experimentos *in vitro* comparando os efeitos de DHT, 3 β -diol e estradiol sobre a síntese de DNA no epitélio seminífero de ratos, mostraram que os esteroides estrogênicos 3 β -diol e estradiol, mas não a DHT, exercem efeito estimulatório similar na síntese pré-mitótica de DNA em segmentos de túbulos

seminíferos em estágio I, enquanto nos estádios V, VII e VIII-IX não responderam (Wahlgren et al, 2008). A marcação das células em proliferação revelou que essas eram espermatogônias A. Nossos resultados mostram a expressão do SRC1 em espermatogônias nos estádios XII e XIV que precedem o estágio I, mas os quais não foram abordados no estudo *in vitro*. Não por acaso, esses são os estádios em que ocorrem mitoses de espermatogônias A. Os autores sugerem que 3β -diol possa ser um fator de crescimento para as células germinativas, estimulando a síntese pré-mitótica de DNA, numa via dependente de ER β . Em conjunto, esses dados indicam que embora o coativador SRC1 pareça exercer função em estádios pontuais, a presença do corepressor REA e NCoR nas espermatogônias em todas as fases da espermatogênese pode ser importante para modular sua atividade proliferativa, dependente de ER β , ao longo de todo o ciclo.

A ocorrência de REA em núcleo de espermatogônias a partir de 30 dias de idade, bem como no citoplasma de gonócitos em proliferação nos períodos neonatais, está de acordo com a distribuição já descrita para ER β nos testículos de ratos fetais/perinatais e adultos (Saunders et al, 1998; van Pelt et al, 1999) e também confirmada recentemente. Essas são sabidamente as células que proliferam mitoticamente, originando as demais células do epitélio seminífero, num processo que precisa ser finamente modulado por fatores locais. De fato, há evidências que dentre esses fatores estão os estrógenos. Nesse sentido, o efeito mitogênico de estrógenos já foi demonstrado *in vitro*, sendo capaz de estimular a proliferação de gonócitos de ratos de 3 dias de idade (Li et al, 1997). Confirmando esse dado, células de Sertoli são consideradas fonte primária de estrógenos nos testículos em desenvolvimento (Hess, 2014), sendo que os níveis de aromatase atingem seu máximo exatamente em torno de 30 dias de idade (Carreau e Hess, 2010). Dessa forma, a expressão paralela de REA pode estar relacionada com modulação dessa atividade proliferativa de gonócitos e espermatogônias, possivelmente estimulada por ação parácrina dos estrógenos provenientes das células de Sertoli. Fato é que tanto REA quanto ER β deixam de se expressar nos espermatócitos iniciais, quando a atividade proliferativa já se encerrou.

Seguindo no processo espermatogênico, SRC1 foi fortemente expresso nos espermatócitos em etapas iniciais de meiose (pré-leptóteno a zigóteno). Em paquítenos a reatividade foi mais intensa nos estádios pós-meióticos, reduzindo gradativamente até se tornar indetectável nos estádios VII e VIII, retomando moderadamente nos estádios subsequentes. O corepressor NCoR foi detectável em núcleo de espermatócitos em

todas fases da prófase I (pré-leptóteno a diplóteno), sendo mais expressivo em paquítenos nos estádios VI a XII e diplótenos. Em contraste, Salian et al (2009) não detectaram NCoR em células espermatogênicas. Em relação a REA e ER β , esses foram negativos para espermatócitos em fases iniciais de meiose, mas ambos foram detectados nos estádios de paquítenos a partir da metade do ciclo do epitélio seminífero e em diplóteno, corroborando dados existentes sobre ER β para diversas espécies (Saunders et al, 1998; Van Pelt et al, 1999; Saunders et al, 2001; Oliveira et al, 2009). Os resultados realçam ainda mais a possível interação entre ER β e REA, já que esse é o receptor de esteroide sexual presente nas espermatócitos em paquíteno e diplóteno (Saunders et al, 1998; Van Pelt et al, 1999; Saunders et al, 2001; Oliveira et al, 2009).

Intensa positividade para o REA e NCoR foi detectada nas espermatídes arredondadas nos estádios pós-meióticos (I ao VIII). Espermatídes arredondadas também são positivas para ER β nos estádios iniciais do ciclo (presente estudo), o que vai de encontro com dados previamente descritos (Van Pelt et al, 1999; Saunders et al, 2001; Oliveira et al, 2009; Assis et al, 2016). Ocorrência similar de ER β foi descrita para morcegos *Artibeus lituratus*, onde a proteína foi mais fortemente expressa nessas células nos estádios pós-meióticos (V-VI pela classificação morfológica), reduzindo na espermição (estádios VII-VIII pela classificação morfológica) até desaparecer nos demais estádios (Oliveira et al, 2009). Também em humanos e macacos, reatividade para ER β foi detectada imediatamente após a formação das espermatídes até o início da condensação nuclear (Saunders et al, 2001). Esses dados são indicativos de que estrógenos são importantes também em outras funções, tais como meiose e espermiogênese, além de modular proliferação celular.

A expressão de ER β e REA de paquíteno a espermatíde arredondada é um dado interessante considerando que aromatase, a enzima responsável pela biossíntese de estrógenos, é encontrada nessas células em níveis até mais altos que nas células de Leydig dos testículos (Janullis et al, 1998; Levallet et al, 1998). A presença de REA pode ser importante no sentido de modular a ação estrogênica local, persistindo nas espermatídes mesmo em fases do ciclo em que os ER β já não são mais imunodetectados nessas células.

Intensa marcação citoplasmática para REA foi detectada em células em plena atividade mitótica, como nos estágios iniciais do desenvolvimento do testículo e também em espermatócitos em fases finais da meiose no estágio XIV. Interessantemente, distribuição citoplasmática de ER β foi também evidenciada em

espermátocitos em segunda divisão meiótica (Saunders et al, 1998). A presença de REA em diferentes compartimentos celulares, incluindo núcleo, mitocôndria e citoplasma já está bem estabelecida, acreditando-se que sua função possa ser diversa dependendo da localização intracelular, como por exemplo proliferação, morte celular, envelhecimento e repressor da diferenciação de células musculares (Sun et al, 2004; Bogenhagen et al, 2008; Artal-Sanz et al, 2009). Além disso, a presença do REA no citoplasma é um importante protetor dos centrômeros e permite a coesão das cromátides em atividade mitótica (Takata et al, 2007). Nesse sentido, além do conhecido papel como supressor de transcrição gênica, quando localizada no núcleo, essa proteína pode ainda estar envolvida com estabilização mitocondrial, incluindo modulação do DNA mitocondrial e de processos dinâmicos como fissão e fusão mitocondrial (Bavelloni et al, 2015). Sendo esses eventos comuns em células em preparação para divisão, essa pode ser a justificativa para a ocorrência de intensa expressão de REA citoplasmática por nós detectada. Há ainda a possibilidade da proteína no compartimento mitocondrial participar de inibição de apoptose (Kasashima et al, 2009).

Interessantemente observou-se que tanto nas células de Sertoli quanto nas células espermatogênicas em paquíteno e diplóteno, assim como nas espermátides arredondadas e alongadas, houve positividade citoplasmática para NCoR e REA. Informações sobre NCoR nos testículos são escassas, mas há relato de que o repressor se expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma de células de Leydig de ratos e que essa é reduzida por BPA (Salian et al, 2009). Esses autores não detectaram a proteína nos túbulos seminíferos, mas o achado em citoplasma de células de Leydig corrobora nossos resultados, apontando que NCoR possa se localizar em ambos os compartimentos celulares. A função melhor conhecida para NCoR e REA é repressão de transcrição gênica, o que requer sua localização nuclear característica. No entanto, para ambos os correpressores são crescentes as informações sobre localização citoplasmática em tecidos e linhagens celulares diversos, tanto em tecido normal quanto carcinogênico, incluindo epitélio coloretal (Tzelepi et al, 2009), tireócitos (Furuya et al, 2007), melanoma (Gallardo et al, 2015), mama (Espinosa et al, 2001; Gallardo et al, 2004) e epitélio prostático (Lopez et al, 2016). A presença de correpressores citoplasmáticos indica que esses podem desempenhar funções adicionais à modulação transcricional (Hermanson et al, 2002; Furuya et al, 2007; Tzelepi et al, 2009; Choi et al, 2013; Mottis et al, 2013; Gallardo et al, 2015; Lopez et al, 2016). Embora as informações sobre função de NCoR citoplasmático ainda sejam escassas, há indícios de

que o correpressor possa atuar como modulador da via de sinalização PIK3 em tireócitos (Furuya et al, 2007), mediar repressão transcricional via ativação de receptor tirosina quinase em membrana plasmática de astrócitos (Sardi et al, 2006), mediar efeito de FGF2 na manutenção de estado indiferenciado de células tronco neural (Hermanson et al, 2002). É possível que à semelhança desses dados, NCoR e REA citoplasmático em células testiculares possam estar envolvidos em interações proteicas diversas visando regular funções celulares também por via não-genômica.

Dúctulos eferentes

A proteína coativadora dos receptores esteroides (SRC1) e a proteína correpressora dos receptores nucleares (NCoR) foram analisadas pela primeira vez nos ductulos eferentes de ratos Wistar ao longo do desenvolvimento pós-natal. Ambas as proteínas foram expressas nas células epiteliais durante todo o desenvolvimento dos ductulos eferentes. As células mesenquimais peritubulares e intertubulares também apresentaram positividade para os cofatores, mantendo expressão após se diferenciarem em células musculares lisas e conjuntivas circundantes.

O epitélio dos ductulos eferentes e do segmento inicial do epidídimo apresentou-se positivo para SRC-1 e NCoR durante o desenvolvimento pós-natal. Sabe-se que os ductulos eferentes são regulados tanto por andrógenos quanto por estrógenos, como indicado pela intensa marcação nuclear para receptores AR, ER α e ER β (Ergun et al, 1997; Fisher et al, 1997; Goyal et al, 1997; Hess et al, 1997; Goyal et al, 1998; Hess, 2002; Oliveira et al, 2002; Oliveira et al, 2004; Hess et al, 2011; Joseph et al, 2011; Ford e Hess, 2014). Durante o desenvolvimento dos ductulos eferentes de ratos, RNAm de ER α é encontrado a partir do período pré-natal nos túbulos mesonéfricos (Mowa e Iwanaga, 2001), sendo a proteína fortemente expressa desde o nascimento até a idade adulta (Fisher et al, 1997, Sar e Welsh, 2001; Atanassova et al, 2001). Em relação aos ER β , não é observado sinal epitelial para RNAm no período pré-natal, sendo que fraca marcação da proteína ocorre entre 5 e 10 dias de idade (Atanassova et al, 2001; Mowa e Iwanaga, 2001; Sar e Welsh, 2001). De forma similar, as células epiteliais dos ductulos eferentes de ratos apresentam fraca positividade para AR logo após o nascimento, se tornando mais intensas a partir de 5 dias de idade (Bentvelsen et al, 1995). Os resultados aqui apresentados sugerem que o SRC1 e NCoR estejam mediando principalmente a ação dos estrógenos por meio do ER α nos ductulos eferentes no período perinatal.

Em contraste com ductulos eferentes, as células epiteliais do segmento inicial do epidídimo, AR e ER β são fortemente expressos, mas as mesmas células são negativas para ER α (Fisher et al, 1997; Oliveira et al, 2002; Saunders et al, 2001; Yamashita, 2004). Os ductulos eferentes expressam altos níveis de ER α , sendo que esse receptor participa na modulação da reabsorção do fluido luminal, bem como na manutenção da morfologia epitelial (Hess, 1997; Hess et al, 2000; Oliveira et al, 2001 e 2002). Apesar de amplamente expresso no epidídimo, a função específica de ER β no local ainda não está estabelecida (Hess et al, 1997; Hess et al, 2011; Joseph et al, 2011). Sabe-se que o SRC1 e NCoR interagem mais intensamente com o AR, no entanto a interação com ambos ER também é conhecida (Horlein et al, 1995; Webb et al, 2000; Cohen et al, 2001; Christiaens et al, 2002; Powell et al, 2004; Hodgson et al, 2005; Cheng et al, 2012). Dessa forma, é possível que eles atuem como moduladores fisiológicos de receptores diversos nos ductulos eferentes.

Quanto ao ER α , estudos *in vivo* demonstram que na presença de antagonistas eles recrutam NCoR, no entanto, estudos *in vitro* tem demonstrado que essa interação é relativamente fraca (Lavinsky et al, 1998; Graham et al, 2000; Webb et al, 2002). Por sua vez, o ER β , também interage com NCoR, mas essa interação ocorre na presença de agonistas e na ausência do ligante (Webb et al, 2003). Dessa forma, aliado ao fato de que o correpressor está presente em ambos os segmentos analisados, a despeito da ausência de ER α no segmento inicial, nossos dados sugerem que o NCoR tenha uma interação preferencial por AR e ER β nos ductulos eferentes. É possível que outros cofatores que interagem mais especificamente com ERs, tais como REA, sejam os reguladores preferenciais de ER α .

Fato interessante foi que algumas células epiteliais dos ductulos eferentes apresentaram-se negativas para SRC1, especialmente as células ciliadas. Tal padrão de expressão não é descrito para os receptores dos clássicos reguladores desse segmento, ou seja, andrógenos e estrógenos. Considerando que numerosos receptores nucleares e fatores de transcrição estão presentes no epitélio dos ductulos eferentes, não se pode descartar a múltipla interação de SRC1. Nesse sentido, há indícios de que o epitélio dos ductulos eferentes e do epidídimo também expressam receptores de vitamina D (VDR) (Stumpf et al, 1984; Ford e Hess, 2014). VDR, por sua vez, recruta SRC-1 para mediar suas ações transcricionais (Castillo et al, 1999; Carvallo et al, 2007). Conforme descrito para hamster, numerosas células ciliadas não apresentam-se reativas para o VDR, assemelhando-se com o encontrado no presente estudo para SRC1 (Ford et al, 2014).

Sem desconsiderar outras possibilidades, esses dados em conjunto apontam possível interação entre SRC1 e VDR nos ductulos eferentes, o que merece investigação mais aprofundada.

Determinar o ambiente de cofatores nos ductulos eferentes torna-se importante considerando a alta expressão de $ER\alpha$, em conjunto com diversos outros esteroides. Essa característica torna o segmento vulnerável a efeitos adversos de ligantes externos dos receptores nucleares, de forma que conhecer os cofatores locais pode ser útil para compreender as diferentes respostas a diversos ligantes que afetam a fertilidade. Não por acaso, em diversas situações os ductulos eferentes são alvos primários de desreguladores endócrinos, cuja disfunção leva a efeitos testiculares graves e até infertilidade (Hess, 1998; Oliveira et al, 2001 e 2002; Martins-Santos et al, 2018).

Próstata

Durante o brotamento prostático em animais recém-nascidos, intensa imunopositividade nuclear para SRC-1 e NCoR foi observada nas células epiteliais e mesenquimais. As células epiteliais mantiveram-se intensamente positivas ao longo de todo desenvolvimento da próstata, enquanto as células do mesenquimais peritubulares e interglandulares tornaram-se intermitentes a partir de 5 dias de idade e assim se mantiveram após diferenciação em células musculares lisas peritubulares e células conjuntivas do estroma. No contexto dos principais hormônios moduladores desse órgão cabe uma comparação dessa distribuição com os receptores de esteroides clássicos - AR, $ER\alpha$ e $ER\beta$.

Sabe-se que as células epiteliais são fracamente positivas para o AR no início do desenvolvimento da próstata, tornando-se intensamente positivas à medida que ocorre a citodiferenciação desse epitélio (Prins e Birch, 1995). As células mesenquimais são fortemente positivas para AR desde o nascimento. De maneira oposta, $ER\alpha$ não é observado no epitélio prostático dos animais recém-nascidos, sendo restrito a poucas células mesenquimais, ao passo que $ER\beta$ aumenta sua expressão epitelial ao longo do desenvolvimento e reduz no estroma, estabilizando no animal adulto (cerca de 90 dias) (Prins et al, 1997; Prins et al, 1998; Sar e Welsh, 2000). SRC1 e NCoR interagem com todos esses receptores nucleares, quais sejam, $ER\alpha$, $ER\beta$ e AR (Alen et al, 1999; Bevan et al, 1999; Trembley et al, 1999; Stenoien et al, 2000; Myers et al, 2004; Powel et al, 2004; Endler et al, 2011; Spears et al, 2012). Dessa forma, os dados aqui expostos reforçam que SRC1 e NCoR estejam mediando as ações dos estrógenos e andrógenos

no desenvolvimento epitelial prostático pela interação com o ER β e AR, respectivamente.

A redução de células reativas para SRC-1 foi presentemente encontrada no estroma prostático durante o desenvolvimento, especialmente das células musculares lisas peritubulares. De forma similar, as células mesenquimais expressam intensamente ER β no início do desenvolvimento da próstata, mas progressivamente diminuem a intensidade de expressão à medida que ocorre a formação do estroma (Kuiper et al, 1996; Prins et al, 1998; Makela et al, 2000; Horvath et al, 2001; Prins et al, 2001; Omoto et al, 2005; Pelletier, 2008). ER α que inicialmente tem expressão nas células mesenquimais subepiteliais da região proximal dos ductos prostáticos em neonatos (1 dia) também tem sua expressão reduzida na medida que as células diferenciam em musculares lisas (Cooke et al, 1991; Prins et al, 1997). Ao contrário, a expressão de AR se mantém intensa nas células do estroma, com a diferenciação (Prins e Birch, 1995). Em ratos, o período neonatal é caracterizado por altos níveis de estrógenos e andrógenos circulantes, sendo que as células mesenquimais e musculares lisas próximas aos ductos prostáticos em formação contém a enzima aromatase, revelando uma possível produção local de estrógenos a partir da testosterona circulante (Resko et al, 1968; Corbier et al, 1992). Em conjunto, esses dados reforçam a evidência da interação de SRC-1 e ERs, regulando a ação dos estrógenos ao longo do desenvolvimento da próstata.

De forma similar, as células dos botões epiteliais da próstata ventral foram intensamente positivas para o NCoR ao longo do desenvolvimento pós-natal. Essas células são fracamente positivas para AR, negativas para ER α , mas possuem expressão crescente de ER β desde o nascimento até a idade adulta (Prins e Birch, 1995; Prins et al, 1997; Prins et al, 1998). A alta expressão do NCoR nas idades iniciais corresponde com o início da citodiferenciação do epitélio (Prins e Birch 1995; Hayward et al, 1998). De forma similar, a expressão de ER β apresenta alguns picos de expressão nas células epiteliais prostáticas, sendo que o primeiro pode ocorrer até 10 dias de idade (Prins et al, 1998), sugerindo que NCoR possa controlar a atividade do ER β no desenvolvimento da próstata ventral.

Dados na literatura tem ajudado a esclarecer algumas funções de ambos os cofatores na próstata. Animais *knockouts* para o SRC1 promovem uma redução no crescimento da próstata além de uma queda de resposta a ação de hormônios esteroides (Xu et al, 1998; Xu e O'Malley, 2002). Em casos de câncer de próstata, o SRC1 apresenta-se em elevada expressão, mas a sua função ainda não está totalmente

compreendida (Agoulnik et al, 2005; Tien et al, 2009). A terapia de privação de andrógenos em combinação com o tratamento de antagonistas de AR em câncer de próstata estabiliza a ligação do NCoR ao receptor, inibindo a ação desse receptor (Denmeade e Isaacs, 2002; Salesi et al, 2005). Apesar da função desse correpressor em adenocarcinomas prostáticos ainda não ser bem compreendida, foi demonstrado um possível mecanismo molecular no qual o NCoR promove um crescimento invasivo de células prostáticas cancerígenas independentes de andrógeno através da interação com proteínas quinases (Yoo et al, 2013). Esses dados em conjunto com os resultados apresentados presentemente destacam a importância de uma maior compreensão das funções dos cofatores SRC1 e NCoR bem como sua interação com os receptores esteroides na próstata, seja em condições normais ou patológicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todos os órgãos analisados os cofatores foram localizados com distribuição subcelular preferencialmente nuclear em células epiteliais e algumas células do tecido conjuntivo. Nos testículos a expressão variou ao longo do ciclo do epitélio seminífero e de acordo com o tipo celular. Nos ductos eferentes e próstata ventral houve ampla expressão do ativador SRC1 e do repressor NCoR, durante o período neonatal e ao longo da vida do indivíduo, compatível com a expressão dos AR, ER α e/ou ER β já descritos na literatura, indicando participação na modulação da ação androgênica e estrogênica local.

Nos testículos foi possível determinar melhor a distribuição diferencial dos cofatores analisados em relação aos ER β , ER α e AR, sendo determinada distribuição desses cofatores mais coincidente com a expressão de ER β , que ER α e AR, desde que esses últimos têm expressão restrita a células de Sertoli, células de Leydig e mioídes, enquanto os cofatores foram mais amplamente distribuídos em diferentes células espermatogênicas e de forma estágio dependente. Encontramos, de forma inédita, estreita relação entre expressão de ER β e REA nos testículos desde o período neonatal e ao longo da vida do indivíduo, corroborando possibilidade de participação de estrógenos em funções testiculares diversas. Os dados apresentados podem ser resumidos no quadro abaixo:

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
al	al	al	al	al	al	al	al						
ar	ar	ar	ar	ar	ar	ar	ar	al	al	al	al	al	al
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	D	II
In	In	In	In	B	B	PL	PL	L	L	L	Z	Z	Z
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: ● REA ■ NCOR ■ SRC1 Letra Vermelha = ER β

Figura 25 – Representação esquemática da expressão de cofatores SRC1, NCoR e REA e ER β ao longo do ciclo do epitélio seminífero de ratos. I a XIV = estádios do ciclo; A = espermatogônia A; Al = espermátides alongadas; Ar = espermátides arredondadas; B = espermatogônia B; D = diplóteno; II = espermatócito secundário; In = espermatogônia indiferenciada; L = leptóteno; P = paquíteno; Pl = préleptóteno; S = Sertoli; Z = zigóteno.

Considerando o conjunto de dados obtidos, sugere-se que esses cofatores sejam importantes no mecanismo para modular a sinalização de andrógenos e estrógenos durante a espermatogênese, bem como no desenvolvimento testicular, da próstata e dos ductulos eferentes e suas funções reprodutivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron, L. T., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288.

Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocrine-Related Cancer*, 6(4), 503–519.

Adams, C. C., & Workman, J. L. (1993). Nucleosome Displacement in Transcription. *Cell*, 72, 305–308.

Agoulnik, I. U., Vaid, A., Bingman, W. E., Erdeme, H., Frolov, A., Smith, C. L., Ayala, G., Ittmann, M. M., & Weigel, N. L. (2005). Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Research*, 65(17), 7959-7967.

Akingbemi, B. T. (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 51.

Albrecht, M., Rämisch, R., Köhn, F. M., Schwarzer, J. U., & Mayerhofer, A. (2006). Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: A new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(5), 1956-1960.

Alen, P., Claessens, F., Schoenmakers, E., Swinnen, J. V., Verhoeven, G., Rombauts, W., & Peeters, B. (1999). Interaction of the putative androgen receptor-specific coactivator ARA70/ELE1 α with multiple steroid receptors and identification of an internally deleted ELE1 β isoform. *Molecular Endocrinology*, 13(1), 117-128.

Arrighi, S., Ventriglia, G., Aralla, M., Zizza, S., Di Summa, A., & Desantis, S. (2010). Absorptive activities of the efferent ducts evaluated by the immunolocalization of aquaporin water channels and lectin histochemistry in adult cats. *Histology and Histopathology*, 25(4), 433–444.

Arroteia, K. F., Garcia, P. V., Barbieri, M. F., Justino, M. L., & Pereira, L. A. V. (2012). The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. *Embryology – Updates and Highlights on Classic Topics*, 41–66.

Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009a). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(8), 394-401.

Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009b). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 461(7265), 793.

Atanassova, N., McKinnell, C., Williams, K., Turner, K. J., Fisher, J. S., Saunders, P. T. K., Millar, M. R., Sharpe, R. M. (2001). Age-, cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor α (but not estrogen receptor β) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology*, 142(2), 874–886.

Badran, H. H., & Hermo, L. S. (2002). Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Journal of Andrology*, 23(3), 358-373.

Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein. *Cell*, 110(1), 55-67.

Bavelloni, A., Piazzini, M., Raffini, M., Faenza, I., & Blalock, W. L. (2015). Prohibitin 2: At a communications crossroads. *IUBMB Life*, 67(4), 239-254.

Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225–236.

Benton, L., Shan, L. X., & Hardy, M. P. (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1-6), 61-68.

Bentvelsen, F. M., Brinkmann, A. O., Van der Schoot, P., Van der Linden, J. E., Van der Kwast, T. H., Boersma, W. J., Schröder, F. H., Nijman, J. M. (1995). Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 113(2), 245–53.

Berndston, W. E. (1977). Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review 1. *Journal of Animal Science*, 44(5), 818-833.

Berrevoets, C. A., Umar, A., Trapman, J., & Brinkmann, A. O. (2004). Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochemical Journal*, 379, 731–738.

Bevan, C. L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D. M., & Parker, M. G. (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1.

Molecular and Cellular Biology, 19(12), 8383–8392.

Bogenhagen, D. F., Rousseau, D., & Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3665-3675.

Bremner, W. J., Millar, M. R., Sharpe, R. M., & Saunders, P. T. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135(3), 1227-1234.

Brinkmann A. O., Klaasen P., Kuiper G. G., van der Korput J. A., Bolt J., de Boer W., Smit A., Faber P. W., van Rooij H. C., Geurts van Kessel A., Vorrhorst M. M., Mulder E., Trapman J. (1989). Structure and function of the androgen receptor. *Urological research*, 17(2), 87-93.

Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, L. G., Gustafsson, J. A., Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753–758.

Buehr, M., Gu, S., & McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117(1), 273–81.

Carreau, S., & Hess, R. A. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1546), 1517–35.

Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., & Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 35.

Carvallo, L., Henriquez, B., Olate, J., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, G. S., Onate, S., Stein, J. L., Montecino, M. (2007). The 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 receptor preferentially recruits the coactivator SRC-1 during up-regulation of the osteocalcin gene. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3–5), 420–424.

Castillo, A. I., Jimenez-Lara, A. M., Tolon, R. M., & Aranda, A. (1999). Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators, CREB-binding protein and steroid hormone receptor coactivator-1 (SRC-1). *Molecular Endocrinology*, 13(7), 1141-1154.

Centenera, M. M., Harris, J. M., Tilley, W. D., & Butler, L. M. (2008). Minireview: The Contribution of Different Androgen Receptor Domains to Receptor Dimerization and Signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(11), 2373–2382.

Chang, W. Y., Birch, L., Woodham, C., Gold, L. I., & Prins, G. S. (1999). Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor- β signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21cip1/waf1 expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology*, 140(6), 2801–2813.

Chen, J. D., & Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377(6548), 454-457.

Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, 90(3), 569–580.

Chen, H., Ge, R. S., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306, 9–16.

Christiaens, V., Bevan, C. L., Callewaert, L., Haelens, A., Verrijdt, G., Rombauts, W., & Claessens, F. (2002). Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49230–49237.

Clulow, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., & Man, S. Y. (1998). Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *Journal of Reproduction And Fertility - Supplement*-, p. 1-14.

Clulow, J., Jones, R. C., & Hansen, L. A. (1994). Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Experimental Physiology*, 79, 915–928.

Cohen, R. N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F. E., & Hollenberg, A. N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Molecular Endocrinology*, 15(7), 1049–61.

Cooke, P. S., Young, P., & Cunha, G. R. (1991). Androgen Receptor Expression in Developing Male Reproductive Organs. *Endocrinology*, 128(6), 2867–2873.

Cool, J., Defalco, T., & Capel, B. (2012). Testis formation in the fetal mouse: Dynamic and complex de novo tubulogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(6), 847–859.

Corbier, P., Edwards, D. A., & Roffi, J. (1992). The neonatal testosterone surge: A comparative study. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 100(2), 127–131.

Coulthard, V. H., Matsuda, S., & Heery, D. M. (2003). An extended LXXLL motif sequence determines the nuclear receptor binding specificity of TRAP220. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10942–10951.

Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Cooke, P. S., Mee, S., Bigsby, R. M., Higgins, S. J., & Sugimura, Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, 8(3), 338–362.

Cunha, G. R., Alarid, E. T., Turner, T., Donjacour, A. A., Boutin, E. L., & Foster, B. A. (1992). Normal and abnormal development of the male Urogenital Tract. *Journal of Andrology*, 13(6), 465–475.

Cunha, G. R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P. C., Risbridger, G., Hayward, S. W., Wang, Y.Z., Donjacour, A. A., & Kurita, T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(4), 221–236.

Da Silva, N., Piétrement, C., Brown, D., & Breton, S. (2006). Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(8), 1025–1033.

Danielpour, D., Kadomatsu, K., Anzano, M. A., Smith, J. M., & Sporn, M. B. (1994). Development and Characterization of Nontumorigenic and Tumorigenic Epithelial Cell Lines from Rat Dorsal-Lateral Prostate Development and Characterization of Nontumorigenic and Tumorigenic Epithelial Cell Lines from Rat Dorsal-Lateral Prostate, 3413–3421.

Davey, R.A., & Grossmann, M. (2016). Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *The Clinical Biochemistry Reviews*, 37(1), 3.

Delage-Mourroux, R., Martini, P. G. V, Choi, I., Kraichely, D. M., Hoeksema, J., & Katzenellenbogen, B. S. (2000). Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *Journal of Biological Chemistry*.

- Delbès, G., Levacher, C., & Habert, R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 132(4), 527–538.
- Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 389.
- Dilworth, F. J., & Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*, 20(24), 3047.
- Dolci, S., Campolo, F., & De Felici, M. (2015). Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45, 114–123.
- De Winter, J. A. R., Trapman, J., Brinkmann, A. O., Boersma, W. J., Mulder, E., Schroeder, F. H., Claassen, E., & Van Der Kwast, T. H. (1990). Androgen receptor heterogeneity in human prostatic carcinomas visualized by immunohistochemistry. *The Journal of pathology*, 160(4), 329-332.
- Dotzlaw, H., Moehren, U., Mink, S., Cato, A. C., Iñiguez Lluhi, J. A., & Baniahmad, A. (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Molecular Endocrinology*, 16(4), 661-673.
- Downes, M., Burke, L. J., Bailey, P. J., & Muscat, G. E. (1996). Two receptor interaction domains in the corepressor, N-CoR/RIP13, are required for an efficient interaction with Rev-erbA α and RVR: physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Research*, 24(22), 4379-4386.
- Dym M. (1976). The mammalian rete testis--a morphological examination. *The Anatomical Record*, 186:493-523.
- El-Alfy, M., Pelletier, G., Hermo, L. S., & Labrie, F. (2000). Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microscopy Research and Technique*, 51(5), 436–446.
- Elkjar, M. L., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T. H., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frøkiær, J., & Nielsen, S. (2000). Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 1118-1128.

Endler, a., Chen, L., Zhang, J., Xu, G.-T., & Shibasaki, F. (2012). Binding of the ER and ARNT1 AF2 domains to exon 21 of the SRC1 isoform SRC1e is essential for estrogen- and dioxin-related transcription. *Journal of Cell Science*, 125, 2004–2016.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K. A. J., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., & Gustafsson, J. A. (1997). Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(12), 4258-4265.

Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - An overview. *Journal of Internal Medicine*, 246(2), 133–138.

Fawcett, D. W., Neaves, W. . B., & Flores, M. . N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9(5), 500–32.

Feng, Q., & O'Malley, B. W. (2014). Nuclear receptor modulation - Role of coregulators in selective estrogen receptor modulator (SERM) actions. *Steroids*, 90, 39–43.

Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P., & Yen, P. M. (2001). Transgenic Targeting of a Dominant Negative Corepressor to Liver Blocks Basal Repression by Thyroid Hormone Receptor and Increases Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15066–15072.

Fisher, J. S., Millar, M. R., Majdic, G., Saunders, P. T. K., Fraser, H. M., & Sharpe, R. M. (1997). Immunolocalisation of oestrogen receptor- α within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *Journal of Endocrinology*, 153(3), 485–495.

Fisher, J. S., Turner, K. J., Fraser, H. M., Saunders, P. T. K., Brown, D., & Sharpe, R. M. (1998). Immunoexpression of Aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. *Endocrinology*, 139(9), 3935–3945.

Ford, J., Carnes, K., & Hess, R. A. (2014). Ductuli efferentes of the male Golden Syrian hamster reproductive tract. *Andrology*, 2(4), 510–520.

França, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L., & Russell, L. D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of reproduction*, 59(6), 1371–1377.

Francavilla, S., Moscardelli, S., Bruno, B., Barcellona, P. S., & De Martino, C. (1986). The postnatal maturation of efferent tubules in the rat: a light and electron microscopy study. *Development*, 96(1), 51-63.

Furuya, F., Guigon, C. J., Zhao, L., Lu, C., Hanover, J. A., & Cheng, S. Y. (2007). Nuclear Receptor Corepressor Is a Novel Regulator of Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 27(17), 6116–6126.

Gallardo, F., Padrón, A., Garcia-Carbonell, R., Rius, C., González-Perez, A., Arumí-Uria, M., Iglesias, M., Nonell, L., Bellosillo, B., Segura, S., Pujol, R. M., Lopez-Bigas, N., Bertran, J., Bigas, A., & Espinosa, L. (2015). Cytoplasmic accumulation of NCoR in malignant melanoma: Consequences of altered gene repression and prognostic significance. *Oncotarget*, 6(11), 9284.

Gelmann, E.P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001-301.

Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Gronemeyer, H., & Chambon, P. (2002). The Function of TIF2 / GRIP1 in Mouse Reproduction Is Distinct from Those of SRC-1 and p / CIP. *Society*, 22(16), 5923–5937.

Georgas, K. M., Armstrong, J., Keast, J. R., Larkins, C. E., McHugh, K. M., Southard-Smith, E. M., Cohn, M. J., Batourina, E., Dan, H., Schneider, K., Buehler, D. P., Wiese, C. B., Brennan, J., Davies, J. A., Harding, S. D., Baldock, R. A., Little, M. H., Vezina, C. H., & Mendelsohn, C. (2015). An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. *Development*, 142(10), 1893–1908.

Gibson, D. A., & Saunders, P. T. K. (2012). Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - A role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), 361–372.

Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development*, 14(2), 121–141.

Gnanapragasam, V. J., Leung, H. Y., Pulimood, A. S., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2001). Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 85(12), 1928–1936.

Goyal, H. O., Bartol, F. F., Wiley, A. A., Khalil, M. K., Chiu, J., & Vig, M. M. (1997). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anatomical Record*, 249(1), 54–62.

Goyal, H. O., Bartol, F. F., Wiley, A. A., Khalil, M. K., Williams, C. S., & Vig, M. M. (1998). Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: An immunohistochemical study. *Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 250(2), 164-171.

Goyal, H. O., Williams, C. S., & Vig, M. M. (2000). Postnatal differentiation of efferent ductule epithelium in goats: a light microscopic and ultrastructural study. *The Anatomical Record*, 259(1), 1-11.

Goymann, W., Landys, M. M., & Wingfield, J. C. (2007). Distinguishing seasonal androgen responses from male-male androgen responsiveness—revisiting the challenge hypothesis. *Hormones and Behavior*, 51(4), 463-476.

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 9, No. 4, pp. 411-416). Academic Press.

Grossmann, M. E., Huang, H., & Tindall, D. J. (2001). Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(22), 1687-1697.

Guttruff, R. F., Cooke, P. S., & Hess, R. A. (1992). Blind-ending tubules and branching patterns of the rat ductuli efferentes. *The Anatomical Record*, 232(3), 423-431.

Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869-36872.

Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A. A., & Cunha, G. R. (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biology of Reproduction*, 45(2), 308-21.

Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Cunha, A. R., Foster, B. A., Dahiya, R., Prins, G. S., & Cunha, G. R. (1996a). Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Cells Tissues Organs*, 155(2), 81-93.

Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Cunha, A. R., Foster, B. A., Dahiya, R., Prins, G. S., & Cunha, G. R. (1996b). Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Cells Tissues Organs*, 155(2), 94-103.

Hayward, S., Rosen, M. a, & Cunha, G. R. (1997). Stromal-epithelial interactions in the

normal and neoplastic prostate. *British Journal of Urology*, 79 (S2), 18–26.

Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). The prostate: development and physiology. *Radiologic Clinics of North America*, 38(1), 1–14.

He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D. M., DeMayo, F. J., Katzenellenbogen, B. S., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2008). A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(2), 344–60.

Hedger, M. P. (1997). Testicular leukocytes: what are they doing? *Reviews of Reproduction*, 2, 38–47.

Hejmej, A., Gorazd, M., Kosiniak-Kamysz, K., Wiszniewska, B., Sadowska, J., & Bilińska, B. (2005). Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(3), 534–547.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931.

Hermanson, O., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2002). Nuclear receptor coregulators: Multiple modes of modification. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(2), 55–60.

Hermo, L., Barin, K., & Robaire, B. (1992). Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *The Anatomical Record*, 233(2), 205–228.

Hess, R. A. (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of Reproduction*, 43(3), 525–542.

Hess, R. A., Gist, D. H., Bunick, D., Lubahn, D. B., Farrel, A., Bahr, J., Cooke, P. S., & Greene, G. L. (1997). Estrogen receptor (α and β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*, 18(6), 602–611.

Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., & Lubahn, D. B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(6659),

509–512.

Hess, R. A. (2000). Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 84–92.

Hess, R. A., Zhou, Q., & Nie, R. (2002). The role of estrogens in the endocrine and paracrine regulation of the efferent ductules, epididymis and vas deferens. In *The epididymis: from molecules to clinical practice* (pp. 317-337). Springer, Boston, MA.

Hess, R. A., & França, L. R. (2005). Structure of the Sertoli cell. *Sertoli Cell Biology*, 19, 40.

Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Springer, New York, NY, pp. 1-15.

Hess, R. A., Fernandes, S. A., Gomes, G. R., Oliveira, C. A., Lazari, M. F., & Porto, C. S. (2011). Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 600-613.

Hess, R. A. (2014). Disruption of estrogen receptor signaling and similar pathways in the efferent ductules and initial segment of the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979103.

Hess, R. A., & Vogl, A. W. (2015). Sertoli cell anatomy and cytoskeleton. In *Sertoli Cell Biology (Second Edition)* (pp. 1-55).

Hodgson, M. C., Astapova, I., Cheng, S., Lee, L. J., Verhoeven, M. C., Choi, E., Balk, S. P., & Hollenberg, A. N. (2005). The androgen receptor recruits nuclear receptor corepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6511–6519.

Holstein, A. F., Maekawa, M., Nagano, T., & Davidoff, M. S. (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Archives of Histology and Cytology*, 59(2), 109-125.

Hörlein, A. J., Näär, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., & Rosenfeld, M. G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377(6548), 397–

404.

Horvath, L. G., Henshall, S. M., Lee, C. S., Head, D. R., Quinn, D. I., Makela, S., Delprado, W., Golovsky, D., Brenner, C. P., O'Neill, G., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J. J., Gustafsson, J. A., & Sutherland, R. L. (2001). Frequent loss of estrogen receptor- β expression in prostate cancer. *Cancer Research*, 61(14), 5331-5335.

Hu, X., & Lazar, M. A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, 402(6757), 93-96.

Igarashi-Migitaka, J., Takeshita, A., Koibuchi, N., Yamada, S., Ohtani-Kaneko, R., & Hirata, K. (2005). Differential expression of p160 steroid receptor coactivators in rat testis and epididymis. *European Journal of Endocrinology*, 153(4), 595-604.

Ilio, K. Y., & Hess, R. A. (1994). Structure and function of the ductuli efferentes: A review. *Microscopy Research and Technique*, 29(6), 432-467.

Jenster, G. (1998). Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: An update. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 143(1-2), 1-7

Jepsen, K., & Rosenfeld, M. G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *Journal of Cell Science*, 115(4), 689-698.

Johnson, A. B., & O'Malley, B. W. (2012). Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), 430-439.

Jones, R. C., & Jurd, K. M. (1987). Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferentes testis of the rat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 40(1), 79-90.

Joseph, A., Shur, B. D., & Hess, R. A. (2011). Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of Reproduction*, 84(2), 207-217.

Joseph, A., Yao, H., & Hinton, B. T. (2009). Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Developmental Biology*, 325(1), 6-14.

Josso, N., Racine, C., Di Clemente, N., Rey, R., & Xavier, F. (1998). The role of anti-

Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 3–7.

Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203(2), 323–33.

Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y., & Endo, H. (2006). Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36401–36410.

Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K., & de Kretser, D. M. (2006). Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (7), 827–947.

Kierszenbaum, A. L. (1994). Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrine Reviews*, 15(1), 116–134.

Knoblauch, S. E., True, L., Tretiakova, M., & Hukkanen, R. R. (2017). Male reproductive system. In *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (pp. 335–363).

Kinbara, H., & Cunha, G. R. (1996). Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. *The Prostate*, 28(1), 58–64.

Kiplesund, K. M., Halgunset, J., Fjøsne, H. E., & Sunde, A. (1988). Light microscopic morphometric analysis of castration effects in the different lobes of the rat prostate. *The Prostate*, 13(3), 221–232.

Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., Kato, S. (2006). Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrine Journal*, 53(2), 157–172.

Koide, T., Downes, M., Chandraratna, R. A. S., Blumberg, B., & Umesono, K. (2001). Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes and Development*, 15(16), 2111–2121.

Koopman, P. (2001). Gonad development: Signals for sex. *Current Biology*, 11(12), 481–483.

Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Peltö-Huikkot, M., Nilsson, S., Gustafsson Ii, J.-A., & Jensen, E. V. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5925–5930.

Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263.

Kumar, V. L., & Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: Structure, functions and regulation. *International Urology and Nephrology*, 27(3), 231–243. h

Kuroda, T., Lee, M. M., Haqq, C. M., Powell, D. M., Manganaro, T. F., & Donahoe, P. K. (1990). Mullerian Inhibiting Substance Ontogeny and its Modulation by Follicle-Stimulating Hormone in the Rat Testes. *Endocrinology*, 127(127), 1825–1832.

Kurokawa, R., Söderström, M., Hörlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature*, 377(6548), 451–454.

Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V., & Seiser, C. (2004). Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24834–24843.

Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., & Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 311–317.

Labrie, F., Lin, S. X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., Pelletier, G., & Bélanger, A. (2000). Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(1), 1–16.

Laschak, M., Bechtel, M., Spindler, K. D., & Hessenauer, A. (2011). Inability of NCoR/SMRT to repress androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(4), 645–651.

Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548–573.

Lee, K. H., Park, J. H., Bunick, D., Lubahn, D. B., & Bahr, J. M. (2009). Morphological

comparison of the testis and efferent ductules between wild-type and estrogen receptor α knockout mice during postnatal development. *Journal of Anatomy*, 214(6), 916–925.

Leo, C., & Chen, J. D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*, 245(1), 1–11.

Leung, G. P. H., Cheng-Chew, S. B., & Wong, P. Y. D. (2001). Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(5), C1160-C1167.

Li, H., & Chen, J. D. (1998). The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5948-5954.

Li, H., Papadopoulos, V., Vidic, B., Dym, M., & Culty, M. (1997). Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: Identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology*, 138(3), 1289–1298.

Li, S., & Shang, Y. (2007). Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cellular Signalling*, 19(6), 1101-1112.

Linja, M. J., Porkka, K. P., Kang, Z., Savinainen, K. J., Jänne, O. A., Tammela, T. L., Vasella, R. L., Palvimo, J. J., & Visakorpi, T. (2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 1032-1040.

Lopez, S. M., Agoulnik, A. I., Zhang, M., Peterson, L. E., Suarez, E., Gandarillas, G. A., Frolovo, A., Li, R., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Ittman, M. M., Weigel, N. L., & Agoulnik, I. U. (2016). Nuclear receptor corepressor 1 expression and output declines with prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3937–3949.

Lowsley, O. (1912). The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. *American Journal Anatomy*, 13(3), 299-346.

Lu, D. Y., Li, Y., Bi, Z. W., Yu, H. M., & Li, X. J. (2008). Expression and immunohistochemical localization of aquaporin-1 in male reproductive organs of the mouse. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 37(1), 1-8.

Maekawa, M., Kamimura, K., & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59(1), 1-13.

- McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4), 465-474.
- Mäkelä, S., Strauss, L., Kuiper, G., Valve, E., Salmi, S., Santti, R., & Gustafsson, J. Å. (2000). Differential expression of estrogen receptors α and β in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 164(1-2), 109-116.
- Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., & Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253(2), 165-174.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., & Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology*, 7(12), 958-968.
- Martins-Santos, E., Pimenta, C. G., Campos, P. R. N., Oliveira, A. G., Mahecha, G. A. B., & Oliveira, C. A. (2018). Atrazine affects the morphophysiology, tissue homeostasis and aromatase expression in the efferent ductules of adult rats with mild alterations in the ventral prostate. *Chemosphere*, 193, 958-967.
- McClung, J. K., Jupe, E. R., Liu, X. T., & Dell'Orco, R. T. (1995). Prohibitin: Potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Experimental Gerontology*, 30(2), 99-124.
- McLaren, A. (1991). Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. *Bioessays*, 13(4), 151-156.
- McPherson, S. J., Ellem, S. J., Simpson, E. R., Patchev, V., Fritzemeier, K.vH., & Risbridger, G. P. (2007). Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, 148(2), 566-74. h
- McPherson, S. J., Hussain, S., Balanathan, P., Hedwards, S. L., Niranjana, B., Grant, M., Chandrasir, U. P., Toivanen, R., Wang, W., Taylor, R. A., & Risbridger, G. P. (2010). Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3123-8.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., & Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *International Journal of Developmental Biology*, 37(3), 407-415.

- Merkwirth, C., & Langer, T. (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(1), 27-32.
- Mishra, S., Murphy, L. C., & Murphy, L. J. (2006). The prohibitins: Emerging roles in diverse functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 353-363.
- Misiti, S., Schomburg, L., M. Yen, P., & Chin, W. W. (1998). Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*, 139(5), 2493-2500.
- Morais-Santos, M., Werneck-Gomes, H., Campolina-Silva, G. H., Santos, L. C., Mahecha, G. A. B., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (2018). Basal cells show increased expression of aromatase and estrogen receptor α in prostate epithelial lesions of male aging rats. *Endocrinology*, 159(2), 723-732.
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392(1), 49-53.
- Mowa, C. N., & Iwanaga, T. (2001). Expression of estrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the male reproductive system of the rat as revealed by in situ hybridization. *Journal of Molecular Endocrinology*, 26, 165-174.
- Munsterberg, A., & Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, 113(2), 613-624.
- Myers, E., Fleming, F. J., Crotty, T. B., Kelly, G., McDermott, E. W., O'Higgins, N. J., Hill, A. D. K., & Young, L. S. (2004). Inverse relationship between ER- β and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer. *British Journal of Cancer*, 91(9), 1687-1693.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*, 20(3), 321-344.
- Nevins, J. R. (1983). The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 441-466.
- Nie, R., Zhou, Q., Jassim, E., Saunders, P. T. K., & Hess, R. A. (2002). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biology of Reproduction*, 66(4), 1161-1168.

Nijtmans, L. G. J., Sanz, M. A., Grivell, L. A., Coates, P. J., Artal Sanz, M., Grivell, L. A., & Coates, P. J. (2002). Cellular and Molecular Life Sciences The mitochondrial PHB complex : roles in mitochondrial respiratory complex assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(1), 143–155.

Nilsson, S., Ma, S., Treuter, E., Tujague, M., & Thomsen, J. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–65.

O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E., & Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3), 289–318.

Oliveira, A. G., Coelho, P. H., & Guedes, F. D. (2007). 5-Androstane-3, 17-diol (3-diol), an estrogenic metabolite of 5-dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids*, 72, 914-922.

Oliveira, C. A., Carnes, K., França, L. R., & Hess, R. A. (2001). Infertility and Testicular Atrophy in the Antiestrogen-Treated Adult Male Rat. *Biology of Reproduction*, 65, 913–920.

Oliveira, C. a, Zhou, Q., Carnes, K., Nie, R., Kuehl, D. E., Jackson, G. L., França L. R., Nakai, M., & Hess, R. A. (2002). ER function in the adult male rat: short-and long-term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. *Endocrinology*, 143(6), 2399-2409.

Oliveira, C. A., Mahecha, G. A. B., Carnes, K., Prins, G. S., Saunders, P. T. K., França, L. R., & Hess, R. A. (2004). Differential hormonal regulation of estrogen receptors ER α and ER β and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction*, 128(1), 73–86.

Oliveira, C. A., Carnes, K., França, L. R., Hermo, L., & Hess, R. A. (2005). Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biology of the Cell*, 97(6), 385–395.

Oliveira, R. L., Oliveira, A. G., Mahecha, G. A. B., Nogueira, J. C., & Oliveira, C. A. (2009). Distribution of estrogen receptors (ER α and ER β) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. *General and Comparative Endocrinology*, 161(2), 283–292.

Oliveira, R. L., Nogueira, J. C., Mahecha, G. A. B., & Oliveira, C. A. (2012). Seasonal variation in estrogen receptor ER α , but not ER β , androgen receptor and aromatase, in

the efferent ductules and epididymis of the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *General and Comparative Endocrinology* 179(1), 1-13.

Oliveira, D. S., Dzinic, S., Bonfil, A. I., Saliganan, A. D., Sheng, S., & Bonfil, R. D. (2016). The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), 8.

Omoto, Y., Imamov, O., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2005). Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1484–9.

Oñate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., Oñate, S. A., Oñate, S. A., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, 270(5240), 0–1354.

Osman, C., Merkwirth, C., & Langer, T. (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *Journal of Cell Science*, 122(21), 3823–3830.

Park, S. E., Xu, J., Frolova, A., Liao, L., O'Malley, B. W., & Katzenellenbogen, B. S. (2005). Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1989-1999.

Parker, K. L., Schedl, A., & Schimmer, B. P. (1999). Gene interactions in gonadal development. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 417-433.

Pastor-Soler, N. M., Fisher, J. S., Sharpe, R., Hill, E., Van Hoek, A., Brown, D., & Breton, S. (2010). Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. *Reproduction*, 139(3), 613–621.

Pelletier, G. (2008). Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 22(2), 223–228.

Penning, T. M., Bauman, D. R., Jin, Y., & Rizner, T. L. (2007). Identification of the molecular switch that regulates access of 5 α -DHT to the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 266,77–82.

Perey, B., Clermont, Y., & Leblond, C. P. (1961). The wave of the seminiferous

epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy*, 108, 47–77.

Perissi, V., Staszewski, L. M., Mcinerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Miburn, M. V., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor – corepressor interaction. *Genes & Development*, 13(24), 3198–3208.

Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 109.

Pettersson, K., & Gustafsson, J. Å. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 165-192.

Picciarelli-Lima, P., Oliveira, A. G., Reis, A. M., Kalapothakis, E., Mahecha, G. A., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (2006). Effects of 3-beta-diol, an androgen metabolite with intrinsic estrogen-like effects, in modulating the aquaporin-9 expression in the rat efferent ductules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 51.

Planas-Silva, M. D., Shang, Y., Donaher, J. L., Brown, M., & Weinberg, R. A. (2001). AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Research*, 61(10), 3858-3862.

Pollard, M. (1973). Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree wistar rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(4), 1235–1241.

Powell, S. M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F., & Bevan, C. L. (2004). Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocrine-Related Cancer*, 11(1), 117–130.

Prezioso, D., Denis, L. J., Klocker, H., Sciarra, A., Reis, M., Naber, K., Lobel, B., Pacik, D., & Griffiths, K. (2007). Estrogens and aspects of prostate disease. *International Journal of Urology*, 14(1), 1–16.

Price, D. (1936). Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. *Developmental Dynamics*, 60(1), 79-127.

Prins, G. S., & Birch, L. (1995). The developmental pattern of androgen receptor

expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, 136(3), 1303-1314.

Prins, G. S., & Birch, L. (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, 138(5), 1801-1809.

Prins, G. S., Marmer, M., Woodham, C., Chang, W., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., & Birch, L. (1998). Estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*, 139(3), 874-883.

Prins, G. S., Birch, L., Couse, J. F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., & Korach, K. S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor α : studies with α ERKO and β ERKO mice. *Cancer Research*, 61(16), 6089-6097.

Prins, G. S., & Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3), 233-244.

Privalsky, M. L. (2004). The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual Review of Physiology*, 66, 315-360.

Ramesh, R., Pearl, C. A., At-Taras, E., Roser, J. F., & Berger, T. (2007). Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: Effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Animal Reproduction Science*, 102(3-4), 286-299.

Reid, B. L. (1958). The structure and function of the Epididymis. 1. The histology of the Rat Epididymis. *Australian Journal of Zoology*, 5, 223-246.

Resko, J. A., Feder, H. H., & Goy, R. W. (1968). Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *The Journal of Endocrinology*, 40(4), 485-491.

Risbridger, G. P., Davis, I. D., Birrell, S. N., & Tilley, W. D. (2010). Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 205.

Robyr, D., Wolffe, a P., & Wahli, W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Molecular endocrinology*, 14(3), 329-347.

Rodríguez, R., Pozuelo, J. M., Martín, R., Henriques-Gil, N., Haro, M., Arriazu, R., &

Santamaría, L. (2003). Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. *The Prostate*, 57, 176–185.

Roy, A. K., Tyagi, R. K., Song, C. S., Lavrovsky, Y., Ahn, S. C., Oh, T. S., & Chatterjee, B. (2001). Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 949(1), 44–57.

Russell, L. D. (1990). Mammalian spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1-40.

Russell, L. D., & Franca, L. R. (1995). Building a testis. *Tissue & cell* 1995; 27:129-147.

Safer, J. D., Cohen, R. N., Hollenberg, A. N., & Wondisford, F. E. (1998). Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30175–30182.

Saitoh, K., Terada, T., & Hatakeyama, S. (1990). A morphological study of the efferent ducts of the human epididymis. *International Journal of Andrology*, 13(5), 369-376.

Salian, S., Doshi, T., & Vanage, G. (2009). Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sciences*, 85(1–2), 11–18.

Salesi, N., Carlini, P., Ruggeri, E. M., Ferretti, G., Bria, E., & Cognetti, F. (2005). Prostate cancer: the role of hormonal therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 24(2), 175-180.

Sar, M., & Welsch, F. (2000). Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia*, 32(4–5), 295–301.

Saunders, P. T. K., Fisher, J. S., Sharpe, R. M., & Millar, M. R. (1998). Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *Journal of Endocrinology*, 156(3), 13–17.

Saunders, P. T., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D. S., & Millar, M. R. (2001). Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta

proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction*, 7(3), 227–236.

Seol, W., Mahon, M. J., Lee, Y. K., & Moore, D. D. (1996). Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Molecular Endocrinology*, 10(12), 1646-1655.

Setchell, B., & Breed, W. (2006). *Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract*. Elsevier.

Shang, Y., Myers, M., & Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell*, 9(3), 601-610.

Shapiro, E., Huang, H., Masch, R. J., McFadden, D. E., Wu, X. R., & Osterer, H. (2005). Immunolocalization of Androgen Receptor and Estrogen Receptors A and B in Human Fetal Testis and Epididymis. *The Journal of Urology*, 174(4), 1695–1698.

Sharpe, R. M. (1983). Local control of testicular function. *Experimental Physiology*, 68(3), 265-287.

Sharpe, R. M., Fisher, J. S., Millar, M. M., Jobling, S., & Sumpter, J. P. (1995). Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental Health Perspectives*, 103(12), 1136.

Sharpe, R. M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1546), 1697-1712.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927–937.

Shum, W. W. C., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J. S., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial Projections from Basal Cells Are Luminal Sensors in Pseudostratified Epithelia. *Cell*, 135(6), 1108–1117.

Skafar, D. F., & Zhao, C. (2008). The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine*, 33(1), 1–8.

- Skinner, M. K., & Anway, M. D. (2005). Seminiferous cord formation and germ-cell programming: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 18–32.
- Smith, C. L., Nawaz, Z., & O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and Corepressor Regulation of the Agonist/Antagonist Activity of the Mixed Antiestrogen, 4-Hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, 11(6), 657–666.
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30, 2–13.
- Snedden, W. A., & Fromm, H. (1997). Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells. *Plant Molecular Biology*, 33, 753–756.
- Snyder, E. M., Small, C. L., Bomgardner, D., Xu, B., Evanoff, R., Griswold, M. D., & Hinton, B. T. (2010). Gene expression in the efferent ducts, epididymis, and vas deferens during embryonic development of the mouse. *Developmental Dynamics*, 239(9), 2479–2491.
- Spears, M., Oesterreich, S., Migliaccio, I., Guitierrez, C., Hilsenbeck, S., Quintayo, M. A., Pedraza, J., Munro, A. F., Thomas, J. S. J., Kerr, G. R., Jack, W. J. L., Kunkler, I. H., Cameron, D. A., Chetty, U., & Bartlett, J. M. S. (2012). The p160 ER co-regulators predict outcome in ER negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(2), 463–472.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., Mackenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389(6647), 194–198.
- Staack, A., Donjacour, A. A., Brody, J., Cunha, G. R., & Carroll, P. (2003). Mouse urogenital development: A practical approach. *Differentiation*, 71(7), 402–413.
- Stenoien, D. L., Mancini, M. G., Patel, K., Allegretto, E. A, Smith, C. L., & Mancini, M. A. (2000). Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Molecular Endocrinology*, 14(4), 518–34.
- Stoffel, M. H., & Friess, A. E. (1994). Morphological characteristics of boar efferent ductules and epididymal duct. *Microscopy Research and Technique*, 29(6), 411–431.

Sun, L., Liu, L., Yang, X. J., & Wu, Z. (2004). Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *Journal of cell science*, 117(14), 3021-3029.

Takeda, H., Lasnitzki, I., & Mizuno, T. (1986). Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *Journal of Endocrinology*, 110(3), 467-470.

Takeda, H., Nakamoto, T., Kokontis, J., Chodak, G. W., & Chang, C. (1991). Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(1), 488-496.

Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S., & Chin, W. W. (1997). TRAM-1, a novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27629-27634.

Talo, A. (1981). In-vitro spontaneous electrical activity of rat efferent ductules. *Journal of Reproduction and Fertility*, 63(1), 17-20.

Taylor, R. A., Cowin, P., Couse, J. F., Korach, K. S., & Risbridger, G. P. (2006). 17 β -Estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER α or ER β . *Endocrinology*, 147(1), 191-200.

Thomson, A. A. (2008). Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. *Differentiation*, 76(6), 587-598.

Thuaud, F., Ribeiro, N., Nebigil, C. G., & Désaubry, L. (2013). Prohibitin ligands in cell death and survival: Mode of action and therapeutic potential. *Chemistry & biology*, 20(3), 316-331.

Tien, J. C. Y., Zhou, S., & Xu, J. (2009). The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *International Journal of Biological Sciences*, 5(3), 256.

Timms, B. G., Mohs, T. J., & Didio, L. J. A. (1994). Ductal Budding and Branching Patterns in the Developing Prostate. *The Journal of Urology*, 151(5), 1427-1432.

Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., &

- Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387(6634), 677.
- Timms, B. G., Lee, C. W., Aumüller, G., & Seitz, J. (1995). Instructive induction of prostate growth and differentiation by a defined urogenital sinus mesenchyme. *Microscopy Research and Technique*, 30(4), 319–332.
- Y., Westin, S., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387(6634), 677–684.
- Torrey, T. W. (1945). The development of the urinogenital system of the albino rat. II. The gonads. *Developmental Dynamics*, 76(3), 375-397.
- Trtková, K., Pašková, L., Matiješuková, N., & Kolář, Z. (2010). Formation of AR-SMRT binding in prostate cancer cells treated with natural histone deacetylase inhibitor. *Cancer Biomarkers*, 7(2), 79-90.
- van Pelt, A. M., de Rooij, D. G., van der Burg, B., van der Saag, P. T., Gustafsson, J. A., & Kuiper, G. G. (1999). Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology*, 140(1), 478–483.
- Varlakhanova, N., Snyder, C., Jose, S., Hahm, J. B., & Privalsky, M. L. (2010). Estrogen Receptors Recruit SMRT and N-CoR Corepressors through Newly Recognized Contacts between the Corepressor N Terminus and the Receptor DNA Binding Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6), 1434–1445.
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3225–3232.
- Vija, L., Meduri, G., Comperat, E., Vasiliu, V., Izard, V., Ferlicot, S., Boukari, K., Camparo, P., Viengchareun, S., Constancis, E., Dumitrache, C., Lombés, M., & Young, J. (2013). Expression and characterization of androgen receptor coregulators, SRC-2 and HBO1, during human testis ontogenesis and in androgen signaling deficient patients. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 375(1–2), 140–148.
- Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO Journal*, 17(2), 507–519.

- Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Zechel, C., & Chambon, P. (1996). TIF2, a 160kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function, 15(14), 3667–3675.
- Walter, P., Green, S., Greenet, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jentsch, E., Scrace, G., Waterfield, M., & Chambon, P. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Biochemistry*, 82(23), 7889–7893.
- Wang, S., Jones, R. C., & Clulow, J. (1994). Surface area of apical and basolateral plasmalemma of epithelial cells of the ductuli efferentes testis of the rat. *Cell and Tissue Research*, 276(3), 581–586.
- Wang, Z., Rose, D. W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13549–13554.
- Watson, P. J., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. (2012). Nuclear hormone receptor corepressors: Structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), 440–449.
- Webb, P., Anderson, C. M., Valentine, C., Nguyen, P., Marimuthu, a, West, B. L., Baxter, J. D., & Kushner, P. J. (2000). The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Molecular endocrinology*, 14(12), 1976–1985.
- Webb, P., Nguyen, P., & Kushner, P. J. (2003). Differential SERM effects on corepressor binding dictate ER α activity in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6912–6920.
- Webb, P., Valentine, C., Nguyen, P., Price, R. H., Marimuthu, A., West, B. L., Baxter, J. D., & Kushner, P. J. (2003). ER β binds N-CoR in the presence of estrogens via an LXXLL-like motif in the N-CoR C-terminus. *Nuclear Receptor*, 1(1), 1–15.
- Weihua, Z., Makela, S., Andersson, L. C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J. I., Jensen, E. V., Nilsson, S., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2001). A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6330–5.
- Weihua, Z., Lathe, R., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2002). An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, and CYP7B1, regulates prostate

- growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13589-13594.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of testicular function. In *Andrology* (pp. 11-59). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Weiss, R. E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B. W., Refetoff, S. (1999). Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *The EMBO Journal*, 18(7), 1900–1904.
- Wen, Q., Cheng, C. Y., & Liu, Y.-X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 89–98.
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological reviews*, 87(1), 1–28.
- Wilhelm, D., Yang, J. X., & Thomas, P. (2013). Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Current Topics in Developmental Biology Academic Press*, Vol. 106, pp. 89-121.
- Wolffe, A. P., & Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell*, 84(6), 817–819.
- Wu, Y., Kawate, H., Ohnaka, K., Nawata, H., & Takayanagi, R. (2006). Nuclear Compartmentalization of N-CoR and Its Interactions with Steroid Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6633–6655.
- Xu, J., & Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology*, 17(March), 1681–1692.
- Xu, J., & O'Malley, B. W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3(3), 185-192.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, 279(5358), 1922–1925.
- Yamashita, S. (2004). Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in*

Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 279(2), 768-778.

Yan, J., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (2006). SRC-3/AIB1: Transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4), 387–394.

Ye, X., Han, S. J., Tsai, S. Y., DeMayo, F. J., Xu, J., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (2005). Roles of steroid receptor coactivator (SRC)-1 and transcriptional intermediary factor (TIF) 2 in androgen receptor activity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9487-9492.

Yeung, C. H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., & Cooper, T. G. (1994). Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biology of reproduction*, 50(4), 917–926.

Yoon, H. G., & Wong, J. (2006). The Corepressors Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptor and Nuclear Receptor Corepressor Are Involved in Agonist- and Antagonist-Regulated Transcription by Androgen Receptor. *Molecular Endocrinology*, 20(5), 1048–1060.

Yoo, J. Y., Lim, B. J., Choi, H. K., Hong, S. W., Jang, H. S., Kim, C., Chun, K. H., Choi, K. C., & Yoon, H. G. (2013). CK2-NCoR signaling cascade promotes prostate tumorigenesis. *Oncotarget*, 4(7), 972.

Yun, H., Xie, J., Olumi, A. F., Ghosh, R., & Addanki, P. (2015). Activation of AKR1C1 / ER β induces apoptosis by downregulation of c-FLIP in prostate cancer cells : A prospective therapeutic opportunity. *Oncotarget*, 6(13).

Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., & Lazar, M. A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Biochemistry*, 94(26), 14400–14405.

Zhang, X., Jeyakumar, M., Petukhov, S., & Bagchi, M. K. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology*, 12(4), 513-524.

Zhou, Q., Clarke, L., Nie, R., Carnes, K., Lai, L. W., Lien, Y. H., Verkman, A., Lubahn, D., Fisher, J., Katzenellenbogen, B. S., & Hess, R. A. (2001). Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 14132–14137.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G. S., Saunders, P. T. K., Katzenellenbogen, B. S., & Hess, R. a. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*, 23(6), 870–881.

Zhou, H.-J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.-H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (2005). SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer research*, 65(17), 7976–83.