



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Modulação de proteínas regulatórias e juncionais da barreira
hematotesticular em células de Sertoli humanas (HSec) expostas ao
Monobutil ftalato (MBP) e ao Bisfenol A (BPA)

ANDRÉ TEVES AQUINO GONÇALVES DE FREITAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular e Estrutural.

Orientador: *Wellerson Rodrigo Scarano*

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Modulação de proteínas regulatórias e juncionais da barreira
hematotesticular em células de Sertoli humanas (HSec) expostas ao
Monobutil ftalato (MBP) e ao Bisfenol A (BPA)

ANDRÉ TEVES AQUINO GONÇALVES DE FREITAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular e Estrutural.

Orientador: *Wellerson Rodrigo Scarano*

**BOTUCATU – SP
2015**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Freitas, André Teves Aquino Gonçalves de.

Modulação de proteínas regulatórias e juncionais da barreira hematotesticular em células de Sertoli humanas (HSec) expostas ao Monobutil ftalato (MBP) e ao Bisfenol A (BPA) / André Teves Aquino Gonçalves de Freitas. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano
Capes: 20601000

1. Desreguladores endócrinos. 2. Sertoli, Celulas de.
3. Espermatogenese. 4. Barreira Hematotesticular.

Palavras-chave: Bisfenol A; Desreguladores endócrinos; HSec; Monobutil Ftalato; Sertoli.

DEDICATÓRIA

Pelo carinho de sempre, por todo o investimento, por cada lição e especialmente pelo amor que se provou mais uma vez soberano durante o último ano, dedico esse trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biociências e a Unesp por toda a estrutura para que esse trabalho pudesse ser realizado. À CAPES pelo suporte financeiro e a todos os professores que fizeram parte desses dois anos de muito aprendizado, em especial ao meu orientador e amigo Wellerson Rodrigo Scarano, pela paciência e confiança de cada dia e aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disposição e colaboração fundamentais para o trabalho.

Tenho a sorte de poder chamar colegas de amigos, amigos de irmãos e contar com uma base familiar pra qualquer momento. Tenho a sorte de viver rodeado de amor, de carinho, de incentivo e confiança. Sendo assim, agradeço a todos que fizeram parte da minha vida, em especial destes anos de mestrado, que me ajudaram a acreditar que é possível sonhar, crescer, mudar e sorrir sempre. Agradeço por me ensinarem que o trabalho pode ser prazeroso, que um abraço pode curar, que um sorriso pode mudar um dia, que sempre existe um porto seguro, ou vários. Agradeço por me ensinarem tanto e se me torno mestre é por ter observado os maiores mestres em carinho, ensino, amor e amizade. Obrigado!

“Sempre chega a hora em que descobrimos
que sabíamos muito mais do que antes
julgávamos.”
José Saramago

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
INTRODUÇÃO	7
<i>A infertilidade masculina</i>	7
<i>O testículo e a célula de Sertoli</i>	8
<i>A barreira hematotesticular</i>	13
<i>Desreguladores endócrinos</i>	24
<i>Ftalatos</i>	26
<i>Bisfenol A</i>	28
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	31
RESULTADOS	32
<i>Artigo científico</i>	33
CONCLUSÃO GERAL	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

As células de Sertoli, encontradas no epitélio seminífero, formam a barreira hematotesticular através de suas junções comunicantes e de oclusão, responsável por proporcionar um ambiente protegido e coordenar o processo espermatogênico, fundamental para a manutenção da fertilidade masculina. A dinâmica de formação da barreira hematotesticular está diretamente relacionada com o equilíbrio entre síntese e degradação de moléculas especializadas, e sofre influência através de regulação androgênica e de fatores de crescimento específicos como o TGF- β 2, sendo particularmente sensível aos fatores ambientais. A exposição à desreguladores endócrinos (DEs), capazes de interferir na modulação da barreira, pode levar a infertilidade. Atualmente o fator masculino pode ser responsável por 30-50% dos casos de infertilidade, sendo de grande importância o estabelecimento da relação entre a exposição aos DEs e o processo de formação dos gametas. Este estudo objetivou correlacionar a ação de dois desreguladores endócrinos, o Monobutil ftalato (MBP) e o Bisfenol A (BPA), em diferentes períodos de exposição, a partir de uma dose de baixa toxicidade, sobre a linhagem HSec de células de Sertoli humanas (*in vitro*) e sua possível ação sobre proteínas da barreira hematotesticular e proteínas regulatórias envolvidas na modulação da degradação e síntese dessa barreira. Para tal, as células da linhagem HSec foram cultivadas em meio específico para a expansão e submetidas à exposição ao MBP e ao BPA em baixas doses por 6 e 48 horas. Em seguida, as células foram isoladas e submetidas à extração de proteínas. Foram analisadas as proteínas: Ocludina, N-caderina, β -catenina e Receptor de Andrógeno (AR) por Western Blot. Os resultados foram comparados para os dois agentes nos diferentes períodos de exposição em relação às células não expostas, mostrando que os dois agentes foram capazes de reduzir a expressão de proteínas importantes da barreira hematotesticular, apresentando potencial para desregular a estrutura e manutenção da barreira e consequentemente a produção espermática e fertilidade masculina.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, monobutil ftalato, bisfenol A, função reprodutiva masculina, barreira hematotesticular, espermatogênese, células de Sertoli, HSec.

ABSTRACT

Sertoli cells, found in the seminiferous epithelium, form the blood-testis barrier via their gap and tight junctions, responsible for providing a protected environment and coordinate the spermatogenic process, essential for male fertility maintenance. The dynamics of the blood-testis barrier formation is directly related to the balance between synthesis and degradation of specialized molecules, and is influenced by androgen regulation and specific growth factors such as TGF- β 2, being particularly sensitive to environmental factors. Exposure to endocrine disruptors (EDs), which interfere in the barrier modulation, can lead to infertility. Currently the male factor may be responsible for 30-50% of infertility cases, being the establishment of the relationship between exposure to EDs and the process of gametes formation of great importance. This study aimed to correlate the action of two EDs, monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) in different periods of exposure, from a dose of low toxicity on the HSec lineage of human Sertoli cells (*in vitro*) and its possible action on proteins of blood-testis barrier and regulatory proteins involved in modulation of degradation and synthesis of this barrier. To this end, cells were cultured in HSec lineage specific medium and exposed to MBP and BPA in low doses for 6 and 48 hours. Then, cells were isolated and subjected to protein extraction. Proteins analyzed were: occludin, N-cadherin, β -catenin and Androgen Receptor (AR) by Western blot. The results were compared for the two agents in different exposure times to non-treated cells, showing that both agents were able to reduce the expression of important BTB proteins, presenting potential for disrupting the structure and maintenance of the barrier and, consequently, sperm production and male fertility.

Keywords: endocrine disruptors, monobutyl phthalate, bisphenol A, male reproductive function, blood-testis barrier, spermatogenesis, Sertoli cells, HSec.

INTRODUÇÃO

A infertilidade masculina

Um casal é considerado infértil quando não obteve gravidez após 12 ciclos de relacionamento sexual, sem o uso de qualquer método de contracepção. A literatura descreve diferentes etiologias para a infertilidade. Algumas causas são mais comuns em certos países que outros, tais como doenças inflamatórias pélvicas e infecções sexualmente transmissíveis (Kamel, 2010).

A infertilidade atinge 10-15% dos casais em idade reprodutiva e o fator masculino pode ser responsável por 30-50% dos casos (Boivin et al., 2007). Fatores de estilo de vida como obesidade, alimentação inadequada, tabagismo, estresse, álcool e exposição a poluentes e substâncias químicas ambientais como os desreguladores endócrinos (DEs) afetam a saúde e o sucesso reprodutivo (Homan et al., 2007).

A detecção consistente de resíduos de desreguladores endócrinos no soro humano, plasma seminal e fluido folicular aumentou a preocupação de que a exposição ambiental aos DEs está afetando a fertilidade humana (Younglai et al., 2002). Entre as alterações observadas, Kumar (2004) associou a exposição a solventes e pesticidas a valores espermáticos abaixo do normal, enquanto Wong e colaboradores (2003) relataram maior risco de desenvolvimento de oligozoospermia em homens expostos a pesticidas e outros químicos como os ftalatos.

Embora não sejam considerados grandes teratógenos, a função reprodutiva - desde a produção de gametas até o desenvolvimento intra-uterino da prole - é particularmente suscetível aos DEs, desencadeando alterações morfológicas e funcionais (Sikka & Wang, 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2010), sendo fundamental o estudo de seus efeitos sobre os componentes do trato reprodutor masculino.

O testículo e a célula de Sertoli

Os testículos, as gônadas masculinas, são compostos por um emaranhado de túbulos seminíferos e protegidos por uma túnica fibrosa denominada túnica albugínea. Essa túnica prolonga-se para o interior do testículo formando septos que dividem a gônada em lóbulos. Em cada lóbulo encontram-se dois ou três tubos seminíferos, que convergem para a zona posterior do testículo formando a rede testicular. Dessa saem cerca de quinze canais, os ductos eferentes, que confluem para o epidídimo (Figura 1) (McAninch, 2010).

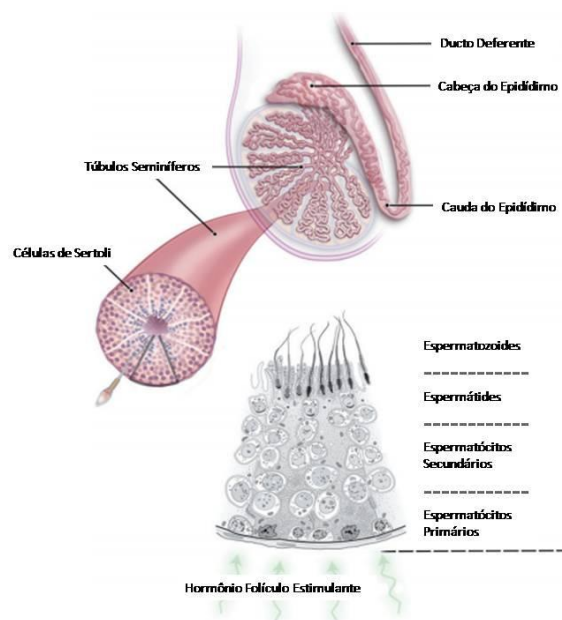


Figura 1. Imagem representativa de um corte sagital de testículo, evidenciando um túbulo seminífero e o epitélio germinativo sustentado pelas células de Sertoli (adaptada de Samplaski et al., 2010).

O túbulo seminífero não é penetrado por vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos. Estes se encontram no interstício entre os túbulos, onde são encontradas as células de Leydig, responsáveis pela produção dos hormônios sexuais masculinos, sobretudo testosterona, que coordena o desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos e dos caracteres sexuais secundários (Waites & Setchell, 1975; Cheng & Mruk, 2010^a; McAninch, 2010).

É nos túbulos seminíferos que ocorre a espermatogênese, que se divide em quatro fases importantes: Multiplicação, Crescimento, Maturação e Diferenciação ou Espermio gênese, com início na puberdade e duração por toda a vida do homem (Skinner, 2005). A fertilidade masculina e o processo de espermatogênese estão diretamente relacionados à capacidade de produção de fatores determinantes para o desenvolvimento das células germinativas por células específicas, as células de Sertoli (Griswold, 1998).

Encontradas no epitélio dos túbulos seminíferos, as células de Sertoli apresentam grande dimensão, envolvendo todo o epitélio germinativo (Figura 2), que origina os espermatozoides (McAninch, 2010).

As células de Sertoli são células somáticas piramidais que possuem uma grande área de superfície, ocupando aproximadamente 17-19% do volume do epitélio seminífero em ratos. Dessa forma, essas células possibilitam o desenvolvimento de um grande número de células germinativas na porcentagem estimada em 1:50 no testículo de ratos adultos (Weber et al., 1983). O número dessas células no epitélio germinativo pode determinar o tamanho testicular, o número de células germinativas por testículo e a produção de espermatozoides propriamente dita. Além disso, as células de Sertoli são responsáveis por proporcionar um ambiente protegido e altamente especializado, no interior dos túbulos seminíferos, para o desenvolvimento das células germinativas (Skinner, 2005).

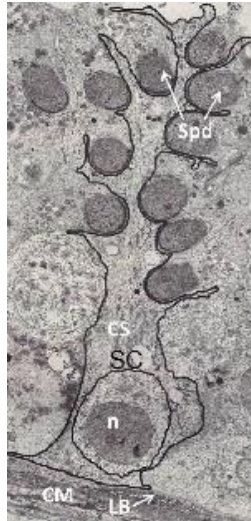


Figura 2. A célula de Sertoli (SC) estende-se desde a lâmina basal (LB) até a luz do epitélio germinativo, onde se observam na porção apical várias espermatídes em diferenciação (Spd); núcleo da SC em destaque (n); células mióides (CM) sustentando o túbulo seminífero (Aumento: 3300X; modificado de Skinner, 2005).

Na espécie humana, as células de Sertoli têm algumas peculiaridades, sendo uma delas a presença dos corpos nucleares, que são organelas esféricas compostas por uma cápsula microfibrilar e com grânulos em sua região central. Além disso, as células humanas, diferentemente de outras espécies, apresentam alinhamento nuclear em uma posição intermediária no interior da célula. Inclusões e organelas típicas são encontradas na base celular (Skinner, 2005) (Figura 3).

Durante a fase embrionária, as células da região cortical e ventromedial do mesonefro migram para a região genital e formam a gônada indiferenciada. A presença do cromossomo Y leva a produção do Fator Determinante do Testículo (FDT) pelo gene SRY. O FDT induz a condensação dos cordões gonadais, fazendo com que se estendam para dentro da medula da gônada indiferenciada, onde se anastomosam e formam a rede testicular. Durante o mesmo período de formação, as células do epitélio celomático da crista gonadal se diferenciam em células de Sertoli (Moore & Persaud, 2013). Logo após sua diferenciação, as células de Sertoli

se agregam e organizam as células germinativas primordiais dentro dos cordões gonadais, onde elas sofrem mudanças morfológicas e se diferenciam em espermatogônias (Li & Kim, 2003).

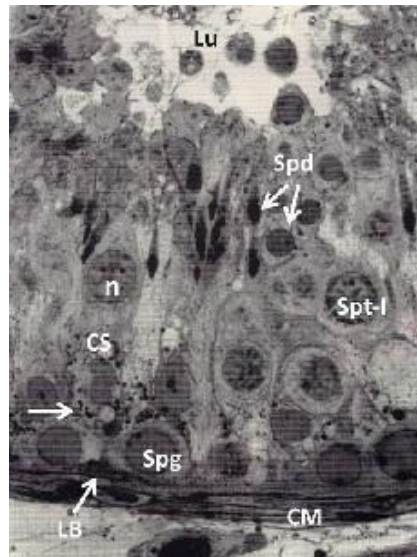


Figura 3. Posição intermediária do núcleo (n) das células de Sertoli Humanas (SC) e a presença de inclusões no citoplasma basal (seta branca); lâmina basal (LB) dando o suporte ao epitélio seminífero; na parte basal do epitélio observam-se as espermatogônias (Spg), e em direção ao lúmen (Lu): os espermatócitos I (Spt-I) e as espermatídes (Spd); células mióides (CM) sustentando o túbulo seminífero (Aumento: 1380X; modificado de Skinner, 2005).

As células de Sertoli são responsáveis pelo fornecimento de substâncias necessárias para o metabolismo das células germinativas (lactato, transferrina, proteínas andrógeno-dependentes); fatores de crescimento (fator de célula-tronco, fator transformador de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β *Transforming Growth Factor*), fator de crescimento homólogo a insulina (IGF-I – *Insulin-like Growth Factor*), fator de crescimento fibroblástico (FGF; *Fibroblast Growth Factor*), fator de crescimento epidermal (EGF; *Epidermal Growth Factor*) e hormônios que regulam o desenvolvimento das estruturas reprodutivas masculinas, substância inibidora-mulleriana (MIS) e inibina (Skinner, 2005).

Estruturalmente, as células de Sertoli são conectadas por junções comunicantes, denominadas *junções gap*, que possibilitam a troca iônica e química entre as células, o que é importante para a coordenação do ciclo do epitélio seminífero; e unidas por junções de oclusão, também conhecidas por *tight junctions*, situadas nas suas paredes basolaterais, formando a denominada barreira hematotesticular (Figura 4). No início da meiose, as células germinativas ultrapassam a barreira para o interior do epitélio seminífero e a partir desse momento, se tornam dependentes das células de Sertoli para o fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento para o seu desenvolvimento (Mruk et al., 2004).

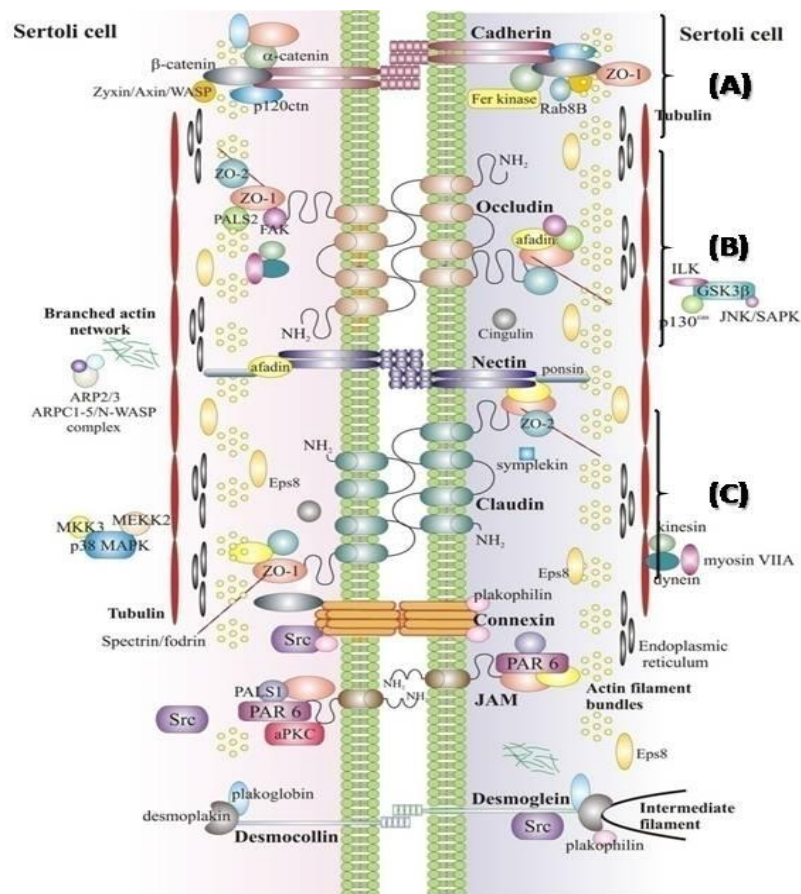


Figura 4. Representação das junções proteicas que formam a barreira hematotesticular. Em (A) observamos a ligação entre caderinas e cateninas, formando as *junções gap*. Em (B) e (C) observamos occludinas e claudinas, respectivamente, conectadas a proteína ZO-1, formando as *tight junctions* (adaptado de Cheng & Mruk, 2012).

A barreira hematotesticular

A barreira hematotesticular é um conceito originalmente baseado em observações no início do século 20, quando corantes administrados em animais de laboratório falhavam em corar os testículos e o cérebro. Esses achados levaram aos conceitos de barreira hematotesticular e barreira hematoencefálica (Cheng & Mruk, 2011). O termo barreira hematotesticular, também conhecido como *Sertoli cell seminiferous epithelium barrier*, contudo, foi primeiramente utilizado por Chiquoine (1964) em um estudo que avaliou os efeitos da toxicidade do cádmio relacionados à necrose testicular.

A barreira hematotesticular nos mamíferos, diferente de outras barreiras hematotestiduais, é constituída predominantemente por junções especializadas entre células de Sertoli adjacentes próximas a membrana basal no epitélio seminífero, dividindo o epitélio em compartimento basal e luminal, também conhecidos por especialização basal e luminal ou apical (Cheng & Mruk, 2010).

Uma das funções da barreira hematotesticular é a restrição do fluxo paracelular de biomoléculas (água, eletrólitos, íons, nutrientes, hormônios, fatores parácrinos e moléculas biológicas) através do epitélio das células de Sertoli no compartimento luminal, regulando assim a entrada de substâncias nutritivas, moléculas vitais e tóxicos nocivos para o compartimento apical em que o desenvolvimento pós-meiótico das células germinativas ocorre (Cheng & Mruk, 2012).

Adicionalmente, a barreira hematotesticular cria uma barreira imunológica, conferindo o estado de imunoprivilégio dos testículos, que permite que a resposta imunológica a autoantígenos que residem dentro das células germinativas em desenvolvimento durante a espermatogênese, muitos dos quais são expressos transitoriamente, seja suprimida (Meinhardt & Hedger, 2010; Fijak et al., 2011). Este processo é necessário para evitar a produção de

anticorpos antiespermatozoides e doença autoimune, o que leva à infertilidade masculina (Francavilla et al., 2007).

Embora o epitélio seminífero tenha seus próprios mecanismos de defesa imunossupressora, antibacteriana e antiviral, as células de Sertoli, por si só, podem desempenhar um papel crítico na manutenção dos testículos como um órgão imunologicamente privilegiado, secretando moléculas imunossupressoras para bloquear a resposta imune para autoantígenos expressos transitoriamente em células germinativas em desenvolvimento durante a espermatogênese (Selawry & Cameron, 1993; Mital et al., 2011). No entanto, as identidades das biomoléculas imunossupressoras permanecem desconhecidas, sendo supostamente compostas por um conjunto de moléculas, incluindo citocinas (interleucinas e intéferons) e prostaglandinas (Mruk & Cheng, 2004b; Yang, 2010; Meinhardt & Hedger, 2010).

Outra função importante da barreira hematotesticular é a de conferir polaridade celular no epitélio seminífero, evidenciada pela localização dos núcleos das células de Sertoli que são restritos ao compartimento basal, encontrando-se adjacentes à túnica própria e as organelas citoplasmáticas (como aparelho de Golgi e lisossomos) que nas células de Sertoli não são uniformemente distribuídas no citoplasma (Mruk & Cheng, 2011).

Mruk & Cheng (2011) afirmam também que especialização apical confere polaridade as espermátides durante a espermiogênese usando módulos de polaridade semelhantes, de forma que o desenvolvimento das espermátides pode ser devidamente orientado para ocupar o mínimo de espaço no epitélio com a cabeça do espermatozoide apontando para a membrana basal e as caudas para o lúmen do túbulo seminífero.

Alguns dos fatores ultraestruturais mais distintos e proeminentes da barreira hematotesticular são os pacotes de filamentos de actina que se distribuem na membrana plasmática. Eles ficam entre as cisternas no retículo endoplasmático e a especialização basal,

sendo encontrados nos dois lados das células de Sertoli (Lie et al., 2010c). As *tight junctions*, por outro lado, aparecem como uma ligação entre membranas plasmáticas de células de Sertoli justapostas, encontradas entre as especializações basais das células de Sertoli, perto da membrana basal (Flickinger & Fawcett, 1967; Russell, 1977c).

Segundo Mok e colaboradores (2012), a especialização basal é caracterizada pela presença de feixes de filamentos de actina (actina-F) altamente organizados e impressados entre as cisternas do retículo endoplasmático e as membranas plasmáticas de células de Sertoli justapostas. Estes feixes de filamentos de actina também conferem resistência adesiva para a barreira hematotesticular (Figura 5), estando presente apenas no lado da célula de Sertoli na especialização apical e de ambos os lados na basal (encontrada na interface de células de Sertoli-Sertoli na barreira hematotesticular).

A actina é um componente do citoesqueleto em células eucarióticas encontrada em células de Sertoli e células germinativas do epitélio seminífero e existe tanto como actina globular (actina-G) quanto como actina filamentosa (actina-F). Para facilitar o movimento das espermatídes através do epitélio, é criada uma rede ramificada de actina, que elimina a “rigidez” associada aos feixes, desestabilizando as especializações. Além disso, a actina-F pode ser despolimerizada por proteínas encontradas nas especializações e assim convertida em actina-G para facilitar a movimentação das espermatídes (Cheng & Mruk, 2011).

Ainda na região basal encontramos as junções *gap*, que são junções de comunicação célula-célula baseadas em actina (Figura 5), encontradas principalmente na região basal da barreira, mas presentes também na região apical entre as células de Sertoli e as espermatídes. O papel das junções comunicantes como uma plataforma de sinalização para conferir *cross-talk* entre os diferentes tipos de junção para coordenar a migração de espermatócitos em pré-

leptóteno no estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero apenas tornou-se recentemente conhecido (Li et al., 2011a).

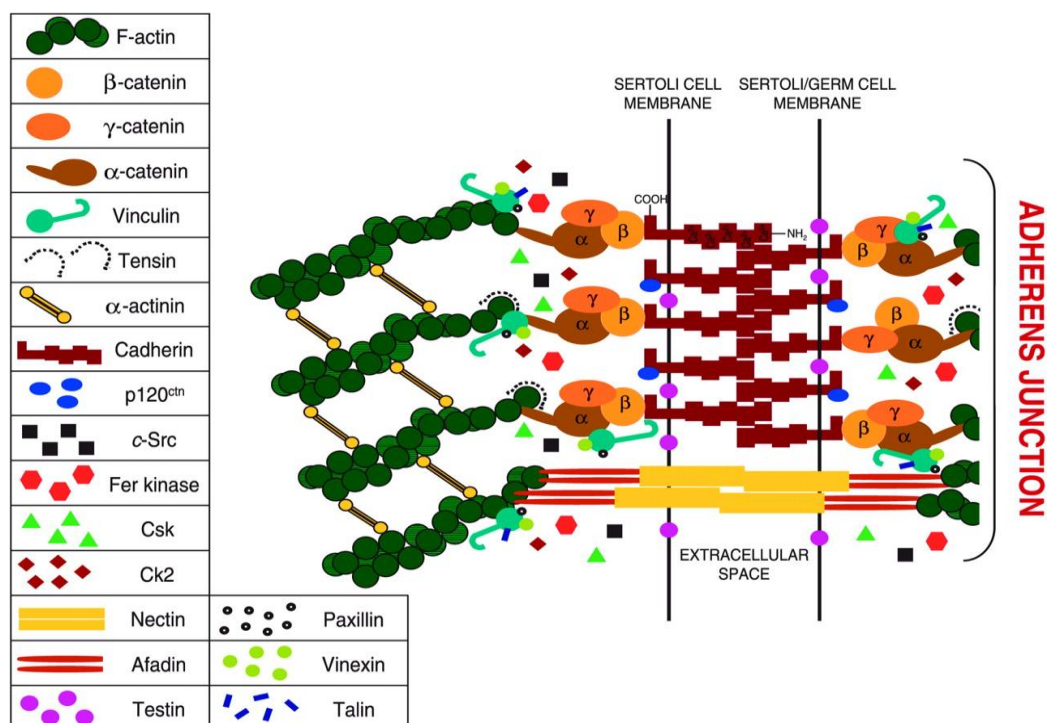


Figura 5. Representação esquemática dos componentes proteicos das junções de aderência da barreira hematotesticular (Cheng & Mruk, 2002).

As *tight junctions* são os únicos tipos de junção de oclusão no epitélio e endotélio de mamíferos. Elas estão localizadas na região mais apical do epitélio e endotélio, selando os espaços intercelulares e contribuem para a barreira de permeabilidade através de um epitélio ou endotélio. Por trás das *tight junctions* estão as junções de aderência célula-célula, compostas de actina, e os desmossomos (filamentos de ancoragem célula-célula). No seu conjunto, estas estruturas são referidas como o complexo juncional nos epitélios (Lui et al., 2002).

Nos testículos, de modo distinto ao observado em outros epitélios, as *tight junctions* são encontradas adjacentes à membrana basal e encostadas às junções de aderência e aos desmossomos. Essas junções dividem uma célula em dois compartimentos fisiológicos que

conferem a polaridade celular, e criam uma barreira que permite o fluxo transepitelial seletivo de moléculas e íons através dos espaços intercelulares entre as células epiteliais através da via paracelular. Por exemplo, as *tight junctions* das células de Sertoli dividem o epitélio seminífero em compartimento basal e compartimento adluminal. Além disso, também agem como um importante local e via para a passagem de vesículas e transdução de sinal (Lui et al., 2002).

Embora a barreira hematotesticular seja uma das mais fortes barreiras hematotéciduais, ela se reestrutura para facilitar o trânsito de espermatócitos em pré-leptóteno no estágio VIII do ciclo de espermatogênese no epitélio seminífero (França et al., 2011).

A espermatogênese é uma sequência de eventos pelos quais as espermatogônias são transformadas em espermatozóides, tendo início na puberdade e duração por toda a vida. Por serem as únicas células com receptores para testosterona e FSH, as células de Sertoli são as principais reguladoras da espermatogênese (Walker et al., 2005). Neste processo as espermatogônias, quiescentes desde o período fetal, iniciam a meiose ainda na região periférica dos túbulos seminíferos, fora do espaço delimitado pela barreira hematotesticular. Os espermatócitos primários formados nessa fase, quando em pré-leptóteno, sinalizam para a abertura da barreira, entrando na região de imunoprivilégio para então completar seu desenvolvimento até a formação dos espermatozoides (Moore & Persaud, 2013).

Esse processo é regulado pela interação de sinais endócrinos e parácrinos. O hormônio mais importante nesse processo é o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), produzido pelo hipotálamo. O GnRH induz a produção de Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), pela hipófise anterior, que agirão no testículo para que esse possa controlar o potencial espermatogênico. O LH se liga aos receptores na superfície das células de Leydig nos testículos e estimula a produção de testosterona, um hormônio esteroide que se difunde nos túbulos seminíferos (Walker et al., 2005).

Evidências mostram que o controle do processo espermatogênico é mediado pelas células de Sertoli pela ação dos andrógenos testiculares via receptor de Andrógeno (AR), uma vez que em animais *knockouts* para o AR foi observada a da espermatogênese, interferindo em alvos moleculares específicos (Verhoeven et al., 2010) – Figura 6. Alterações estruturais e na síntese desse receptor ocasionam a deficiência no transporte de testosterona e consequentemente infertilidade masculina ou insensibilidade parcial ou completa de andrógenos (Heinlein et al., 2001).

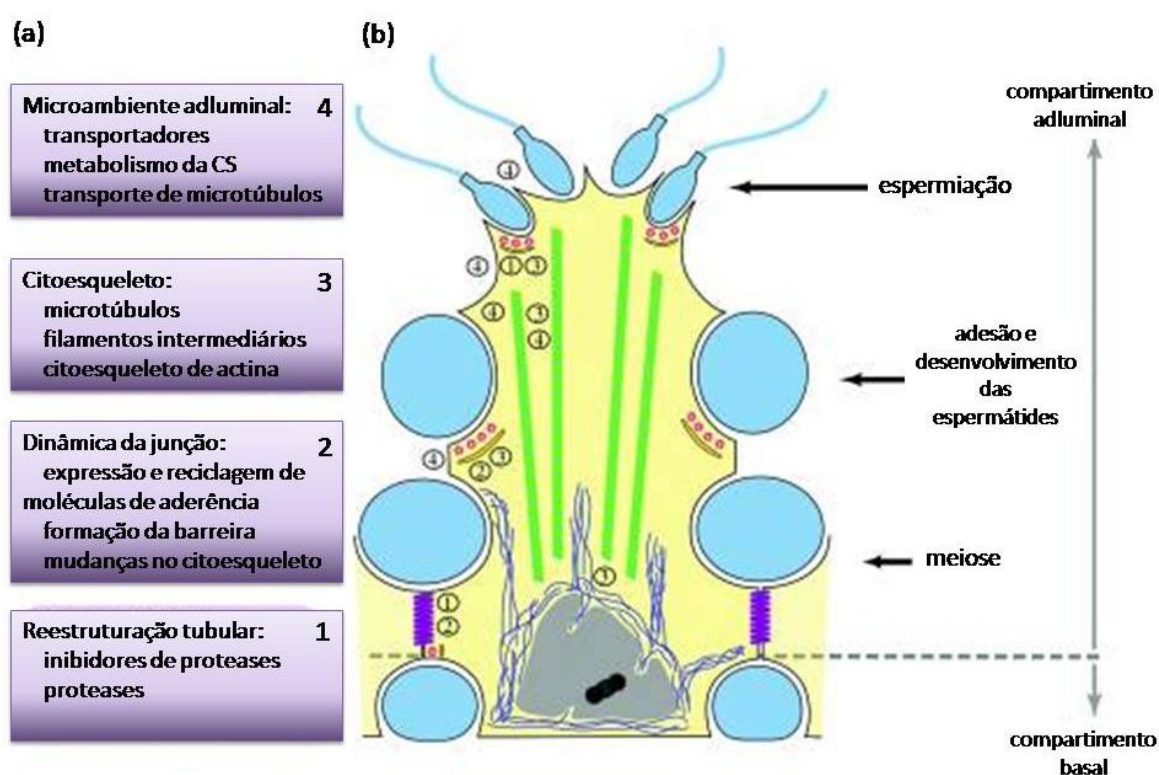


Figura 6. Representação esquemática dos mediadores moleculares da ação androgênica sobre a espermatogênese. (b) indica as principais fases da espermatogênese afetadas pelos andrógenos. Em (a), um número de processos e alvos moleculares que são identificados como potenciais alvos de ação androgênica. Em amarelo (célula de Sertoli); em azul (células espermatogênicas). Microtúbulos e filamentos intermediários são representados em verde e azul escuro. Junções de oclusão são representadas em púrpura. Extraído e adaptado de Verhoeven et al., 2010.

As espermatogônias-tronco, espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas e espermatócitos em pré-leptóteno ficam fora da barreira, no compartimento basal, enquanto

espermátócitos finais (em zigóteno, paquíteno, diplóteno), espermátócitos secundários, espermátides e espermatozoides ficam restritos ao compartimento luminal no epitélio seminífero.

É possível, portanto, que as espermatogônias-tronco recebam os sinais das células de Sertoli polarizadas perto da membrana basal por meio de junções *gap*, de modo que possam sofrer diferenciação adequada durante o ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese (Cheng & Mruk, 2011).

Cheng & Mruk (2011) demonstraram que alguns complexos protéicos de adesão (como ocludina/ZO-1, N-caderina/ β -catenina, claudina-5/ZO-1), esteroides (testosterona e estradiol-17 β), proteínas quinases *nonreceptor* (*focal adhesion kinase*, c-Src, c-Yes), proteínas de polaridade (PAR6, Cdc42, 14-3-3), proteínas de vesícula endocítica (clatrina, caveolina e dinamina 2), e proteínas reguladoras de actina (Eps8, complexo Arp2/3), estão trabalhando juntos, aparentemente sob influência de citocinas (fator transformador de crescimento- β 3, fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 α) na criação de uma “nova” barreira hematotesticular atrás dos espermátócitos em trânsito, enquanto a “antiga” vai se degenerando aos poucos de forma que a barreira imunológica é mantida durante a travessia dos espermátócitos pela barreira (Figura 7).

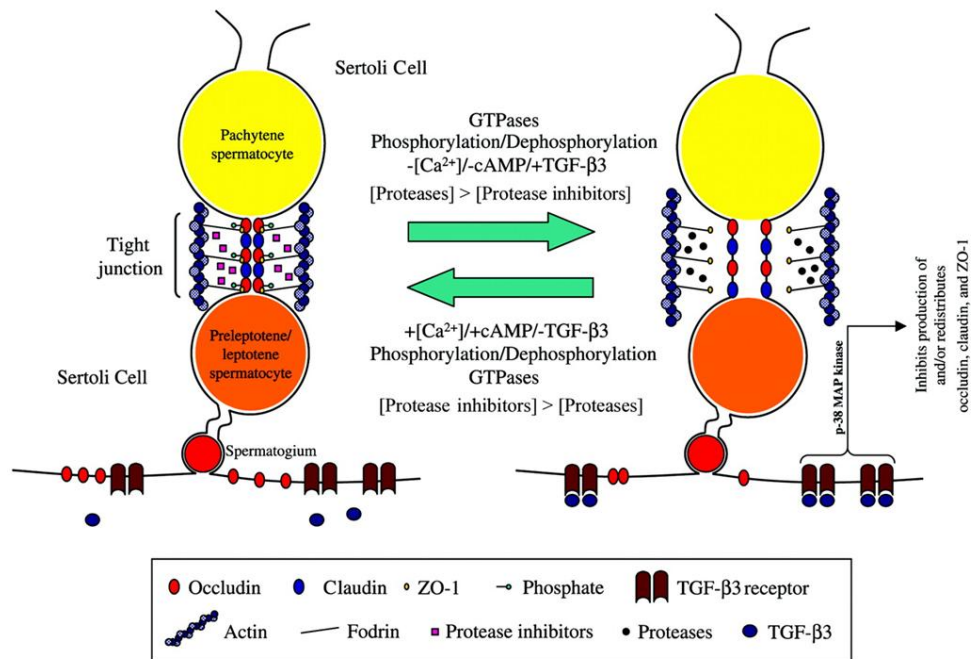


Figura 7. Representação esquemática do processo de abertura e fechamento da barreira hematotesticular para permitir a passagem de espermátócitos em pré-leptóteno (Cheng & Mruk, 2002).

Yan e colaboradores (2011) mostraram que proteínas integrais de membrana são continuamente sujeitas a endocitose e recicladas de volta para a superfície da célula de Sertoli. Nesse estudo, os autores observaram que quando a testosterona ou TGF- β 2 foi adicionado à culturas de células de Sertoli com barreira hematotesticular funcional estabelecida, os dois fatores aceleraram a cinética de internalização de proteínas a partir da superfície celular, abrindo assim a barreira. Da mesma forma, verificou-se que a testosterona também melhora a cinética de reciclagem de proteínas internalizadas de volta para a superfície da célula, para remontar a barreira hematotesticular. Em contraste, o TGF- β 2 levou as proteínas internalizadas a endossomos tardios para a degradação, desestabilizando a barreira hematotesticular.

Na barreira hematotesticular, a *tight junction* coexiste com a especialização basal no epitélio seminífero próximo a membrana basal, por esse motivo essas duas ultraestruturas são discutidas juntas. Pela coexistência da especialização basal com a *tight junction*, ainda é

difícil identificar proteínas que são únicas à especialização basal, pois as supostas proteínas da *tight junction* (occludina, claudina, JAM-A, JAM-B) estão localizadas no mesmo sítio que as da especialização basal (N-caderina, β -catenina) (Yan & Cheng, 2005).

Não obstante, Yan & Cheng (2005) mostram que muitas proteínas são comuns à especialização apical e basal (N-caderina, E-caderina, β -catenina, α -catenina, nectinas). Por exemplo, a N-caderina (proteína da especialização basal) e a occludina (proteína da *tight junction*) estão localizadas no mesmo sítio da barreira hematotesticular, mas não tem interação direta proteína-proteína, estando estruturalmente ligadas pelos seus adaptadores periféricos correspondentes, α -catenina e a ZO-1, respectivamente.

Assim, ultraestruturas, como os pacotes de filamentos de actina podem ser utilizados para “reforçar” a função adesiva das células na *tight junction* da barreira hematotesticular. No entanto, quando o testículo é exposto a um tóxico ou quando o epitélio seminífero está no estágio VIII do ciclo epitelial, onde a barreira hematotesticular sofre reestruturação para acomodar o trânsito dos espermatócitos em pré-leptóteno, α -catenina e ZO-1 se tornam “livres” e deixam de ter interação física entre elas, de forma que uma quebra da interação proteína-proteína dentro do complexo occludina-ZO-1 ou N-caderina- α -catenina na *tight junction* ou na especialização basal não leva a quebra imediata do outro, e vice-versa (Yan & Cheng, 2005).

Willems e colaboradores (2010) mostraram que os andrógenos desempenham papel fundamental na espermatogênese e, sob várias condições, eles são capazes de manter a fertilidade na ausência virtual de hormônio folículo-estimulante (FSH). É interessante que a maioria dos dados indica que o receptor de andrógeno (AR) não é expresso nas células germinativas e que estas se desenvolvem normalmente na ausência de expressão autônoma de AR na célula. Isso indica que os andrógenos afetam o desenvolvimento das células

germinativas indiretamente, agindo nas células somáticas do testículo. Considerando que, em outras células somáticas do testículo a expressão de AR é estabelecida durante a vida embrionária, a expressão de AR nas células de Sertoli se inicia tardiamente (4-5 dias pós-natais em ratos e camundongos, 4-8 anos em homens).

A regulação de quase todos os aspectos da espermatogênese pelos andrógenos inclui proliferação e diferenciação das espermatogônias, a progressão do ciclo celular de células germinativas pela meiose, espermiogênese, espermição e adesão celular na interface Sertoli-Sertoli e Sertoli-Célula Germinativa no epitélio seminífero e para conferir privilégio imunológico no testículo (Wang et al., 2009).

Esses efeitos são mediados por caminhos genômicos e/ou não genômicos. Por exemplo, foi mostrado que o *knockout* de AR (AR-KO) específico para as células de Sertoli em camundongos levou a infertilidade, manifestada por impedimento meiótico. Além disso, esses camundongos apresentaram uma barreira hematotesticular deficiente, que estava associada a uma expressão reduzida de claudina-11, ZO-1, ocludina e gelsolina, mas com um aumento significativo da expressão de vimentina (De Gendt et al., 2004).

Também foi observado que a maturação e polarização das células de Sertoli foram perturbadas nos camundongos *Sertoli cell-specific AR-KO*, e que a JAM-C (marcador da especialização apical, restrito a ela) mostrou redução significativa, ilustrando que os andrógenos são cruciais tanto para as funções da especialização apical quanto para a basal (Willems et al., 2010a).

Além disso, a retirada de testosterona resultou no distanciamento de espermátides em desenvolvimento (estágio VIII a XIX das espermátides) a partir de células de Sertoli do epitélio seminífero, demonstrando que a testosterona é importante na adesão celular (Yan et al., 2011).

Adicionalmente, Yan e colaboradores (2011) mostraram que a testosterona promove a função da barreira hematotesticular por "desaceleração" da cinética da endocitose de proteínas. Os autores observaram que a testosterona melhorou significativamente a cinética de internalização de proteínas de membrana integrais das *tight junctions* (JAM-A e ocludina) e proteína de membrana integral da especialização basal (N-caderina) na barreira hematotesticular das células de Sertoli, de forma específica.

Os estudos de Xia e colaboradores (2006) e Li e colaboradores (2006) têm mostrado que as citocinas tais como TGF- β , interferon- γ e fator de necrose tumoral (TNF- α), podem perturbar, de maneira reversível, a barreira hematotesticular *in vivo*, por *down-regulation* do nível de proteína das *tight junctions* e da especialização basal através de um mecanismo ainda a ser definido. Corroborando esses achados, Yan e colaboradores (2011) demonstraram que o TGF- β 2 perturba a barreira hematotesticular ao acelerar a cinética da internalização das proteínas integrais de membrana ocludina e N-caderina, mas não da JAM-A, seguido pela degradação de proteínas endocíticas.

Os andrógenos, de acordo com Yan e colaboradores (2011), facilitam o tráfico de proteínas integrais da membrana entre a superfície da célula e o citosol, bem como a sua reciclagem do citosol de volta para a superfície da célula em vez de aumentar a expressão de proteínas da barreira hematotesticular, que poderia reforçar sua integridade.

Nota-se então que os andrógenos provavelmente exercem os seus efeitos através do deslocamento de proteínas integrais de membrana dentro do microambiente da barreira, como por remontagem (ou "selagem") da barreira sob a migração dos espermatócitos em pré-leptóteno. Considerando que citocinas promovem a endocitose de proteínas de forma semelhante à testosterona, observou-se que a dinâmica da barreira hematotesticular é regulada pela coordenação de ambas as classes de biomoléculas, as quais afetam diferencialmente o destino da endocitose de proteínas de membrana integrais na barreira (Yan et al., 2011).

Desreguladores endócrinos

Tendo em vista a necessidade do controle da espermatogênese para a manutenção da fertilidade masculina, é importante que se atente à exposição à compostos e à fatores ambientais capazes de provocar desequilíbrios e alterações nesse processo (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Entre esse fatores se destacam substâncias dispersas no meio ambiente conhecidas como desreguladores endócrinos (DEs), termo definido pela *American Environmental Protection Agency* (EPA) como “um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais presentes no organismo, responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação do processo de desenvolvimento” (Kavlock et al., 1996).

De acordo com dados do *American Center for Disease Control (Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, 2005)* os humanos estão expostos à, no mínimo, centenas de químicos ambientais, dos quais, dezenas deles são conhecidamente DEs e essa exposição pode ocorrer através do ar, alimentação, água ou contato com uma grande variedade de produtos de consumo.

Atualmente sabe-se que os DEs agem via receptores esteroides nucleares, receptores hormonais esteroides não nucleares, receptores não esteroides (receptores de serotonina, dopamina, norepinefrina), vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo esteroide e através de vários outros mecanismos que estão associados aos sistemas endócrino e genital (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Quanto à exposição aos DEs, Diamanti-Kandarakis e colaboradores (2009) ressaltam a existência de um intervalo de tempo entre o período de exposição e a manifestação

fisiopatológica, ou seja, as consequências da exposição durante as fases iniciais de desenvolvimento, por exemplo, podem não ser imediatamente aparentes, mas podem se manifestar na idade adulta e/ou durante o envelhecimento.

De acordo com Barlow e colaboradores (1999) a exposição a qualquer nível de DEs pode causar anormalidades reprodutivas ou endócrinas, particularmente se a exposição ocorre durante o período crítico de desenvolvimento. Adicionalmente e contrariamente ao esperado, a exposição a baixas doses pode exercer efeitos mais significativos que altas doses, sendo que os DEs podem apresentar uma curva dose-resposta não tradicional, como é o caso da curva U invertida. Por definição uma dose baixa é aquela que se encontra na faixa de exposição humana ou uma dose menor do que a tipicamente utilizada ou definida como a menor dose com efeitos adversos observados (LOAEL, do inglês *“lowest observed adverse effect level”*) (Vandenberg et al., 2012).

Já está bem estabelecido na literatura que os hormônios exercem ação em concentrações extremamente baixas no soro, tipicamente na faixa entre picomolar e nanomolar. Muitos estudos mostram que os DEs podem agir na faixa entre nanomolar e micromolar, com alguns agindo em níveis de picomolar (Vandenberg et al., 2012).

O grupo de moléculas identificado como DE é altamente heterogêneo e inclui químicos sintéticos utilizados como solventes/lubrificantes industriais e seus subprodutos (bifenis policlorados – PCBs, bifenis polibromados - PBBs, dioxinas), plásticos (bisfenol A – BPA), plastificantes (ftalatos), pesticidas (metoxiclor, diclorodifeniltricloroetano – DDT), fungicidas (vinclozolin) e compostos farmacêuticos (dietilestilbestrol - DES) (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Por estarem presentes em materiais comuns do dia-a-dia, como plásticos, produtos de higiene e beleza e diversas embalagens, podemos destacar os ftalatos e o Bisfenol A como

alvos de estudo de extrema importância para a fertilidade masculina (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Desdoits-Lethimonier et al., 2012).

Ftalatos

O di-n-butil ftalato (DBP) (Figura 8) é um desregulador endócrino predominantemente utilizado como plastificante em placas de nitrocelulose e de plásticos de cloreto de polivinilo (PVC), para torná-los flexíveis e também usado como solvente para tintas e pesticidas. Além disso, o DBP é um tipo de matéria-prima industrial para adesivos de látex e lubrificantes de fibras têxteis. Estes materiais são usados para fazer diversos produtos utilizados diariamente, tais como plásticos, tintas, colas, repelentes de insetos, perfumes, spray de cabelo e esmalte de unhas (Desdoits-Lethimonier et al., 2012).

A liberação do DBP no meio ambiente pode ocorrer durante a sua produção e incorporação do ftalato em plásticos, adesivos ou corantes. Por não ser ligado ao produto final, o DBP pode se mover do produto para o meio ambiente durante longos períodos de tempo. Os seres humanos podem ser expostos ao DBP através do ar, água, alimentos ou contato da pele com plásticos que o contêm. Nos últimos anos, o DBP tem sido considerado um importante desregulador endócrino ambiental, com toxicidade reprodutiva, toxicidade para o desenvolvimento e um potencial efeito cancerígeno (Desdoits-Lethimonier et al., 2012).

O DBP é metabolizado pelo organismo através das hidrolases intestinais, formando o monobutil ftalato (MBP), seu metabólito monoéster ativo (Figura 9), capaz de inibir a síntese de testosterona fetal, resultando no efeito antiandrogênico do DBP (Yang Hu, 2012).

De acordo com a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA/Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) a via principal para que os humanos sejam contaminados com

dietilhexil ftalato (DEHP) e o di-n-butil ftalato, os mais utilizados como plastificantes, seja a via alimentar. Os ftalatos causam uma larga série de efeitos adversos à saúde, incluindo danos ao fígado, aos rins e ao pulmão bem como anormalidades no sistema genital e no desenvolvimento sexual (Wei et al., 2011).

No Brasil, pela portaria 369 do Inmetro (2007), o DBP não pode estar presente em concentração superior a 0,1% sobre a massa do material produzido. Na União Européia, os brinquedos destinados a serem colocados na boca por crianças com menos de três anos de idade estão proibidos de conter esse composto (ANVISA, 2014).

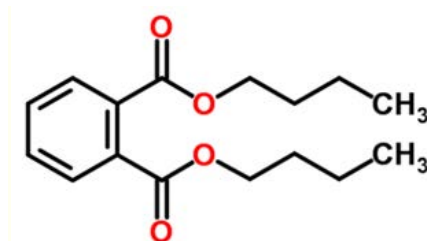


Figura 8. Estrutura química do DBP

Auharek e colaboradores (2010) mostraram que a exposição fetal de ratos a 500 mg/kg de di-n-butil ftalato reduz a produção fetal de testosterona e o número de células de Sertoli ao nascimento, mas o número de células volta ao normal a partir do 25º dia pós-natal, mostrando seu efeito sobre a formação testicular, com recuperação na fase de desenvolvimento pós natal do testículo na ausência de DBP.

Outro estudo com exposição fetal, porém utilizando o MBP, mostrou inibição da descida testicular em ratos neonatos cujas mães foram tratadas entre 15 e 17 dias de gestação (Yang Hu, 2012).

Yao e colaboradores (2010) relataram que a lesão da célula de Sertoli em roedores após exposição ao mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP) resultou na ativação da matriz de metaloproteinase 2 (MMP2) e aumentou a sensibilidade das células germinativas para sofrer apoptose. Além disso, foi observado que a exposição de camundongos C57BL/6J ao MEHP

(1g / kg, por gavage), diminuiu a expressão de ocludina nas *tight junctions* entre células de Sertoli e provocou o aparecimento de lacunas entre as células de Sertoli adjacentes.

Desdoits-Lethimonier e colaboradores (2012) mostraram que os ftalatos inibem significativamente a produção de testosterona. Yang Hu (2012) relatou a atividade estrogênica do MBP em vários tipos de animais e tipos de células, porém seu mecanismo de ação ainda precisa ser determinado.

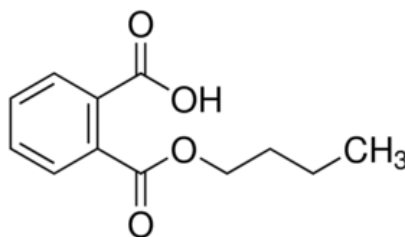


Figura 9. Estrutura química do MBP

Bisfenol A

O Bisfenol A (BPA) (Figura 10) é um composto industrial utilizado como componente de plásticos policarbonatos, resinas epóxi e selantes dentários (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

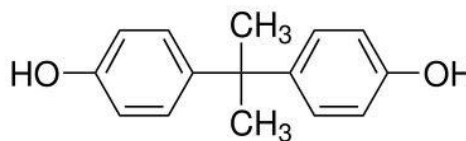


Figura 10. Estrutura química do BPA

As resinas epóxi são utilizadas como revestimento de latas de alimentos e tampas de metal, acabamentos, adesivos e revestimento de tubulações de PVC, enquanto os policarbonatos plásticos são utilizados na fabricação de discos compactos, eletrodomésticos, embalagens de alimentos e garrafas plásticas com elevada resistência a impacto, dureza e tenacidade (Rubin, 2011).

Segundo Li e colaboradores (2009), o BPA é uma substância estrogênica tóxica ambiental, com ampla exposição ao público e rápida metabolização no organismo. Isto torna o BPA menos tóxico do que outros agentes, como o cloreto de cádmio (Fiorini et al., 2004), mas em virtude de seu uso generalizado e da alta exposição a que os humanos estão sujeitos, esse composto se tornou o químico com atividade estrogênica mais estudado (Rubin, 2011).

Estudos epidemiológicos em humanos têm correlacionado os níveis de BPA à patologias (Rubin, 2011). Baseado na pesquisa do NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) do *American Center for Disease Control* (CDC) de 2003-2004, o BPA foi detectado em níveis relevantes em cerca de 90% dos americanos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009), sendo essa exposição maior em crianças em comparação a adolescentes e com os adolescentes apresentando níveis mais elevados do que adultos (Howdeshell et al., 2003). Esta é uma observação importante, pois demonstra a grande exposição ao BPA durante o período de desenvolvimento pré púbere (Rubin, 2011).

Outros estudos epidemiológicos experimentais *in vitro* fornecem evidências de que os níveis de BPA detectados em humanos em pesquisas de biomonitoramento, os quais estão no intervalo de 0,3-4ng/mL, podem desregular ou interferir os processos de desenvolvimento e função celular com efeitos adversos em humanos (Vandenberg et al., 2009).

Alguns estudos em animais mostraram que o BPA, no entanto, parece perturbar principalmente a espermiogênese através da especialização apical, quando administrado a ratos adultos e camundongos, sem efeitos graves sobre o estado da espermatogênese (Toyama et al., 2004).

Cheng e colaboradores (2011) mostraram que a exposição intrauterina, perinatal ou neonatal ao BPA em ratos afeta a integridade da barreira hematotesticular. Este efeito do BPA sobre a integridade da barreira em ratos imaturos é provavelmente mediado pela perda da

função das *junções gap* na barreira hematotesticular, deixando de coordenar a função da *tight junction* e das junções de ancoragem para manter a integridade da barreira imunológica. Isto, por sua vez, leva ao aumento na endocitose de proteínas, desestabilizando a barreira hematotesticular. Outra possibilidade levantada por Cheng e colaboradores (2011) é de que os efeitos negativos destas substâncias tóxicas para a função testicular sejam mediados por *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). As MAPK, por sua vez, interferem no agrupamento de actina e aceleram sua atividade de ramificação, causando a interrupção da *tight junction* e de sua função na barreira hematotesticular, perturbando assim a adesão das espermatídes, que leva a uma liberação prematura de células germinativas do testículo.

Alguns trabalhos *in vitro*, mostraram que o BPA reduziu significativamente os níveis de ocludina, N-caderina e conexina43 na linhagem de células de Sertoli SerW3 (Fiorini et al., 2004), resultando em alterações estruturais e funcionais sobre a barreira hematotesticular, além de perturbar a comunicação das junções gap (Li et al., 2009).

Sendo assim, por precaução, alguns países, inclusive o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras que contenham Bisfenol A, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012 e foi feita por meio da Resolução RDC n. 41/2011. Para as demais aplicações, o BPA ainda é permitido, mas a legislação estabelece limite máximo de migração específica desta substância para o alimento definido com base nos resultados de estudos toxicológicos (ANVISA, 2014).

JUSTIFICATIVA

As células de Sertoli compartilham do mesmo microambiente que as células germinativas e os processos de espermatogênese e espermição dependem desta célula para ocorrer. Com isso, estabelecer as relações entre desreguladores endócrinos amplamente utilizados, como o MBP e o BPA, e as células de Sertoli é de extrema importância para elucidar mecanismos de controle do processo espermatogênico.

Por existirem poucos estudos utilizando baixas doses desses desreguladores, mesmo após seu reconhecimento como fator de risco pela Organização Mundial da Saúde (ANVISA, 2014), é muito importante conhecer seus efeitos, a fim de evitar o comprometimento da saúde e do desenvolvimento reprodutivo humano e colaborando assim para a redução dos casos de infertilidade por contaminação ambiental.

OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo correlacionar a ação de dois desreguladores endócrinos, o Monobutil ftalato (MBP) e o Bisfenol A (BPA), em diferentes períodos de exposição, a partir de uma dose de baixa toxicidade, sobre a linhagem HSec de células de Sertoli humanas (*in vitro*) e sua possível ação sobre proteínas da barreira hematotesticular e proteínas regulatórias da célula de Sertoli, envolvidas na modulação da degradação e síntese dessa barreira e, desta forma, na manutenção da fertilidade masculina.

RESULTADOS

Durante a execução deste trabalho foram empregadas metodologias específicas, como cultura celular e análise molecular de expressão de proteínas. Os experimentos foram conduzidos em dois laboratórios do departamento de Morfologia do IB/UNESP, Botucatu, SP – Brasil:

→ Laboratório de Cultura Celular

→ Laboratório de Desreguladores Endócrinos e Carcinogênese Experimental

Os dados resultantes deste trabalho foram reunidos no artigo a seguir.

**Regulatory and junctional proteins of the blood-testis barrier in human Sertoli cells
(HSec) are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA)**

André Teves Aquino Gonçalves de Freitas¹; Mariana Antunes Ribeiro¹; Wellerson R. Scarano^{2*}

¹Graduate Program in General and Applied Biology, ²Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil;

Acknowledgements

This paper was supported by grants from FAPESP – Sao Paulo State Research Foundation (Proc. Nr. 2012/00253-3 for fellowship to WRS) and by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel) for scholarship for ATAGF.

*** Corresponding Author:**

Wellerson Rodrigo Scarano, PhD.

Department of Morphology

Institute of Biosciences – UNESP

Botucatu, SP, Brazil

Zip Code 18618-970

Email: scarano@ibb.unesp.br

Abstract

Sertoli cells, found in the seminiferous epithelium, form the blood-testis barrier via their gap and tight junctions, responsible for providing a protected environment and coordinate the spermatogenic process, essential for male fertility maintenance. The dynamics of the blood-testis barrier formation is directly related to the balance between synthesis and degradation of specialized molecules, and is influenced by androgen regulation and specific growth factors such as TGF- β 2, being particularly sensitive to environmental factors. Exposure to endocrine disruptors (EDs), which interfere in the barrier modulation, can lead to infertility. Currently the male factor may be responsible for 30-50% of infertility cases, being the establishment of the relationship between exposure to EDs and the process of gametes formation of great importance. This study aimed to correlate the action of two EDs, monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) in different periods of exposure, from a dose of low toxicity on the HSec lineage of human Sertoli cells (*in vitro*) and its possible action on proteins of blood-testis barrier and regulatory proteins involved in modulation of degradation and synthesis of this barrier. To this end, cells were cultured in HSec lineage specific medium and exposed to MBP and BPA in low doses for 6 and 48 hours. Then, cells were isolated and subjected to protein extraction. Proteins analyzed were: occludin, N-cadherin, β -catenin and Androgen Receptor (AR) by Western blot. The results were compared for the two agents in different exposure times to non-treated cells, showing that both agents were able to reduce the expression of important BTB proteins, presenting potential for disrupting the structure and maintenance of the barrier and, consequently, sperm production and male fertility.

Keywords: endocrine disruptors, monobutyl phthalate, bisphenol A, male reproductive function, blood-testis barrier, spermatogenesis, Sertoli cells, HSec.

Introduction

Infertility is defined as inability of a couple to conceive naturally after one year of regular unprotected sexual intercourse (Kamel, 2010). Infertility affects 10-15% of couples at reproductive age and male factor may be responsible for 30-50% of cases (Boivin et al., 2007), being reproductive tract particularly susceptible to environmental factors, such as exposure to endocrine disruptors capable of triggering morphological and functional changes (Sikka & Wang, 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2010).

An endocrine disruptor (ED) is an exogenous agent that interferes with the production, release, transport, metabolism, binding action or elimination of natural blood-borne hormones present in the body, responsible for homeostasis, reproduction, and developmental process (Kavlock et al., 1996). Consistent detection of endocrine disruptor's residues in human serum and seminal plasma has raised concern that environmental exposure is affecting human fertility (Younglai et al., 2002).

Germ cells development takes place in the seminiferous tubules and depends on Sertoli cells for growth factors and nutrients supply. Sertoli cells are responsible for providing a secure and highly specialized environment within the seminiferous tubules for germ cells development (Weber et al., 1983; Skinner, 2005; França et al., 2011).

Sertoli cells are connected by gap and tight junctions, establishing the blood-testis barrier (BTB). Adhesion protein complexes such as gap junction's N-cadherin/ β -catenin and tight junction's occludin/ZO-1, work together to maintain the barrier. Despite being one of the strongest blood-tissue barriers, the BTB undergoes extensive restructuring to allow the transit of preleptotene spermatocytes. Yet the immunological barrier conferred by the BTB cannot be compromised, even transiently, during the epithelial cycle to avoid the production of antibodies against meiotic and post meiotic germ cells (Mruk & Cheng, 2004).

Sertoli cells share the same microenvironment of germ cells and spermatogenesis and spermiation process depends on this cell to occur. Thus, establishing links between widely used endocrine disruptors, such as Monobuty Phtalate (MBP) and Bisphenol A (BPA), and Sertoli cells is extremely important to elucidate mechanisms of control of the spermatogenic process.

Knowing that there are few published studies using low doses of these disruptors, especially in human model, it is very important to know its effects in order to avoid compromising health and human reproductive development and to collaborate for the reduction of infertility cases associated with environmental contamination.

This study aims to correlate the action of two EDs, MBP and BPA, in different periods of exposure, from a dose of low toxicity on the HSec line of Sertoli human cells (*in vitro*) and its possible action on blood-testis barrier integral and regulatory proteins, involved in spermatogenic process modulation and therefore, in the maintenance of male fertility.

Material and Methods

Sertoli cell culture

The HSec Human immortalized Sertoli cell line (Lonza, Walkersville, MD, USA), was maintained in Sertoli Cell Basal Medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco®, Grand Island, NY, USA), and 500µL of Antibiotic-Antimycotic (100x) containing 10,000 units/mL of penicillin, 10,000 µg/mL of streptomycin, and 25 µg/mL of Fungizone® Antimycotic (Gibco®, Grand Island, NY, USA), at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity, as described by Ribeiro et al. (2014) (Figure 1).

Endocrine disruptors dose definition

Endocrine disruptors action principle has always been controversial: it is difficult to determine its LOAEL and if it can be found in vivo (Foster et al., 2008), beyond most LOAEL for EDs are outdated (Vandenberg et al., 2012). For instance, detrimental effects of BPA have been shown on reproduction in much lower levels than their LOAEL - 50 mg / kg of body weight per day (Newbold et al., 2009).

Given the difficulty of determining a low dose, doses of endocrine disruptors used in this study were defined according to the literature for MBP (Li et al., 2009; Frederiksen et al., 2011; Chu et al., 2013; Zhou et al., 2013; Hu et al., 2013) and BPA (Monsee, 2000; Li et al., 2009; Salian et al., 2009; Izumi et al., 2011; Wang et al., 2012). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide tetrazolium) (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA) was used as an indicator of cell viability as determined by the transformation of tetrazolium salt MTT to an insoluble formazan salt. Chosen doses were 10 μ M to MBP and 20 μ M to BPA.

Cell treatment

To examine the effects of toxicants, HSec Sertoli cells were cultured in triplicates, as previously described, until a confluence of 70% was observed. The different test toxicants were then added in fresh SeBM medium and cells were cultured for 6 or 48 subsequent hours. Cells were then resuspended in trypsin/EDTA 0,25% and centrifuged in PBS 2x. Pellets were then subjected to protein extraction for analyses by Western blot. Bisphenol A and MBP were purchased from Sigma-Aldrich[®] (St Louis, MO, USA) and diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA). The maximal concentration of DMSO in SeBM (0.05% v/v) did not affect control experiments.

Western Blot

Protein lysates were prepared in RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA) (1mL for $\sim 5 \times 10^6$ cells) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA) ($\sim 10 \mu\text{l/ml}$). Cells were transferred to an ependorf tube and maintained on ice for 5 minutes. Then, homogenised by vortexing and centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4°C and the supernatant was collected. The protein quantification was performed by the Bradford method in ELISA plates with 96 wells and read in an ELISA reader (595 nm). Aliquots (30-100 μg of protein) were treated with buffer solution (Laemmli Sample Buffer - BIO-RAD[®]) and β -mercaptoethanol at 100°C for 5 minutes. Proteins were resolved by SDS-PAGE and, after electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane. The nonspecific binding of proteins was blocked by incubating the membrane in 3% BSA in TBST buffer for 1 hour and 30 minutes at room temperature. The membranes were incubated overnight at 4°C with the respective primary antibody: anti-occludin (clone ab31721); anti-N-cadherin (clone ab12221); anti- β catenin (clone ab32572) from Abcam[®] Inc., Cambridge, MA, USA; Androgen Receptor (sc-816, Santa Cruz[®] Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Cytoskeletal protein β -actin (antibody anti- β -actin clone sc-47778, Santa Cruz[®] Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) serve as protein loading controls. After four washing cycles in TBST, membranes were incubated with specific HRP secondary antibody (IgG goat-anti rabbit, ab97051 or IgG goat-anti mouse, ab97023; Abcam[®] Inc., Cambridge, MA, USA). Immunoreactive components were revealed by chemiluminescence (Amersham[™] ELC Select[™] Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare[®], UK). To calculate the mean and SEM, the optic density of the band was used as the unit of measure.

Statistical Analysis

All results are expressed by the mean $\pm$ SEM derived from the number of different experiments. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney's test. P values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

MBP and BPA induces tight junction disruption

Tight junctions are characterized by adhesion protein complexes formed mainly by occludin and ZO-1 connection. When human HSec Sertoli cells were exposed to MBP, occludin expression tended to decline after a 6H exposure (20%), and significant occludin reduction was observed after 48-exposure hour, compared with the control group (Figure 2).

Similarly, a significant reduction in the level of occluding was observed at 48h after BPA treatment, but only a tendency (19%) after 6h exposure (Figure 2).

MBP and BPA induces gap junction disruption

Gap junctions are formed by proteins such as N-cadherin and β -catenin, responsible for cell adhesion. After 6h MBP treatment, comparison with control group showed no significant changes in N-cadherin or β -catenin expression, although N-cadherin tended to decline (17%). Meanwhile, the expression of N-cadherin significantly decreased after 48h MBP treatment, combined with a tendency of β -catenin decrease after the same exposure period (36%) (Figures 3 and 4).

On the contrary, BPA exposure showed no tendency or significant decline in N-cadherin expression, but did in β -catenin expression when compared to control group. After

6h exposure, β -catenin tended to decline (35%), and was significantly down-regulated after 48h treatment.

MBP and BPA seems to induces blood-testis barrier disruption through Androgen Receptor down-regulation

Androgen Receptor mediates the kinetics of integral junction protein. Exposure to MBP and BPA lead to a down-regulation of AR in both exposure times (Figure 5).

Discussion

In this study, we showed that the endocrine disruptor Monobutyl phthalate and Bisphenol A lead to a down-regulation of Androgen Receptor and junctional proteins in HSec Human Sertoli cell line.

Although Cheng & Mruk (2012) recently illustrated that studies using Sertoli cell lines may not reflect the physiological function of the Sertoli cell in vivo, our study is in agreement with Fiorini et al. (2004), that reported native Sertoli cell features, like morphology, particularly tight junctions and some functional features in rat Sertoli cell line SerW3. The ability to form junctional interactions and express major and specific proteins involved in cell adhesion was seen in our study. Similarly, Chui et al. (2011) showed that human Sertoli cells, when cultured in vitro, establish a functional epithelium that is associated with a physiological, tight junction-permeability barrier that mimics the Sertoli cell BTB in vivo.

Tight junctions are the only types of occlusion junction in the mammalian epithelium and endothelium, characterized by adhesion protein complexes formed mainly by occludin and ZO-1 connection (Lui et al., 2002).

The data presented in this communication showed that MBP, at 10 μ M, declined occludin expression in 48h exposure, with a decline tendency after 6h treatment. Similarly, Li et al. (2010) showed that the metabolite and main toxicants of DBP and MBP induced damage to tight junctions between adjacent Sertoli cells at doses of 150 μ M and 600 μ M.

Defamie (2001) observed a similar expression reduction for ZO-1, after an endocrine disruptor exposure, but not for occludin.

BPA have also been shown to perturb blood-testis barrier tight junction. Studying BPA effects on immature rats, Li et al. (2009) found that 200 μ M of BPA in 24-hour exposure was able to reversibly perturb tight junction barrier by the redistribution of BTB-associated proteins. BPA lead to a decline of N-cadherin and occludin at the Sertoli cell interface, what would affect cell adhesion, thereby compromising the tight junction barrier function and leading to BTB disruption. Likewise, we reported a significant reduction in occluding expression after 48h of BPA exposure.

Fiorini et al. (2004) also reported that BPA at 45 μ M, when exposed to rat Sertoli cell line SerW3, significantly reduced the steady-state protein levels of occludin and N-cadherin, showing that Sertoli cell junctional protein expression seems to be a sensitive and specific biomarker for cytotoxicity studies in vitro.

Otherwise, despite finding a mild but significant decline of occludin in high acute doses, Li et al. (2009) concluded that BPA did not significantly disrupt BTB integrity and the spermatogenesis in adult Sprague-Dawley and Wistar rats at 10 or 50 mg/kg. These findings corroborate the fact that only free BPA in the systemic circulation is biologically active.

When adult mammals, including rats and humans, ingested bisphenol A, it is rapidly metabolized in the liver to its nontoxic BPA-glucuronide form, which is then excreted by the kidney. The ability of immature rats to metabolize BPA is nonetheless less efficient (Chapin et al., 2008), being cell culture results more comparable to immature *in vivo* effects.

In primary cell culture of immature rats, immunoblot analyses showed that BPA caused a dose-dependent reduction in several junction proteins, at doses from 0,01 to 800 μ M. These include tight junction proteins, namely occludin, JAM-A, and ZO-1, and basal proteins, namely N-cadherin, β -catenin, and α -catenin (Li et al., 2009). Interestingly, we did not observe a change N-cadherin after BPA exposure, but our results are in agreement with occludin and β -catenin decrease observation.

Likewise, we reported here that MBP and BPA induced gap junction disruption. Gap junctions are cell-cell communication junctions formed by proteins such as N-cadherin and β -catenin, which form a protein complex responsible for cell adhesion. It can be found in the basal region of the blood-testis barrier (Lie et al., 2011a).

Using the 24GPA9 Sertoli cell line, Defamie (2001) showed that lindane, at a non-cytotoxic dose (50mM), abolished gap junction intercellular communication between adjacent cells. This change was associated with a time-related diminution and redistribution of Cx43 from the membrane to the cytoplasmic perinuclear region. Instead, we analyzed N-cadherin and β -catenin, also from gap junctions, showing significant decrease after 48h exposure of MBP and BPA, respectively.

In two previous in vitro studies, it was indicated that phthalates disturbed the energy transfer chain existing between germ cells and Sertoli cells to lead to adverse changes in cell polarization, which affects membrane proteins (Foster et al., 1982; Li, 1997). Our results with MBP also showed phthalate potential to disturb adhesion junctions.

Xiao et al. (2014), in a study involving cadmium and BPA, reported no differences in N-cadherin or β -catenin expression after cadmium exposure. On the contrary, they reported that BPA at 200 μ M down regulated the expression of these proteins, what was also observed in our study with 20 μ M BPA exposure.

Fiorini et al. (2004) showed strong evidence that these specialized junctional proteins are essential for the development and maintenance of spermatogenesis and that alterations of Sertoli–Sertoli cell interactions may lead to sterility in the male.

Furthermore, spermatogenesis maintenance depends on blood-testis dynamics control by Androgen Receptor, which mediates the kinetics of integral junction protein, including their distributions, internalization, degradation and recycling (Li et al., 2009).

Our study shows that both MBP and BPA, at 10 μ M and 20 μ M respectively, after 6 or 48h exposure lead to a decline in Androgen Receptor expression in HSec Sertoli cells. Li et al. (2009) suggested that the disruptive effects of BPA on the Sertoli cell BTB function appear to be mediated via changes in the kinetics of integral junction protein. These include their redistribution at the Sertoli–Sertoli cell interface and an increase in their turnover rate. Indeed, BPA was shown to enhance the turnover of occludin and N-cadherin in Sertoli cells with an established tight junction barrier.

Li et al. (2009) also suggest that this alteration of the distribution of integral membrane proteins and their peripheral adaptors, seen in our study, is likely due to a significant increase in the turnover from the cell surface. This increase in the protein turnover represents the net result of their internalization, degradation and recycling. Otherwise, Izumi et al. (2011) showed no difference in AR protein levels after 200 μ M BPA exposure for 30min-24h.

Ablation of AR, as shown by Willens (2010), affects Sertoli cell maturation, results in delayed and incomplete formation of the blood-testis barrier, and changes the expression pattern of several genes related to cell adhesion and cytoskeletal development in Sertoli Cell. We showed that a reduction of AR expression also leads to an expression change of several junctional proteins. However, the precise mechanisms whereby these toxicants may exert their effects on intercellular junctions in the testis are not entirely known (Fiorini et al., 2004).

In the same way, Wakui et al. (2013) could not elucidate the precise mechanism of phthalates repression of AR expression after reporting that DBP at 100 mg/kg/day on gestacional day 12 to 21 reduced offspring AR expression level to 55% in Leydig cells. Elucidation of AR repression mechanism needs to be researched in further experiments.

The reduction of androgen receptor expression may affect the synthesis of proteins that form the blood-testis barrier, as shown in our study. Furthermore, after establishing the blood-testis barrier AR is required for the process of opening the barrier for primary pre-leptotene spermatocytes passage, which means that the structurally normal barrier may not be functional, leading to infertility (Willems et al., 2010).

Using HSec Sertoli human cells lineage as an experimental model of the blood-testis barrier, we found that the two endocrine disruptors studied, Monobutyl phthalate and Bisphenol A were able to reduce the expression of integral barrier proteins and to interfere with the modulation of the blood-testis barrier dynamics, reducing the expression of the androgen receptor in both studied periods of exposure. Thus, considering the importance of blood-testis barrier for male fertility maintenance, we showed that the two disruptors have the potential to reduce male fertility.

References

- Boivin, J., L. Bunting, et al. (2007). "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." *Hum Reprod* 22(6): 1506-12.
- Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray Jr LE, Hayward SW, Lees PSJ, et al. Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:157–395.
- Cheng Y C, Mruk D D. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev*. 2012 January; 64(1): 16–64.
- Chu DP, Tian S, Sun DG, Hao CJ, Xia HF, Ma X. Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(8):1174-84.
- Chui K, Trivedi A, Cheng CY, Cherbavaz DB, Dazin PF, Huynh AL, Mitchell JB, Rabinovich GA, Noble-Haeusslein LJ, John CM. Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplant*. 2011;20(5):619-35. doi: 10.3727/096368910X536563. Epub 2010 Nov 5.
- Defamie N, Mograbi B, Roger C, et al. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1537–42.
- Diamanti-Kandarakis E, Palioura E, Kandarakis SA & Koutsilieris M. The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. *Hormone and Metabolic Research* 2010 42 543–552.
- Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*. 2004 May;18(3):413-21.
- Foster PMD, Foster JR, Cook MW. Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1982;63:120–32.
- Foster WG, Neal MS, Han MS & Dominguez MM. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 2008 11 162–176.
- França LR, Auharek SA, Hess RA, Dufour JM, and Hinton BT (2011). Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers, in *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers* (Cheng CY ed) pp in press, Landes Bioscience, Austin, TX.
- Frederiksen H, Aksglaede L, Sorensen K, Skakkebaek NE, Juul A, Andersson AM. Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environ Res*. 2011 Jul;111(5):656-63. Epub 2011 Mar 22.
- Hu Y, Li D, Lu Y, Han X. Monobutyl phthalate induces the expression change of G-Protein-coupled Receptor 30 in rat testicular Sertoli cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51(1):18-24.
- Izumi Y, Yamaguchi K, Ishikawa T, Ando M, Chiba K, Hashimoto H, Shiotani M, Fujisawa M. Molecular changes induced by bisphenol-A in rat Sertoli cell culture. *Syst Biol Reprod Med*. 2011 Oct;57(5):228-32. Epub 2011 May 16.
- Kamel, R. M. (2010) "Management of the infertile couple: an evidence-based protocol." *Reprod Biol Endocrinol* 8: 21.
- Kavlock, RJ, Daston, GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996 Aug;104 Suppl 4:715-40.
- Li LH. In vitro culture method. In: Ding XC, Jiang XZ, Gu ZW, editors. *Male reproductive toxicology*. Beijing: Chinese Population Publishing House; 1997. p. 78–82.
- Li W M M, Mruk DD, Lee W M, Cheng C Y. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 November.
- Li, D., Hu Y., Shen, X., Dai, X., Han X. (2010) Combined effects of two environmental endocrine disruptors nonylphenol and di-n-butyl phthalate on rat Sertoli cells in vitro. *Reproductive Toxicology*.

- Lie PP, Cheng CY, and Mruk DD (2011a) The biology of the desmosome-like junction: A versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* 286:223–269.
- Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2003 Apr;68(4):1087-97. Epub 2002 Oct 31.
- Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*. 2000 Sep;32(4-5):239-46.
- Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2004). "Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis." *Endocr Rev* 25(5): 747-806.
- Newbold RR, Jefferson WN & Padilla-Banks E. Prenatal exposure to bisphenola at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives* 2009 117 879–885.
- Ribeiro MA, dos Reis MB, de Moraes LN, Briton-Jones C, Rainho CA, Scarano WR. Defining suitable reference genes for RT-qPCR analysis on human sertoli cells after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure. *Mol Biol Rep*. 2014 Nov;41(11):7063-6. Epub 2014 Jul 31.
- Salian S, Doshi T, Vanage G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of Sertoli cell junctional protein in the testis. *Toxicology*. 2009 Nov 9;265(1-2):56-67. Epub 2009 Sep 25.
- Sikka SC & Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian Journal of Andrology* 2008 10 134–145.
- Skinner, M.K. (2005) "Sertoli cell secreted regulatory factors". In *Sertoli Cell Biology*, 107–120. Eds MK Skinner & MD Griswold. San Diego: Elsevier Science.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vomSaal FS, Welshons WV et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 2012 33 378–455.
- Wakui S, Shirai M, Motohashi M, Mutou T, Oyama N, Wempe MF, Takahashi H, Inomata T, Ikegami M, Endou H, Asari M. Effects of in Utero Exposure to Di(n-butyl) Phthalate for Estrogen Receptors α , β , and Androgen Receptor of Leydig Cell on Rats. *Toxicol Pathol*. 2013 Sep 25;42(5):877-887.
- Wang L, Hao J, Hu J, Pu J, Lü Z, Zhao L, Wang Q, Yu Q, Wang Y, Li G. Protective effects of ginsenosides against Bisphenol A-induced cytotoxicity in 15P-1 Sertoli cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling and antioxidant mechanisms. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jul;111(1):42-9. Epub 2012 Feb 14.
- Weber, J. E., L. D. Russell, et al. (1983). "Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships." *Am J Anat* 167(2): 163-79.
- Willems A, Batlouni S R, Esnal A, Swinnen J V, Saunders P T K, Sharpe R M, França L R, De Gendt K, Verhoeven G. Selective Ablation of the Androgen Receptor in Mouse Sertoli Cells Affects Sertoli Cell Maturation, Barrier Formation and Cytoskeletal Development. *PLoS One*. 2010; 5(11): e14168. Published online 2010 November 30.
- Xiao X, Mruk DD, Tang EI, Wong CK, Lee WM, John CM, Turek PJ, Silvestrini B, Cheng CY. Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Hum Reprod*. 2014 Jun;29(6):1279-91. Epub 2014 Feb 13.
- Younglai EV, Foster WG, Hughes EG, Trim K & Jarrell JF. Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002 43 121–126.
- Zhou QH, Chen X, Leng L, Zhang JS, Tang NJ. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on testosterone secretion and insulin-like factor 3 expression of Leydig tumor cells in mice. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2013 Feb;31(2):83-7.

Figure legends

Figure 1 – Confocal Z-stack of a double immunofluorescence experiment of Hsec Sertoli cells in culture. Cells were fixed, permeabilized, blocked and then treated with a rabbit anti-N-cadherin primary antibody (clone ab12221, Abcam[®] Inc., Cambridge, MA, USA) followed by goat anti-rabbit secondary antibody (IgG) conjugated to red fluorescent Rodamina (Anti-rabbit IgG-R, SC-2091, Santa Cruz[®] Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The specimen was counterstained for nuclei with Fluoroshield[™] with DAPI (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), a blue fluorescent DNA probe. Image was recorded with a 40x oil immersion objective in confocal microscope.

Figure 2 – Western blot for proteins Occludin and β -actin in the experimental groups treated with monobutyl phthalate and bisphenol A for 6 and 48 hours from the protein extracts of cell cultures (each band representing a pool with samples of three cell cultures). The graphs represent the relative expression of integrated optical density for Occludin protein normalized by β -actin expressed as mean $\pm$ SEM. The asterisk represents a statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Figure 3 - Western blot for proteins N-cadherin and β -actin in the experimental groups treated with monobutyl phthalate and bisphenol A for 6 and 48 hours from the protein extracts of cell cultures (each band representing a pool with samples of three cell cultures). The graphs represent the relative expression of integrated optical density for N-cadherin protein normalized by β -actin expressed as mean $\pm$ SEM. The asterisk represents a statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Figure 4 - Western blot for proteins β -catenin and β -actin in the experimental groups treated with monobutyl phthalate and bisphenol A for 6 and 48 hours from the protein extracts of cell cultures (each band representing a pool with samples of three cell cultures). The graphs represent the relative expression of integrated optical density for β -catenin protein normalized by β -actin expressed as mean $\pm$ SEM. The asterisk represents a statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Figure 5 - Western blot for proteins Androgen Receptor and β -actin in the experimental groups treated with monobutyl phthalate and bisphenol A for 6 and 48 hours from the protein extracts of cell cultures (each band representing a pool with samples of three cell cultures). The graphs represent the relative expression of integrated optical density for Androgen Receptor protein normalized by β -actin expressed as mean $\pm$ SEM. The asterisk represents a statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Figures

Figure 1

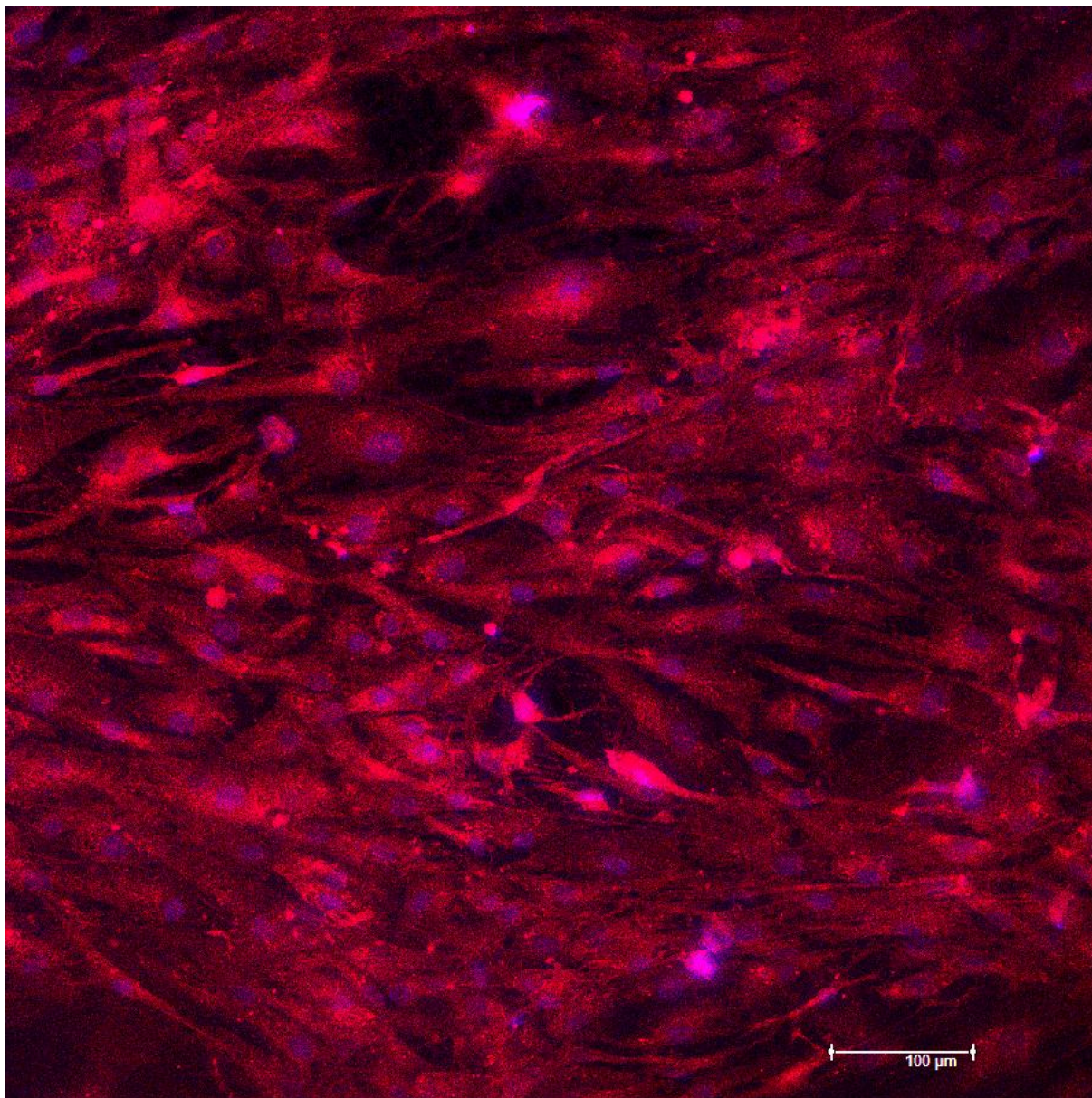


Figure 2

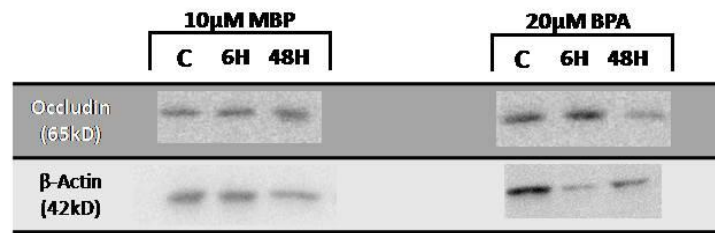
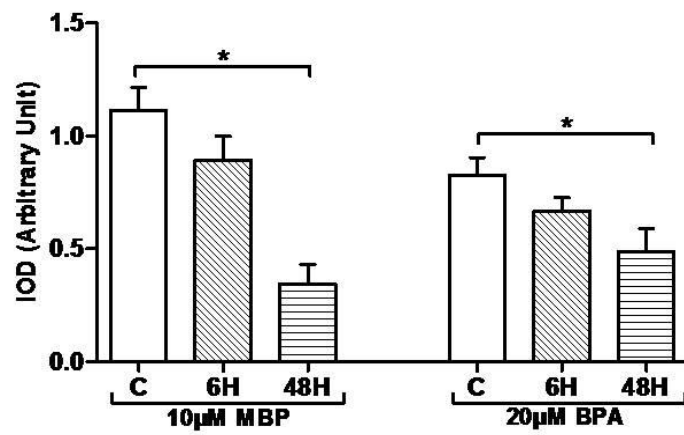
**Occludin/β-actin**

Figure 3

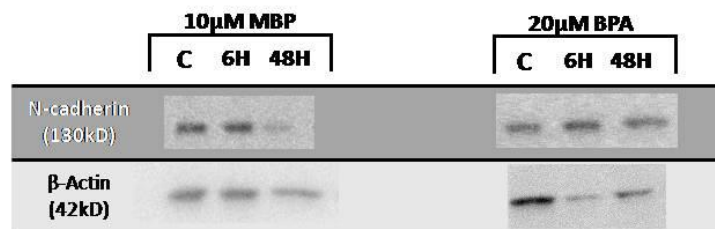
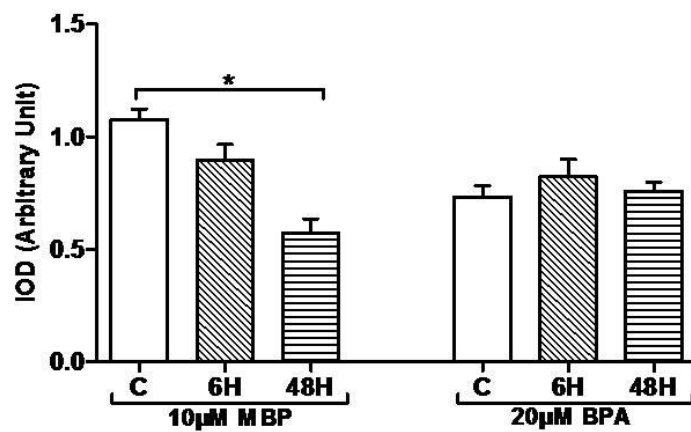
**N-cadherin/β-actin**

Figure 4

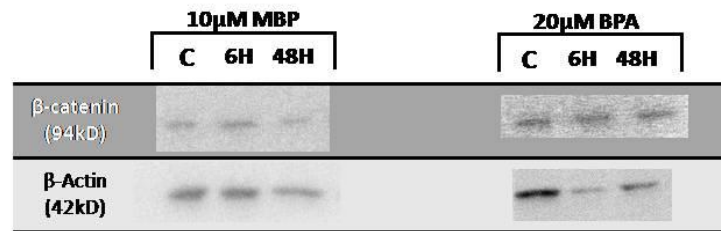
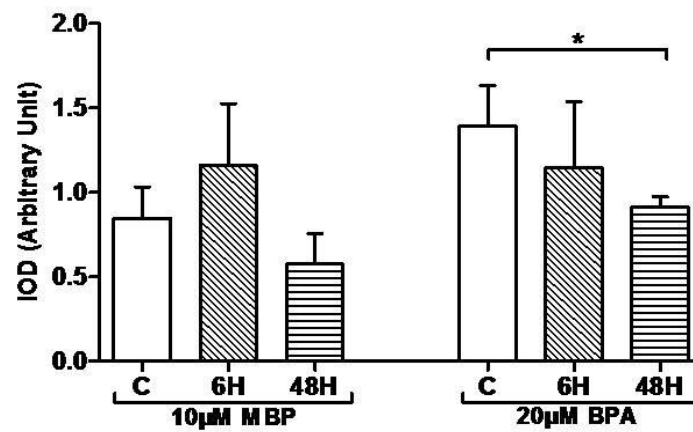
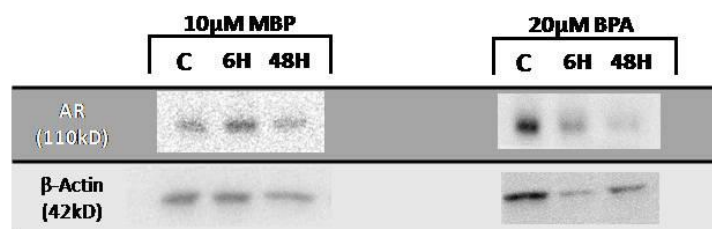
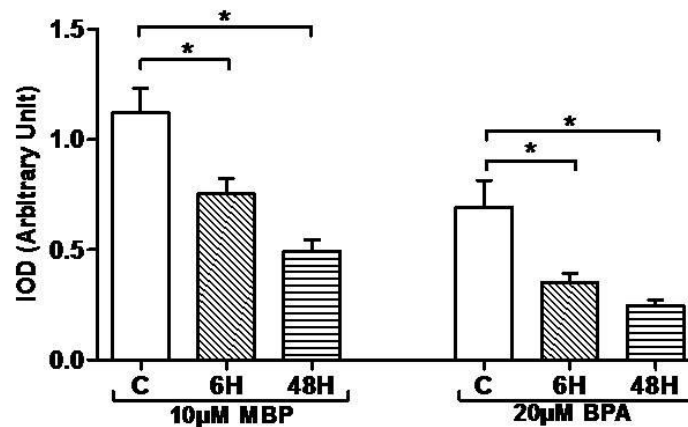
**β-catenin/β-actin**

Figure 5

**Androgen Receptor/β-actin**

CONCLUSÃO GERAL

Utilizando a linhagem HSec de células de Sertoli humanas como modelo experimental conclui-se que:

1. Os dois agentes estudados, Monobutil Ftalato e Bisfenol A, foram capazes de reduzir a expressão de proteínas integrais da barreira, responsáveis por sua aderência e manutenção do ambiente de imunoprivilégio.
2. Tanto o MBP quanto o BPA, mostraram capacidade de interferir com a modulação da dinâmica da barreira hematotesticular reduzindo a expressão do receptor de andrógeno nos dois períodos de exposição estudados.
3. Sendo assim, considerando a importância da barreira hematotesticular para a manutenção da fertilidade masculina, ambos os desreguladores, nas condições experimentais adotadas, apresentam potencial para reduzir a fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auharek SA and de Franc,a LR (2010) Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J micemade transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat* 216:577–588.
- Barlow S¹, Kavlock RJ, Moore JA, Schantz SL, Sheehan DM, Shuey DL, Lary JM. Teratology Society Public Affairs Committee position paper: developmental toxicity of endocrine disruptors to humans. *Teratology*. 1999 Dec;60(6):365-75.
- Bernhard, D. et al., 2003. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer letters*, 195(2), pp.193–9.
- Berridge, M. V & Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), pp.474–82.
- Boivin, J., L. Bunting, et al. (2007). "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." *Hum Reprod* 22(6): 1506-12.
- Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray Jr LE, Hayward SW, Lees PSJ, et al. Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:157–395.
- Cheng CY, et al. (2011) Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis* 1:105–115;
- Cheng CY, Lie PPY, Wong EWP, Mruk DD, Silvestrini B. Adjudin disrupts spermatogenesis via the action of some unlikely partners: Eps8, Arp2/3 complex, drebrin E, PAR6 and 14-3-3. *permatogenesis* 2011; 1:291-7; PMID:22332112;
- Cheng CY, et al. Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis*. 2011 Jan-Mar; 1(1): 2–13.
- Cheng Y C, Mruk D D. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev*. 2012 January; 64(1): 16–64.
- Cheng Y C, Mruk D D. Actin binding proteins and spermiogenesis: Some unexpected findings. *Spermatogenesis*. 2011 Apr-Jun; 1(2): 99–104.
- Cheng Y A, Lie P P Y, Mok K, Cheng Y, Wong E W P, Mannu J, Mathur P P, Yan H H N, Mruk D D. Interactions of laminin $\beta 3$ fragment with $\beta 1$ -integrin receptor: A revisit of the apical ectoplasmic specialization-blood-testis-barrier-hemidesmosome functional axis in the testis. *Spermatogenesis*. 2011 Jul-Sep; 1(3): 174–185. Published online 2011 July 1.
- Chu DP¹, Tian S, Sun DG, Hao CJ, Xia HF, Ma X. Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of pr eimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(8):1174-84..
- Chui K, Trivedi A, Cheng CY, Cherbavaz DB, Dazin PF, Huynh AL, Mitchell JB, Rabinovich GA, Noble-Haeusslein LJ, John CM. Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplant*. 2011;20(5):619-35. Epub 2010 Nov 5.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Le'cureuil C, et al. (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *ProcNatl Acad Sci USA* 101:1327–1332
- Defamie N, Mograbi B, Roger C, et al. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1537–42.
- Desdoits-Lethimonier C, Albert O, Le Bizec B, Perdu E, Zalko D, Courant F, Lesné L, Guillé F, Dejucq-Rainsford N, Jégou B. Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum Reprod*. 2012 May;27(5):1451-9.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC: Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009 Jun;30(4):293-342.
- Diamanti-Kandarakis E, Palioura E, Kandarakis SA & Koutsilieris M. The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. *Hormone and Metabolic Research* 2010 42 543–552.

- Edwards, T. M. and J. P. Myers (2008). "Environmental exposures and gene regulation in disease etiology." *Cien Saude Colet* 13(1): 269-81.
- Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*. 2004 May;18(3):413-21.
- Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol*. 2011;677:459-70.
- Flickinger C and Fawcett DW (1967) The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat Rec* 158:207–221
- Foster PMD, Foster JR, Cook MW. Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1982;63:120–32.
- Foster WG, Neal MS, Han MS & Dominguez MM. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 2008 11 162–176.
- Franca LR, Auharek SA, Hess RA, Dufour JM, and Hinton BT (2011). Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers, in *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers* (Cheng CY ed) pp in press, Landes Bioscience, Austin, TX.
- Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, and Francavilla S (2007) Naturally occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci* 12:2890–2911.
- Frederiksen H¹, Aksglaede L, Sorensen K, Skakkebaek NE, Juul A, Andersson AM. Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environ Res*. 2011 Jul;111(5):656-63. Epub 2011 Mar 22.
- Griswold, M. D. (1998). "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis." *Semin Cell Dev Biol* 9(4): 411-6.
- Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 2007;13(3):209–23.
- Hu Y, Li D, Lu Y, Han X. Monobutyl phthalate induces the expression change of G-Protein-Coupled Receptor 30 in rat testicular Sertoli cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51(1):18-24.
- Izumi Y, Yamaguchi K, Ishikawa T, Ando M, Chiba K, Hashimoto H, Shiotani M, Fujisawa M. Molecular changes induced by bisphenol-A in rat Sertoli cell culture. *Syst Biol Reprod Med*. 2011 Oct;57(5):228-32. Epub 2011 May 16.
- Kamel, R. M. (2010) "Management of the infertile couple: an evidence-based protocol." *Reprod Biol Endocrinol* 8: 21.
- Kavlock, RJ, Daston, GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996 Aug;104 Suppl 4:715-40.
- Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup Health* 2004;46(1):1–19.
- Li LH. In vitro culture method. In: Ding XC, Jiang XZ, Gu ZW, editors. *Male reproductive toxicology*. Beijing: Chinese Population Publishing House; 1997. p. 78–82.
- Li W M M, Mruk DD, Lee W M, Cheng C Y. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 November.
- Li, M. W. M., Xia, W., Mruk, D. D., Wang, C. Q. F., Yan, H. H. N., Siu, M. K. Y., Lui, W. Y., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2006) Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J. Endocrinol*. 190,313-329
- Li, D., Hu Y., Shen, X., Dai, X., Han X. (2010) Combined effects of two environmental endocrine disruptors nonyl phenol and di-n-butyl phthalate on rat Sertoli cells in vitro. *Reproductive Toxicology*.
- Lie PPY, Cheng CY, Mruk DD. Interleukin-1 α is a regulator of the blood-testis barrier. *FASEB J* 2011; 25:1244-53; PMID:21191089;

- Lie PP, Cheng CY, and Mruk DD (2011a) The biology of the desmosome-like junction: A versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* 286:223–269.
- Lie PP, Mruk DD, Lee WM, and Cheng CY (2010c) Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1581–1592.
- Linlin Su C, Cheng Y, Mruk DD. Adjudin-mediated Sertoli-germ cell junction disassembly affects Sertoli cell barrier function in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 November; 42(11): 1864–1875.
- Linlin Su C, Mruk DD, Lee W M, Cheng C Y. Differential effects of testosterone and TGF- β 3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood-testis barrier. *Exp Cell Res*. 2010 October 15; 316(17): 2945–2960.
- Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2003 Apr;68(4):1087-97. Epub 2002 Oct 31.
- McAninch, J. W.; E. A. Tanagha (2010). *Urologia Geral de Smith*. 17^a ed. Lange.
- Meinhardt A& Hedger MP 2010 Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod*. 2010 May;84(5):851-8.. Epub 2011 Jan 5.
- Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*. 2000 Sep;32(4-5):239-46.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), pp.55–63.
- Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2004). "Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis." *Endocr Rev* 25(5): 747-806.
- Mruk DD, Cheng CY. Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 May 27;365(1546):1621-35.
- Mok KW, Mruk DD, Silvestrini B, Cheng CY. rpS6 Regulates blood-testis barrier dynamics by affecting F-actin organization and protein recruitment. *Endocrinology*. 2012 Oct;153(10):5036-48. Epub 2012 Sep 4.
- Newbold RR, Jefferson WN & Padilla-Banks E. Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives* 2009 117 879–885.
- Phillips BT, Gassei K, and Orwig KE (2010) Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1663–1678.
- Richburg JH, Johnson KJ, Schoenfeld HA, Meistrich ML, Dix DJ. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol Lett* 2002;135:167–83.
- Ribeiro MA, dos Reis MB, de Moraes LN, Briton-Jones C, Rainho CA, Scarano WR. Defining suitable reference genes for RT-qPCR analysis on human sertoli cells after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure. *Mol Biol Rep*. 2014 Nov;41(11):7063-6. Epub 2014 Jul 31.
- Rubin BS (2011) Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: 27–34.
- Russell L (1977c) Observations on rat Sertoli ectoplasmic („junctional“) specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 9:475–498.
- Samplaski, M. K., A. Agarwal, et al. (2010) "New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests." *Int J Urol* 17(10): 839-47.
- Salian S, Doshi T, Vanage G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of Sertoli cell junctional protein in the testis. *Toxicology*. 2009 Nov 9;265(1-2):56-67. Epub 2009 Sep 25.
- Selawry HP and Cameron DF (1993) Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. *Cell Transplant* 2:123–129.
- Sikka SC & Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian Journal of Andrology* 2008 10 134–145.

- Skinner, M.K. (2005) "Sertoli cell secreted regulatory factors". In *Sertoli Cell Biology*, 107–120. Eds MK Skinner & MD Griswold. San Diego: Elsevier Science.
- Su L, Mruk DD, Cheng CY. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol*. 2011 Mar;208(3):207-23. Epub 2010 Dec 6.
- Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol* 2004;67:373–81.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009;30:75–95.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 2012 33 378–455.
- Wakui S, Shirai M, Motohashi M, Mutou T, Oyama N, Wempe MF, Takahashi H, Inomata T, Ikegami M, Endou H, Asari M. Effects of in Utero Exposure to Di(n-butyl) Phthalate for Estrogen Receptors α , β , and Androgen Receptor of Leydig Cell on Rats. *Toxicol Pathol*. 2013 Sep 25;42(5):877-887.
- Walker, W.H., J. Cheng (2005). "FSH and testosterone signaling in Sertoli cells." *Reproduction* 130(1): 15-28.
- Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, and Chang C (2009) Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 30:119–132.
- Wang L, Hao J, Hu J, Pu J, Lü Z, Zhao L, Wang Q, Yu Q, Wang Y, Li G. Protective effects of ginsenosides against Bisphenol A-induced cytotoxicity in 15P-1 Sertoli cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling and antioxidant mechanisms. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jul;111(1):42-9. Epub 2012 Feb 14.
- Weber, J. E., L. D. Russell, et al. (1983). "Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships." *Am J Anat* 167(2): 163-79.
- Wei C, Ding S, You H, Zhang Y, Wang Y, Yang X, Yuan J. (2011). An Immunoassay for Dibutyl Phthalate Based on Direct Hapten Linkage to the Polystyrene Surface of Microtiter Plates. *PLoS One*. 2011; 6(12): e29196. Published online 2011 December 27.
- Willems A, Batlouni S R, Esnal A, Swinnen J V, Saunders P T K, Sharpe R M, França L R, De Gendt K, Verhoeven G. Selective Ablation of the Androgen Receptor in Mouse Sertoli Cells Affects Sertoli Cell Maturation, Barrier Formation and Cytoskeletal Development. *PLoS One*. 2010; 5(11): e14168. Published online 2010 November 30.
- Wong WY, Zielhuis GA, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. New evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110(1):49–54.
- Xia, W., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2006) Differential interactions between TGF- β 3/T β R1, TAB1 and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. *J. Biol. Chem*. 281,16799-16813
- Xiao X, Mruk DD, Tang EI, Wong CK, Lee WM, John CM, Turek PJ, Silvestrini B, Cheng CY. Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Hum Reprod*. 2014 Jun;29(6):1279-91. Epub 2014 Feb 13.
- Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod*. 2010 Mar;82(3):516-27.
- Yan HH and Cheng CY (2005) Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11722–11727.
- Yan H H N, Mruk D D, Lee W M, Cheng C Y. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines *via* their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J*. Author manuscript; available in PMC 2010 January 12. Published in final edited form as: *FASEB J*. 2008 June; 22(6): 1945–1959. Published online 2008 January 11.
- Yang Hu, Dong-Mei Li, Xiao-Dong Han. Analysis of combined effects of nonylphenol and Monobutyl phthalate on rat Sertoli cells applying two mathematical models. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 457–463

- Yang L (2010) TGF β , a potent regulator of tumor microenvironment and hostimmune response, implication for therapy. *Curr Mol Med* 10:374–380.
- Younglai EV, Foster WG, Hughes EG, Trim K & Jarrell JF. Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002 43 121–126.
- Zhou QH, Chen X, Leng L, Zhang JS, Tang NJ. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on testosterone secretion and insulin-like factor 3 expression of Leydig tumor cells in mice. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2013 Feb;31(2):83-7.