

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - FISIOLOGIA**

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DO CHÁ VERDE E
SUAS CATECINAS PURAS SOBRE A PRODUÇÃO DE
TESTOSTERONA PELAS CÉLULAS DE LEYDIG DE
RATO *IN VITRO***

MARINA DE SOUZA FIGUEIROA

**RECIFE
2008**

MARINA DE SOUZA FIGUEIROA

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DO CHÁ VERDE E
SUAS CATECINAS PURAS SOBRE A PRODUÇÃO DE
TESTOSTERONA PELAS CÉLULAS DE LEYDIG DE
RATO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Biológicas –
área de concentração Fisiologia – da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos pré-requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em
Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Inês Wanderley

Co-orientador: Prof^o Dr. Daniel Pedro Udrisar

RECIFE
2008

Figueiroa, Marina de Souza

Efeito do extrato aquoso do chá verde e suas catequinas puras sobre a produção de testosterona pelas células de Leydig de rato in vitro / Marina de Souza Figueiroa. – Recife : O Autor, 2008.

73 folhas. II: graf ., fig. e tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas- Fisiologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Chá Verde. 2. Testosterona. 3. Células de Leydig. 4. PKA. 5. PKC. I. Título.

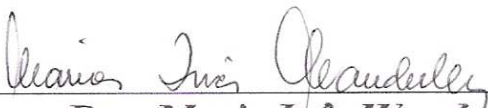
**615.322
615.321**

**CDU (2. ed)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCS2008-Bib**

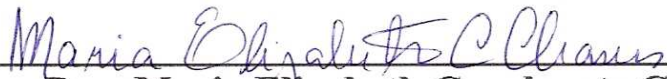
MARINA DE SOUZA FIGUEIROA

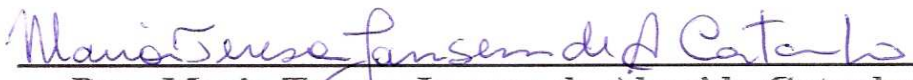
Efeito do extrato aquoso do chá verde e suas catequinas puras sobre a produção de testosterona pelas células de Leydig de rato *in vitro*

ORIENTADORA: 
Dra. Maria Inês Wanderley

BANCA EXAMINADORA:


Dr. Fabiano Ferreira


Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves


Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Recife, 04 de Novembro de 2008.

*Dedico este trabalho à minha família: minha mãe, meu pai, meu irmão
e, em especial, à Paulo Henrique Pimentel pelo amor, incentivo
e apoio constantes durante toda a sua realização.*

AGRADECIMENTOS

Considerando este trabalho como resultado de uma caminhada que não começou na UFPE, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco de injustiças, agradeço de antemão a todas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção desta dissertação.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na execução deste estudo:

À meus pais, Lúcia e José Figueiroa, pessoas que sempre foram exemplos de amor, união, coragem, determinação e sucesso; agradeço pelo carinho e força que me dão e por estarmos sempre juntos nos momentos mais importantes da minha vida! Amo vocês!

Ao meu amado noivo Paulo, que tantas vezes enfrentou o meu cansaço e ansiedade e com seu bom humor incansável me fez sorrir nos momentos mais difíceis. Obrigada amor!

À minha orientadora professora Inês, que tornou possível a realização deste trabalho, agradeço pelo apoio e encorajamento contínuos na pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos, pelo acolhimento no laboratório, pela confiança e amizade em mim depositadas, pelos conselhos e conversas compridas em dias de experimento e, principalmente, pelo exemplo de conduta ética, moral e científica.

Ao meu co-orientador e professor Daniel, que busca sempre instigar a reflexão e crítica dos seus alunos frente às diversas questões da sociedade, pelos conselhos e palavras reconfortantes nas horas de ansiedade e insegurança, e, principalmente, pelo exemplo de pessoa sensível e humana. Obrigada pelas inúmeras discussões e reflexões sobre o mundo interior que muito me engrandeceram como pessoa!

À minha amiga-irmã Cláudia Soares que, com muito carinho, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Muito obrigada por tudo amiga!

Ao querido amigo e professor Mallison Vasconcelos, que me acompanha desde a graduação e cuja amizade, incentivo e discussões foram valiosas tanto nas questões acadêmicas quanto no meu amadurecimento como pessoa.

Aos amigos Lauro, Juliany e Carine Wiesiolek pelo convívio, pelas dicas e pela amizade, essenciais no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos Maurício Matos, Solange Barbosa e Cinthia Vasconcelos, e aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, não só pela amizade, mas também pelas facilidades oferecidas durante minha jornada, pelo incentivo e apoio constantes. Vocês representaram, para mim, união em momentos importantes!

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
E que valeu a pena!”
(Mário Quintana)*

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos agudos do extrato aquoso do chá verde (GTE) e dos seus constituintes polifenóis (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) e (-)-epicatequina (EC) sobre a produção de testosterona basal e estimulada, em células de Leydig de ratos *in vitro*. Células de Leydig purificadas foram incubadas por 3 horas com GTE, EGCG ou EC e com o precursor da testosterona androstenediona, na presença ou ausência de ativadores da proteína quinase A (PKA) e da proteína quinase C (PKC). O GTE e a EGCG, mas não a EC, inibiram ambas as produções de testosterona, basal e quinase-estimuladas. Células pré-tratadas por 15 minutos com GTE ou EGCG e recuperadas por 1 hora foram submetidas a tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio liberador de gonadotrofinas (LHRH), 22OHColesterol ou androstenediona. Nestas condições o efeito inibitório do GTE/EGCG em suas maiores concentrações utilizadas (69,2 e 100 µg/mL, respectivamente) sob a produção de testosterona estimulada por hCG/LHRH ou 22OHColesterol se manteve, enquanto que a produção de testosterona estimulada pela androstenediona retornou para os níveis do controle, indicando que o efeito inibitório sob a função da enzima 17β-hidroxidesidrogenase (17β-HSD) foi reversível. Nestas mesmas condições de pré-tratamento, porém utilizando menores concentrações de GTE/EGCG (13,8 e 20 µg/mL, respectivamente) observou-se que o efeito inibitório destes polifenóis sobre a produção de testosterona estimulada pelo 22OHColesterol foi revertida e até excedeu os níveis do controle, indicando que o efeito inibitório dos polifenóis sob a função da enzima de clivagem da cadeia lateral (P450_{scc}) em mitocôndrias foi reversível. Conclui-se que os efeitos inibitórios do GTE podem ser explicados, pelo menos em parte, pela ação da EGCG, seu principal componente, e que a presença do grupo galato em sua estrutura parece ser importante para sua alta eficácia na inibição da síntese de testosterona. Os mecanismos envolvidos nos efeitos do GTE e da EGCG são provavelmente diversos e envolvem a inibição das cascatas de sinalização da PKA/PKC, assim como a inibição da função das enzimas P450_{scc} e 17β-HSD.

Palavras chave: Polifenóis do chá verde; Testosterona; Células de Leydig; PKA; PKC

ABSTRACT

This study investigated the acute effects of green tea extract (GTE) and its polyphenol constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-epicatechin (EC) on basal and stimulated testosterone production by rat Leydig cells *in vitro*. Purified Leydig cells were incubated for 3 h with GTE, EGCG or EC and the testosterone precursor androstenedione, in the presence or absence of either protein kinase A (PKA) or protein kinase C (PKC) activators. GTE and EGCG, but not EC, inhibited both basal and kinase-stimulated testosterone production. Cells pretreated for 15 min with GTE or EGCG and allowed to recover for 1 hr were challenged with human chorionic gonadotropin (hCG), luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), 22(R)-hydroxycholesterol or androstenedione. Under these conditions the inhibitory effect of GTE/EGCG at the higher concentration used (69,2 and 100 µg/mL, respectively) on hCG/LHRH-stimulated or 22(R)-hydroxycholesterol-induced testosterone production was maintained whereas androstenedione-supported testosterone production returned to control levels, indicating that the inhibitory effect on 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) function was reversible. At the same pretreatment conditions but using lower concentration of GTE/EGCG (13,8 and 20 µg/mL, respectively) the inhibitory effect of these polyphenols on 22(R)-hydroxycholesterol-supported testosterone production was reverted to and even exceeded the control levels, indicating that the inhibitory effect of polyphenols on the mitochondrial P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}) function was reversible. We conclude that the inhibitory effects of GTE may be explained, at least in part, by its principal component EGCG and that the presence of a gallate group in its structure seems important to its high efficacy in inhibiting testosterone production. The mechanisms underlying the effects of GTE and EGCG are probably diverse and involve the inhibition of the PKA/PKC signaling pathways, as well as the inhibition of the regulation of P450_{scc} and 17β-HSD function.

Key Words: Green tea polyphenols; Testosterone; Leydig cells; PKA; PKC

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GTE: Extrato aquoso do chá verde
EGCG: Epigallocatecina-3-galato
EGC: Epigallocatecina
EC: Epicatecina
ECG: Epicatecina-3-galato
OH: Hidroxila
PKC: Proteína quinase C
PKA: Proteína quinase A
PI 3-quinase: Fosfoinositídeo 3-quinase
Akt/PKB: Akt/proteína quinase B
MAP-quinase: Proteína quinase ativada por mitógeno
P-60: Polifenona-60
P450_{scc}: Enzima de clivagem da cadeia lateral
3 β -HSD: Δ^5 -3 β -Hidroxidesidrogenase
StAR: Proteína reguladora aguda da esteroidogênese
GnRH / LHRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas
LH: Hormônio Luteinizante
ATP: Adenosina trifosfato
AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina
DAG: Diacilglicerol
hCG: Gonadotrofina coriônica humana
AC: Adenilato ciclase
PPI: Fosfoinositídeo
PLC β : Fosfolipase C beta
PC: Fosfatidilcolina
PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
IP₃: 1,4,5-trifosfato
OS: Fosfatidilserina
AA: Ácido aracdônico

PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

CSCC: Sistema enzimático de clivagem da cadeia lateral do colesterol

Ca⁺²: Cálcio

RE: Retículo Endoplasmático Liso

17 α -OH-IASE: 17 α -hidroxilase

P450_{17 α} : C₁₇₋₂₀-Liase

17 β -HSD: 17 β -hidroxidesidrogenase

BSA: Albumina sérica bovina

PBS: Tampão fosfato-salina

NaHCO₃: Bicarbonato de Sódio

KCl: Cloreto de potássio

NaCl: Cloreto de sódio

PDBu: Forbol 12,13-dibutirato

PPO: 2,5-diphenyl-oxazole

dbcAMP: N⁶,2'-O-dibutiriladenosina-3':5'-monofosfato cíclico

Meio 199: Meio de cultura 199

POPOP: 2,2'-p-phenylen-bis (5-phenyloxazol)

CaCl₂: Cloreto de cálcio

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

Na₂HPO₄.7H₂O: Fosfato de sódio dibásico

NaH₂PO₄.H₂O: Fosfato de sódio monobásico

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazólio

DMSO: Dimetilsufóxido

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Anatomia dos Testículos e Funções das Células de Leydig	18
1.2 Vias de Transdução do Sinal Hormonal na Síntese de Testosterona nas Células de Leydig	19
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Reagentes	26
3.3 Obtenção do Extrato Aquoso do Chá Verde (GTE).....	27
3.4 Obtenção e Purificação das Células de Leydig.....	27
3.5 Secreção de Testosterona <i>in vitro</i>	28
3.6 Viabilidade Celular	29
3.7 Radioimunoensaio da Testosterona.....	30
3.8 Tratamento Estatístico.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
 Green tea polyphenols affect testosterone production in rat Leydig cells... ..	46
Abstract... ..	47
Introduction.....	48
Material and Methods... ..	49
Material... ..	49
Green tea extract (GTE) preparation.....	50
Animals and Leydig cell-enriched preparation... ..	50
Cell Viability.....	51
<i>In vitro</i> testosterone secretion... ..	52
RIA and statistical analysis... ..	53

Results.....	54
Discussion.....	57
References.....	61
Legends.....	65
CONCLUSÕES... ..	73

1. INTRODUÇÃO

Após a água, o chá é considerado a bebida popular mais consumida em todo o mundo. Derivado da planta *Camellia sinensis*, é consumido em variadas partes do globo em suas três formas básicas: chá verde, chá preto e chá “*oolong*” (Wu et al., 2004). Da quantidade total de chá produzido e consumido no mundo, 78% é de chá preto, 20% é de chá verde e < 2% é de chá “*oolong*”. Historicamente o chá verde é o mais consumido no Japão, China e Índia, tendo seu consumo, feito parte da cultura destes países nos últimos 5.000 anos (Mukhtar & Ahmad, 2000; Crespy & Williamson, 2004). Recentemente, este chá tem atraído bastante atenção dos pesquisadores e de toda comunidade consumidora de chá ao redor do mundo, uma vez que benefícios em uma variedade enorme de patologias, que variam desde cânceres até perda de peso corporal, têm sido relacionados ao seu consumo (Zaveri, 2006).

Os três tipos básicos de chá são processados de maneiras diferentes após a sua colheita (Graham, 1992). O principal objetivo na produção do chá verde é a preservação das catequinas das folhas em suas formas monoméricas; sendo este chá constituído de folhas frescas colhidas de diferentes partes da planta *Camellia sinensis*, submetidas à vapor e, posteriormente secas para prevenir a fermentação e a oxidação dos componentes polifenóis. Já o chá preto passa por diversas etapas de processamento, dentre elas a de fermentação, que consiste, na verdade, de uma oxidação enzimática dos flavanóis a compostos poliméricos denominados teaflavinas, grupo característico deste tipo de chá, e tearubiginas. O chá “*oolong*” é um produto parcialmente oxidado que contém uma mistura de polifenóis monoméricos e uma grande quantidade de teaflavinas (Mukhtar & Ahmad, 2000; Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006; Zaveri, 2006).

Segundo Liu (2003), os polifenóis fazem parte dos fitoquímicos que são compostos bioativos presentes nas frutas, vegetais e grãos. Os fitoquímicos classificam-se em carotenóides, fenólicos, alcalóides, compostos contendo nitrogênio e compostos organo-sulfúricos, conforme esquema exposto na Figura 1.

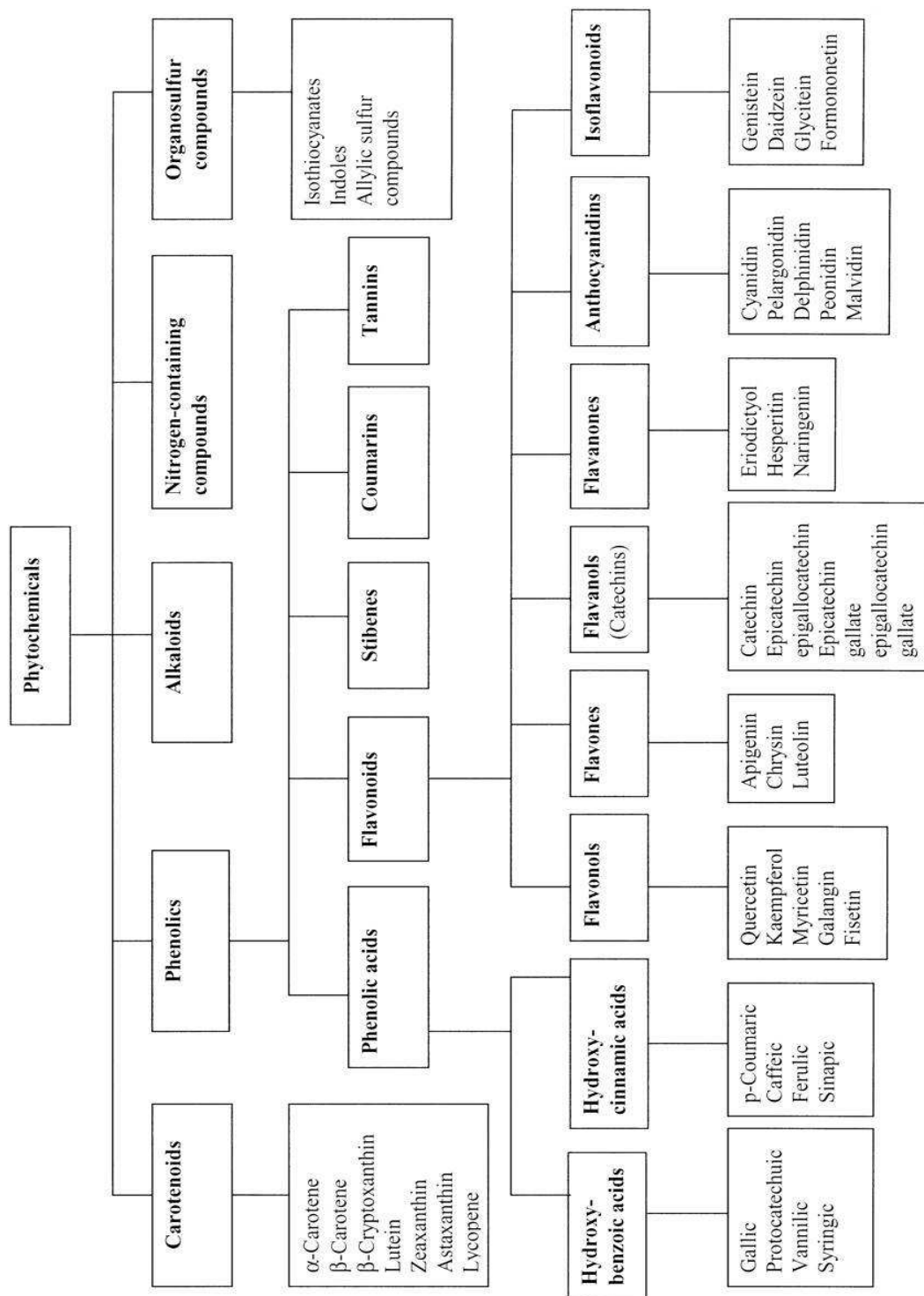


Figura 1: Classificação dos Fitoquímicos. Extraída de Liu RH. Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr. 2004; 134: 3479-3485.

Os compostos fenólicos, bastante estudados, possuem um ou mais anel aromático com um ou mais grupo hidroxila acoplado em sua estrutura e são categorizados em ácidos fenólicos, flavonóides, “stilbenes”, “coumarins” e taninos. Os flavonóides constituem um grupo dos compostos fenólicos com atividade antioxidante, presentes nas frutas e vegetais, e relacionados com redução do risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas. Mais de 4000 flavonóides diferentes já foram identificados e sua estrutura básica consiste de 2 anéis aromáticos (A e B) ligados por 3 carbonos que estão geralmente num anel heterocíclico C (Figura 2). As diferenças neste anel heterocíclico os classificam em flavonóis, flavones, flavanóis, flavanones, antocianidinas e isoflavonóides. Os flavanóis, por sua vez, são compostos pela catecina, epicatecina, epigallocatecina, epicatecina galato e epigallocatecina galato (Liu, 2004).

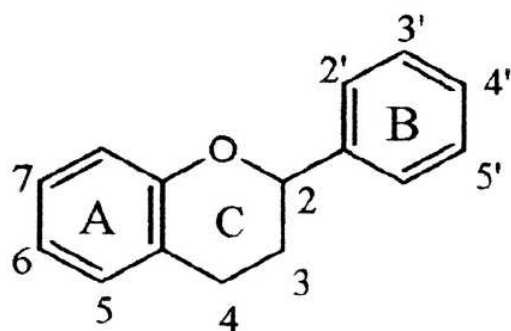


Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides. Extraída de Liu RH. Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr. 2004; 134: 3479-3485.

Entre os vários compostos bioativos, o extrato do chá verde é rico em flavanóis, mais conhecidos como catequinas (30-45%), especialmente a epigallocatecina-3-galato (EGCG), a qual compreende cerca de 65% das catequinas totais (Zaveri, 2006), seguida em percentual pela (-) epigallocatecina (EGC), (-) – epicatecina (EC) e (-) – epicatecina-3-galato (ECG). Também contém 3-4% de cafeína e < 0,2% das outras metilxantinas, teobromina e teofilina. A estrutura simples das catequinas está demonstrada na Figura 3. Dois arranjos são possíveis, porém a maioria das catequinas encontram-se na forma de “epi”catequinas. Quando três grupos hidroxilas estão presentes no anel B da estrutura, a

substância é conhecida como galocatecina. Outra variação é resultado da esterificação do grupo OH no anel pirano (anel C) com ácido gálico. A estrutura das catequinas, galocatequinas e catequinas galato estão ilustradas na Figura 3.

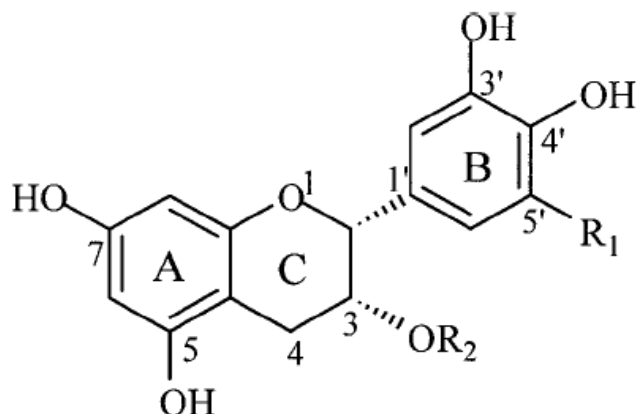


Figura 3: Estrutura básica das catequinas, galocatequinas e catequinas galato. Para EGCG, $R_1 = \text{OH}$ e $R_2 = \text{Grupo Galoil}$; para EGC, $R_1 = \text{OH}$ e $R_2 = \text{H}$; para EC, $R_1 = \text{H}$ e $R_2 = \text{H}$; e para ECG, $R_1 = \text{H}$ e $R_2 = \text{Grupo Galoil}$. Extraída de Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. J. Nutr. 2000; 130: 2409-12.

Já se sabe que a maioria das propriedades medicinais do chá verde estão associadas principalmente com as “*epi*”catequinas e não com as catequinas (Nagle et al., 2006; Zaveri, 2006).

A maioria dos estudos experimentais e epidemiológicos com extratos do chá verde têm focado as atividades cardiovasculares, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e regulatórias de enzimas antioxidantes produzidas pelos polifenóis desse chá (Yang & Wang, 1993; Katiyar et al., 2000). Estudos experimentais em animais utilizando biomarcadores de risco de câncer relatam que o extrato de chá verde ou epigallocatequinas puras protegem contra a carcinogênese química em vários órgãos como intestino, pulmão, fígado, próstata e mama (Gupta et al., 2003; Crespy & Williamson, 2004).

Estudos adicionais sugerem um papel do chá verde e seus constituintes na indução da apoptose, inibição do crescimento celular, interrupção da progressão do ciclo celular, inibição da angiogênese e metástase; e inibição do crescimento do tumor prostático em modelos de animais nos quais o câncer de próstata progride como em humanos (Adhami

et al., 2003). Em outros modelos animais, o consumo crônico das catequinas do chá verde também diminuiu a incidência de artrite induzida pelo colágeno (Haqqi et al., 1999).

Com relação aos componentes puros do chá verde, demonstrou-se que as catequinas inibem a atividade de uma variedade de enzimas, tais como: collagenase, glutathione reductase, glutathione S-transferase hepática e 5 α -reductase tipo 1 (Makimura et al., 1993; Zhang & Das, 1994; Liao & Hiipakka, 1995; Zhang et al., 1997), são potentes antioxidantes e alteram algumas propriedades de células cancerígenas em cultura (Wang et al., 1996; Vinson et al., 2001; Sun et al., 2002; Chu et al., 2002; Adom & Liu, 2002; Adom et al., 2003). Suas ações envolvem também a manutenção de condições fisiológicas ideais para as células, uma vez que as protegem de dano oxidativo sendo mais efetivas do que as vitaminas C e E (Rice-Evans et al., 1995). Em adição ao efeito antioxidante, estudos demonstram uma atuação neuroprotetora das catequinas do chá verde sobre os mecanismos envolvidos com morte e sobrevivência celular no cérebro, em doenças como: Parkinson, Alzheimer, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Mandel et al., 2004; Gouni-Berthold & Sachinidis, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam também um papel protetor das catequinas na neurodegeneração, envolvendo alterações nas moléculas sinalizadoras celulares e nas vias do ciclo celular, ativação de genes importantes para a sobrevivência celular e ativação das funções mitocondriais (Mandel & Youdin, 2004). Esses compostos exercem ainda efeitos modulatórios na célula por meio de ações seletivas em diferentes compostos de várias cascatas de sinalização de proteínas quinase e lipídios quinase, alterando estados de fosforilação de proteínas alvo como proteína quinase C (PKC), tirosina quinase, fosfoinositídeo 3-quinase (PI 3-quinase), Akt/proteína quinase B (Akt/PKB) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAP-quinase), e/ou modulando a expressão gênica dessas proteínas (Williams et al., 2004).

Outros benefícios do chá verde incluem ação bactericida (Stapleton et al., 2004), anti-HIV (Nance & Shearer, 2003), anti-envelhecimento (Espósito et al., 2002) e atividade anti-inflamatória (Dona et al., 2003).

O efeito das catequinas do chá verde no sistema reprodutor masculino já tem sido estudado e demonstrado. Estudos laboratoriais e epidemiológicos sugerem que uma associação entre dieta e níveis de andrógenos pode alterar o risco para câncer de próstata

(Ripple et al., 1997; Clinton & Giovannucci, 1998; Parkin, 2001). Foi demonstrado que injeções parenterais de EGCG por 7 dias foram capazes de suprimir o crescimento de tumores prostáticos e de mama em ratos atímicos (Liao et al., 1995). Em um estudo mais recente, Kao et al. (2000) analisaram os efeitos da EGCG sobre os sistemas endócrinos de ratos adultos e relataram que após 7 dias de injeções parenterais de EGCG observou-se uma redução no peso dos testículos e dos órgãos sexuais acessórios (próstata, vesícula seminal, glândulas prepaciais), assim como, nos níveis circulantes de LH e testosterona em ratos machos intactos. Ainda no mesmo estudo, para determinar se a redução no peso dos órgãos sexuais acessórios era devido a redução, induzida pela EGCG, nos níveis de androgênios, os autores injetaram um grupo de ratos machos com androgênios e/ou EGCG e observaram que não houve redução no peso prostático dos ratos tratados com EGCG mais andrógenos, concluindo, então, que o efeito da catequina do chá verde, EGCG, sobre o peso de órgãos sexuais acessórios masculinos era devido a diminuição dos níveis circulantes de testosterona.

Satoh et al. (2002) estudaram os efeitos da administração oral de um extrato contendo as catequinas do chá verde denominado Polifenona-60 (P-60) em ratos adultos e relataram que após a ingestão oral deste extrato por 2 e 8 semanas os ratos machos apresentaram redução significativa do peso corporal e do peso dos testículos e da próstata, além de apresentarem elevados níveis sanguíneos de LH e testosterona. Os mesmos autores demonstram um efeito inibitório importante da ingestão do extrato sobre a atividade da enzima aromatase causado pela soma das ações dos vários constituintes do P-60, principalmente, pela ação da EGCG a qual é responsável por 60% deste efeito inibitório. Os autores sugerem que a inibição da enzima aromatase pelas catequinas pode ser um dos mecanismos responsáveis pelas alterações endócrinas, elevação dos níveis sanguíneos de LH e testosterona, observadas neste estudo.

Embora o efeito antigonadotrófico das catequinas tenha sido explicado como secundário à redução na ingestão de alimentos (Kao et al., 2000) ou através da inibição da atividade da enzima aromatase nas gônadas de ratos machos (Satoh et al., 2002), um efeito modulatório pode estar presente a nível da esteroidogênese gonadal. Pesquisas recentes demonstram a ação inibitória de outros polifenóis como os isoflavonóides, também chamados de fitoestrógenos, sobre a atividade de enzimas importantes na síntese

de esteróides sexuais. Foi demonstrado que uma dieta rica em fitoestrógenos por 5 semanas é capaz de reduzir o peso corporal e prostático, e os níveis circulantes de testosterona e androstenediona de ratos machos adultos (Weber et al., 2001), isoflavonóides como a genisteína reduz a expressão da enzima de clivagem da cadeia lateral (CYP11A1 ou P450_{scc}) em mitocôndrias de células de Leydig de ratos adultos (Svechnikov et al., 2005) e a daidzeína inibe a atividade da enzima Δ^5 -3 β -Hidroxiesteroido-3-oxo- Δ^5 -steroid-4-en-3- β -ol-5- α -reductase (3 β -HSD) em células adrenais (Ohno et al., 2002); assim como a genisteína e o resveratrol são capazes de inibir a expressão gênica do RNA mensageiro da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (Chen et al., 2007). Entretanto, ainda não existem evidências acerca do efeito direto das catequinas do chá verde sobre a esteroidogênese testicular ou sobre as enzimas envolvidas na produção de andrógenos nessas células.

Já foi bem descrito anteriormente o envolvimento das vias de sinalização da proteína quinase A (PKA) e da PKC na produção de andrógenos nos testículos (Dehejia et al., 1982; Wanderley & Negro-Vilar, 1996; Jo et al., 2005); entretanto não se sabe ainda se as catequinas do chá verde podem modular estas vias. Estudos demonstram que a EGCG e outros flavonóis podem modular a via de sinalização da PKC (Levites et al., 2003) e da PKA (Lorenz et al., 2004) em outros modelos animais.

ANATOMIA DOS TESTÍCULOS E FUNÇÕES DAS CÉLULAS DE LEYDIG

Em todos os mamíferos, os testículos são órgãos pares, ovóides, envoltos pela túnica albugínea e divididos em dois compartimentos funcionais: o tecido intersticial vascularizado e os túbulos seminíferos avasculares. Os túbulos seminíferos são estruturas contorcidas, conectadas em ambas às extremidades à rede testicular e onde ocorre a espermatogênese. Na maioria dos mamíferos os túbulos seminíferos constituem, aproximadamente, 80% do volume do testículo; os 20% remanescentes são compostos de tecido conectivo de apoio, no qual as células de Leydig estão espalhadas. No interior desses túbulos encontram-se as células de Sertoli e as células germinativas em diferentes estágios de maturação. Os espermatozóides são produzidos nos túbulos seminíferos e são

drenados da rede testicular via ductos eferentes para o epidídimo (Christensen, 1975; Odell, 1988; Setchell & Brooks, 1988).

O compartimento intersticial preenche os espaços entre os túbulos seminíferos e contém todos os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, macrófagos, mastócitos e as células de Leydig. Em todas as espécies com sistema linfático extenso, existe abundante líquido intersticial banhando as células de Leydig, vasos sanguíneos e o exterior dos túbulos seminíferos; é através desse líquido que todos os hormônios e nutrientes são transportados do sangue para as células testiculares e entre essas células no interior dos testículos (Fawcett et al., 1973).

As células de Leydig encontram-se, geralmente, agrupadas ao redor dos capilares sanguíneos situados no tecido conectivo, o qual é drenado por vasos linfáticos; e sua principal função é a produção de testosterona e outros hormônios esteróides necessários para a iniciação e manutenção da espermatogênese, desenvolvimento e manutenção da genitália externa e interna, aparecimento das características sexuais secundárias, desenvolvimento do sistema imuno-esquelético e inibição, por retroalimentação, do eixo hipotálamo-hipofisário (Fawcett et al., 1973; Christensen, 1975; Odell, 1988; Setchell & Brooks, 1988).

A função normal do testículo depende das gonadotrofinas hipofisárias e, apesar de já se saber que a regulação da função testicular está predominantemente sob o controle da hipófise, o arranjo anatômico do testículo em dois compartimentos, o tecido intersticial e os túbulos seminíferos, separados pela barreira hemato-testicular, indica uma interação ativa entre as diferentes células testiculares (Saez, 1994).

VIAS DE TRADUÇÃO DO SINAL HORMONAL NA SÍNTESE DE TESTOSTERONA NAS CÉLULAS DE LEYDIG

O controle da produção de esteróides pelas células de Leydig é realizado primariamente pela ação da gonadotrofina hormônio luteinizante (LH), secretado em pulsos de alta atividade biológica pela adenohipófise sob o controle da secreção episódica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LHRH) (Saez, 1994; De Kretser et al., 1995; Evans, 1999).

Há dois sistemas principais de segundo mensageiros que parecem ser os efetores da ação hormonal no testículo: o sistema do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e o sistema do diacilglicerol (DAG) e fosfato de inositol (IP₃) (Steele & Leung, 1992).

O LH estimula a função esteroidogênica da célula de Leydig através da interação com receptores de LH na superfície celular, resultando, principalmente, na estimulação de eventos dependentes de AMPC (Dufau & Catt, 1978). Após a ocupação dos sítios receptores de LH nas células de Leydig pelo LH/Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), vários processos são iniciados na membrana plasmática através de uma proteína ligante de GTP (Proteína G) e que levam à ativação da adenilato ciclase (AC) ligada à membrana (Dufau et al., 1980, 1984; Dufau, 1988; Gore-Langton & Armstrong, 1988; Ascoli & Segaloff, 1989). Esta enzima, por sua vez, catalisa a síntese de AMPC a partir de adenosina trifosfato (ATP) no lado citoplasmático da membrana plasmática (Steele & Leung, 1992).

O AMPC é o segundo mensageiro que media muitas modificações dependentes de hormônio no metabolismo celular. Esta resposta à estimulação hormonal é mediada através de um aumento nos níveis de AMPC o qual, por sua vez, ativa a PKA dependente de AMPC (Rommerts et al., 1974; Marsh, 1975; Cooke et al., 1979; Benninghoff & Thomas, 2006). O AMPC liga-se às subunidades regulatórias da PKA inativa e promove sua dissociação do complexo, dessa forma permitindo o aumento da atividade da subunidade catalítica a qual, então, fosforila uma proteína substrato em um resíduo treonina, iniciando o processo de esteroidogênese estimulado pelo LH (Edelman et al., 1987; Stocco & Clark, 1991; Arakane et al., 1997).

Apesar da regulação da esteroidogênese testicular estar predominantemente sob o controle das gonadotrofinas hipofisárias, outros hormônios e fatores localmente produzidos, dentre eles o LHRH, podem influenciar a diferenciação da célula de Leydig e as ações agudas ou crônicas do LH na esteroidogênese (Dufau, 1988; Steele & Leung, 1992; Saez, 1994). O LHRH estimula um outro sistema de segundo mensageiro envolvido na esteroidogênese no testículo; a via que utiliza a hidrólise de fosfoinosotídeos (PPI's), fosfolipídeos que contêm o açúcar mio-inositol como grupo polar (Berridge & Irvine, 1989).

Os PPI's ou lipídios de inositol, são compostos de um esqueleto de glicerol contendo grupos de ácidos graxos nas posições 1- e 2-, e um grupo fosfato acoplado através de uma ligação fosfodiéster na posição 3- ao mio-inositol (Berridge & Irvine, 1989). A hidrólise desses fosfolipídios ocorre por ação de uma fosfolipase; e no caso dos PPI's atua a fosfolipase C PPI-específica ou PLC PPI-específica, que não hidrolisa outros fosfolipídios, tais como a fosfatidilcolina (PC) (Rhee & Choi, 1992). A fosfolipase C beta (PLC β) faz parte de um sistema de segundo mensageiro extensamente estudado ativado por receptores que se acoplam por meio de interação com proteínas G (Dohlman et al., 1991; Kaziro et al., 1991), e consiste em uma família de enzimas que hidrolizam fosfolipídios na ligação fosfodiéster da posição 3- do esqueleto de glicerol (Rhee & Choi, 1992).

Quando o PIP₂ (fosfadilinositol 4,5-bifosfato) é o substrato, como ocorre na via que leva à produção de testosterona estimulada pelo LHRH, a ação da PLC β leva a formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (1,2-DAG) (Rhee & Choi, 1992; Steele & Leung, 1992; Gershengorn & Perlman, 1995).

O IP₃ pode aumentar a concentração intracelular de Ca⁺² pela mobilização dos estoques no retículo endoplasmático e/ou estimulando o transporte através da membrana plasmática (Berridge, 1984, 1987; Berridge & Irvine, 1989).

O diacilglicerol, em combinação com a fosfatidilserina (OS) e, dependendo do subtipo de isoenzima, com ou sem elevação da concentração intracelular de Ca⁺², ativa a PKC dependente de fosfolipídeo (Nishizuka, 1984), resultando na formação de um complexo quaternário altamente ordenado consistindo da Kinase, o 1,2-DAG, os cofatores Ca⁺² e fosfatidilserina, e o substrato (Hannun & Bell, 1986; Gershengorn & Perlman, 1995). Outros produtos da membrana celular, tais como o ácido aracdônico (AA) e o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) também ativam fisiologicamente a PKC e sinergizam com o 1,2-DAG para ativar a PKC de forma máxima (Liu, 1996).

Nos testículos, a atividade da PKC foi identificada nos túbulos seminíferos e células de Leydig, e está envolvida na regulação destes compartimentos testiculares (Kimura et al., 1984; Galdieri et al., 1986; Nikula et al., 1987), participando na ação do LHRH e seus análogos agonistas na secreção de andrógeno pela célula de Leydig devido a fosforilação e ativação de algumas proteínas implicadas na produção de esteróides

(Nikula & Huhtaniemi, 1988; Steinschneider et al., 1989; Wanderley & Negro-Villar, 1996).

Já se sabe que a PKA e a PKC ativadas, atuam no transporte do colesterol citoplasmático da camada mais externa da mitocôndria para a mais interna, através da ativação da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (Juengel et al., 1995; Arakane et al., 1997; Arakane et al., 1998; Jo et al., 2005). A principal reação enzimática na biossíntese de esteróides é a conversão do colesterol livre em pregnenolona, a qual é catalizada pela enzima de clivagem da cadeia lateral (CYP11A1 ou P450scc). Esta enzima faz parte do sistema enzimático de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CSCC) e se encontra localizada no lado da matriz da membrana interna da mitocôndria (Kahnt et al., 1974; Stocco & Kilgore, 1988; Stocco & Clark, 1996). Entretanto, o passo mais relevante para a realização desta reação, e que controla a esteroidogênese, é o transporte ou transferência do colesterol livre citoplasmático da membrana externa da mitocôndria para a membrana mitocondrial interna, onde a P450scc se encontra (Stocco & Chen, 1991; Stocco & Sodeman, 1991; Stocco & Clark, 1996). Estudos demonstram que esta transferência é mediada pela ativação da proteína StAR (Clark et al., 1994; Luo et al., 1998; Stocco, 2000a,b; Manna et al., 2001; Manna et al., 2006), a qual é sintetizada no citoplasma celular em resposta a ação de hormônios gonadotróficos via AMPc (Juengel et al., 1995; Sugawara et al., 1997). Após sintetizada, a StAR é importada para a superfície externa da mitocôndria, onde interage com alguns componentes desta membrana (proteínas, lipídios e outros fatores), permitindo o transporte facilitado do colesterol citoplasmático da membrana externa para a membrana interna mitocondrial (Kallen et al., 1998; Stocco, 2000b). Uma vez dentro da mitocôndria, o colesterol é convertido à pregnenolona pela ação da P450scc, e esta é transferida para o retículo endoplasmático liso da célula, onde acontecem os passos enzimáticos adicionais da esteroidogênese, que levam à síntese da testosterona (Papadopoulos, 1993; Payne & Hales, 2004; Haider, 2004; Haider, 2007) (Figura 4).

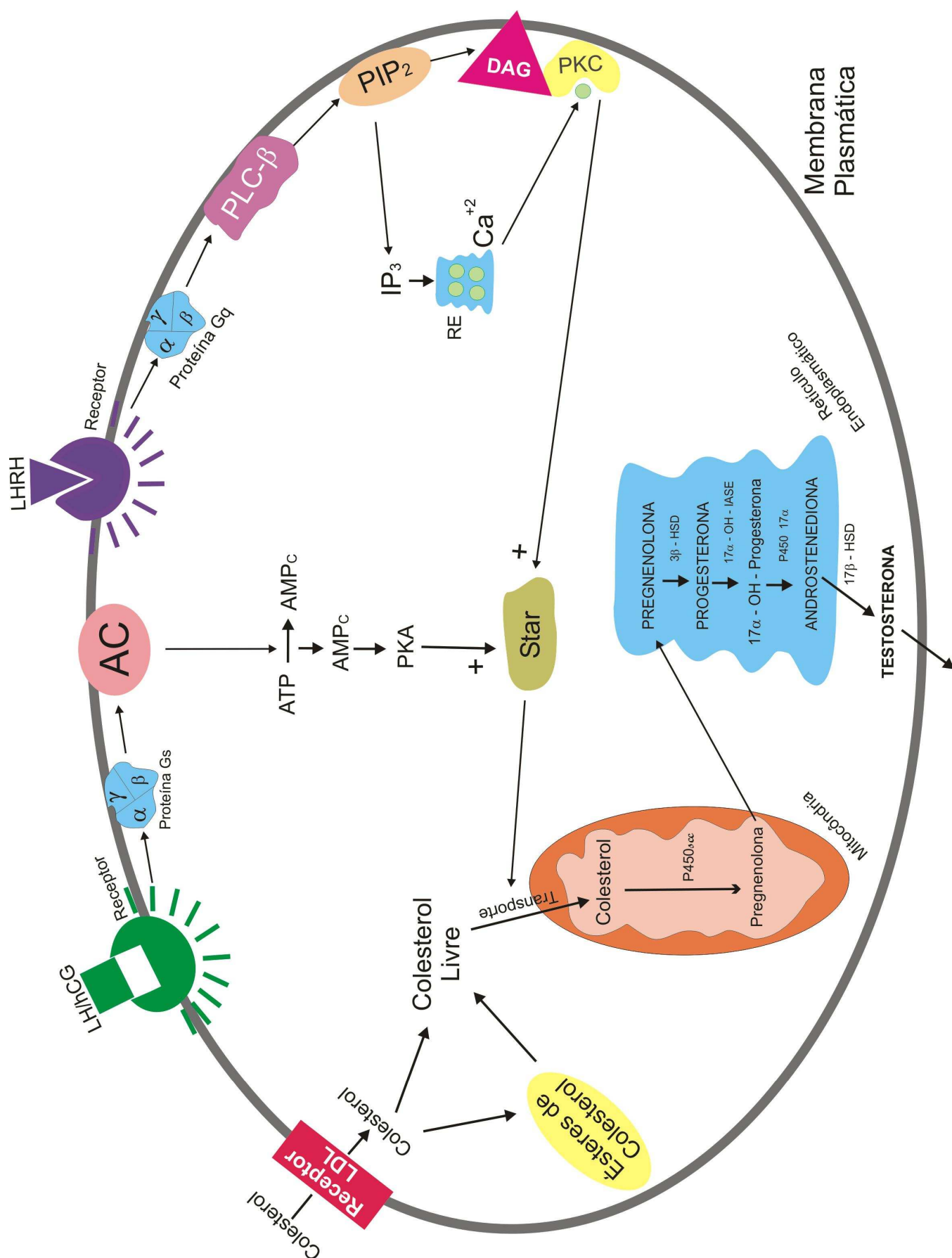


Figura 4: Vias de tradução do sinal hormonal na síntese de testosterona em células de Leydig de rato.

Assim, no retículo endoplasmático liso da célula de Leydig, a pregnenolona é convertida em progesterona pela ação das enzimas Δ^5 -3 β -Hidroxi-desidrogenase (3 β -HSD) e $\Delta^{5,4}$ -isomerase. A progesterona sofre a ação das enzimas 17 α -hidroxilase e C₁₇₋₂₀-Liase (P450_{17 α}) para produzir 17-hidroxiprogesterona (17 α -OH-progesterona) e depois androstenediona; e a androstenediona é, então, convertida a testosterona pela ação da enzima 17 β -hidroxi-desidrogenase (17 β -HSD), concluindo assim a síntese de testosterona testicular (Luo et al., 1996; Payne & Hales, 2004).

Tendo em vista as considerações e os mecanismos anteriormente citados, é de interesse estudarmos a ação modulatória direta das catequinas do chá verde sobre as vias de tradução do sinal envolvidas na esteroidogênese testicular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos agudos do extrato aquoso do chá verde (GTE) e seus constituintes polifenóis (-)-epigallocatecina-3-galato (EGCG) e (-)-epicatecina (EC) sobre a produção de testosterona basal e estimulada, em células de Leydig de ratos *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos agudos do GTE, da EGCG e da EC sobre a produção de testosterona em células de Leydig de ratos *in vitro*, na presença de ativadores diretos e indiretos da PKA e da PKC.
- Estudar os efeitos agudos do GTE, da EGCG e da EC sobre a função das enzimas 17 β -HSD e P450_{scc}, em células de Leydig de ratos *in vitro*.
- Verificar a possível reversibilidade dos efeitos do GTE, da EGCG e da EC sobre a produção de testosterona basal e estimulada, em células de Leydig de ratos *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos machos Wistar (*Ratus norvegicus albinos*) adultos, com aproximadamente 70-80 dias de idade, com pesos entre 200 e 300g foram utilizados nos experimentos. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, recebendo alimentação livre (ração Purina para ratos) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em sala com iluminação controlada (aproximadamente 12 horas de claro e 12 horas de escuro) e temperatura que variava entre 25 e 29°C durante todo o ano.

3.2 Reagentes

Albumina sérica bovina (BSA) Fração V obtida de Miles (Naperville, IL); Ácido tricloroacético (TCA), Álcool etílico P.A., Azida de sódio, Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3), Cloreto de potássio (KCl) e Cloreto de sódio (NaCl) obtidos de VETEC; Azul Tripán, carvão ativado, Colagenase tipo I, Dextran, Ácido etilenoglicol bis (β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), Forbol 12,13-dibutirato (PDBu), Gelatina tipo III, Inibidor da tripsina, Leupeptina, 2,5-diphenyl-oxazole (PPO), Gonadotrofina coriônica humana (hCG), $\text{N}^6,2'$ -O-dibutiriladenosina-3':5'-monofosfato cíclico (dbcAMP), Androstenediona (4-androstene-3,17-dione), EC, EGCG e 22OHColesterol obtidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); Meio de cultura 199 (Meio 199) obtido de GIBCO (Grand Island, NY); 2,2'-p-phenylen-bis (5-phenyloxazol) (POPOP) obtido de MERCK; Percoll obtido de Pharmacia (Uppsala, Sweden); 1,2,6,7 [^3H] Testosterona obtida de Amersham International (Buckinghamshire, England); Hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) obtido de Península (San Carlos, CA); Cloreto de cálcio (CaCl_2), Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Glicerol e Tolueno P.A. obtidos de Reagen, 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazólio (MTT), Dimetilsufóxido (DMSO) e folhas secas de chá verde obtidas em comércio local.

3.3 Obtenção do Extrato Aquoso do Chá Verde (GTE)

As folhas secas de chá verde (5,0g) foram infundidas por 5 minutos em 100mL de água destilada a uma temperatura de 90°C. Essa infusão foi misturada durante 30 minutos por agitação magnética e, em seguida, filtrada; o sobrenadante foi considerado extrato aquoso do chá verde e foi adicionado, em diferentes diluições, diretamente às suspensões de células intersticiais testiculares *in vitro*. Para calcular a concentração do extrato, 10mL do mesmo foi evaporado em um forno (100°C) durante uma noite e depois pesado totalizando 69,2mg. Os extratos aquosos do chá verde foram preparados no dia dos experimentos (Wang et al., 1992).

3.4 Obtenção e purificação das células de Leydig

A obtenção das células intersticiais foi realizada conforme descrito por Hedger e Eddy (1986) modificado por Wanderley e Negro-Villar (1996). Os animais foram sacrificados por anestesia com éter, e os testículos foram rapidamente removidos e cuidadosamente descapsulados. Em seguida, os testículos descapsulados foram incubados em uma solução enzimática (2mL/testículo) contendo collagenase (0,5mg/mL), inibidor de tripsina (0,2mg/mL) e leupeptina (5µg/mL), todos dissolvidos em tampão fosfato-salina (PBS) (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄) contendo albumina sérica bovina (BSA) (1mg/mL). O pH foi ajustado para 7,4 e a incubação durou 20-30 minutos em um banho-maria a 34°C, sob agitação de 90 ciclos/minuto até ocorrer a dispersão dos túbulos em uma massa homogênea. O tecido disperso foi imediatamente diluído à 50mL com PBS/BSA para diminuir o efeito da enzima, os túbulos seminíferos foram sedimentados durante 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado através de malha de nylon (80µm) e lavado com 5mL de PBS/BSA. O filtrado foi centrifugado em tubos plásticos de 50mL a 150xg, 20°C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 5 mL de M199/BSA contendo NaHCO₃ (2,2 mg/mL) e BSA (1mg/mL), com o auxílio de uma pipeta plástica até que nenhum agregado celular fosse visível. Essa suspensão foi cuidadosamente colocada sobre o gradiente de Percoll descontinuo (20%, 35%, 43%,

68% e 90%), em seguida, centrifugada a 800xg durante 30 min a 20°C. Os primeiros 8 mL foram aspirados com seringa de plástico (10 mL) a partir do fundo do tubo – fração contendo as hemácias – e descartados. A fração das células de Leydig (interface 43-68%) foi obtida através da aspiração dos 8 mL seguintes e lavada duas vezes com M199 contendo 0,1% de BSA e ressuspensas em M199/0,1%BSA. Em seguida as células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer. O número de células a serem incubadas foi determinado previamente em $0,35 \times 10^6$ células/0,5mL de meio de incubação. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

3.5 Secreção de testosterona *in vitro*

As preparações de células intersticiais testiculares, enriquecidas ou não em células de Leydig ($0,35 \times 10^6$ células/0,5mL) foram incubadas por 3 horas com M199, com extrato aquoso do chá verde (6,92 – 692,0 µg/mL), EGCG (5-200 µg/mL) ou EC (200 µg/mL), sem (produção basal de testosterona) ou com hCG (1mUI/mL), dbcAMP (1mM), LHRH (10^{-7} M), PDBu (200nM) ou androstenediona (1-100µM). As incubações foram realizadas logo após a obtenção da suspensão celular, a 34°C sob atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, em banho-maria tipo Dubnoff com agitação de 60 ciclos por minuto. Para determinarmos a reversibilidade dos efeitos do GTE e da EGCG sobre a síntese de testosterona, as células também foram pré-incubadas por 15 minutos com M199, GTE ou EGCG, depois lavadas com M199, recuperadas por 60 minutos e incubadas novamente por 2hs com hCG (0,5mUI/mL), LHRH (10^{-7} M), androstenediona (10µM) ou 22OHColesterol (20µM). Após o término das incubações, as células foram precipitadas por centrifugação (150xg por 15min) a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para posterior determinação da testosterona por radioimunoensaio (RIA).

3.6 Viabilidade Celular

Para avaliar os efeitos do GTE e da EGCG sobre a viabilidade celular, os métodos do critério de exclusão do corante azul tripan e redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazólio (MTT) foram utilizados. O critério de exclusão do corante azul tripan e a redução do MTT são métodos muito utilizados para mensurar a integridade da membrana plasmática e a funcionalidade da mitocôndria, respectivamente.

O teste de exclusão pelo corante azul tripan foi realizado após incubação das células por 3 horas com diferentes doses de EGCG (10, 50 e 100µg/mL) e GTE (69,2µg/mL). As células foram incubadas com o corante azul tripan (0,5%) por 20 minutos e a percentagem de células azuis, indicando a entrada do corante pela ruptura da membrana plasmática dessas células, foi contada. Considerou-se normal a viabilidade celular quando 90-95% das células não coravam. A leitura das células foi realizada na câmara de Neubauer.

O método do MTT é baseado na redução do corante tetrazólio amarelo e solúvel em um composto cristalizado azul escuro (púrpura) e insolúvel, denominado formazan. Apenas células vivas, com a mitocôndria intacta e ativa, são capazes de converter o MTT em formazan (Mosmann, 1983). Para o teste do MTT, células de Leydig ($0,35 \times 10^6$ células/mL) foram incubadas com GTE (69,2µg/mL) ou EGCG (10, 50 e 100µg/mL) por 2 horas a 34°C sob atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, em banho-maria tipo Dubnoff com agitação de 60 ciclos por minuto. Após este período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com M199 com o objetivo de remover todo o GTE e a EGCG e depois foram ressuspensas em M199 (100µL). Este procedimento evita a reação direta entre os polifenóis e o MTT, uma vez que já se sabe que estas substâncias são capazes de reduzir o MTT na ausência de células vivas e os resultados obtidos poderiam não refletir a real viabilidade celular durante o teste para determinação dos efeitos dos polifenóis sobre as células (Peng *et al.*, 2005). Assim, 25 µL de MTT em PBS (5mg/mL) foram adicionados à suspensão de células e seguido por mais 3 horas de incubação a 37°C. Após este tempo, as células foram precipitadas por centrifugação (450xg por 5min). Depois o sobrenadante foi desprezado e 100µL de DMSO foram adicionados a cada tubo por 12 horas para dissolver os cristais de formazan formados. A

leitura da absorbância foi mensurada a 630nm em leitor de ELISA. Múltiplos controles foram incluídos (tubos sem células e com M199, MTT e DMSO (tubos brancos) e tubos com células tratadas com o reagente tóxico saponina (0,1%)).

3.7 Radioimunoensaio da Testosterona

A testosterona foi determinada diretamente no meio de incubação (sem extração). As amostras do meio de incubação foram diluídas e incubadas com anticorpo anti-testosterona e 10.000 cpm de [³H]-testosterona a 4°C, durante 16-18 horas, sendo o volume final da reação de 0,32 mL. O tampão de ensaio utilizado foi o PBS – 0,1% gelatina. O anticorpo anti-testosterona foi desenvolvido em coelhos e produzido no laboratório da Dra. Maria Inês Wanderley (UFPE), e sua diluição final no ensaio foi de 1 : 5.000.

Uma mistura de carvão-dextrano na concentração de 0,625% de carvão e 0,0625 de dextrana foi utilizada para remover a testosterona livre. Os tubos foram centrifugados a 1.300 xg, a 4°C, durante 20 minutos. O traçador ligado ao anticorpo foi lido em 0,4 mL do sobrenadante adicionado a frascos de cintilação contendo 5 mL de solução de cintilação (3 g de PPO + 0,2 g de POPOP + 20 mL de metanol + 980 mL de tolueno). A leitura foi realizada em um contador de cintilação líquida (Liquid Scintillation Analyzer). Foram preparados padrões de testosterona de 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 pg/tubo e dosados em triplicata. A testosterona das amostras foi dosada em duplicata.

O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,1% e o coeficiente inter-ensaio foi de 15,1%.

3.8 Tratamento Estatístico

Os dados experimentais foram expressos como média $\pm$ o desvio padrão (média $\pm$ DP) dos valores obtidos para cada grupo estudado em triplicata e representam os resultados obtidos em, pelo menos, 2 experimentos similares.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *teste t de Student* para comparações dos valores basais de cada grupo com os valores dos grupos com as

diferentes concentrações do GTE, EGCG e EC. Os valores de $p < 0,05$ (quando indicado) foram considerados estatisticamente significativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ascoli M, Segaloff DL. On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Endocr Rev.* 1989; 10: 27-44.

Adhami VM, Ahmad N, Mukthar H. Molecular targets for green tea in prostate câncer prevention. *The journal of nutrition.* 2003; 133: 24175-245.

Adom KK & Liu RH. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6182-7.

Adom KK, Sorrells ME, Liu RH. Phytochemicals and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7825-34.

Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF 3rd. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem.* 1997; 272(51): 32656-62.

Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF 3rd. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem.* 1998; 273(26): 16339-45.

Barry RZ, Chen H. Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function during Aging. *Biology of Reproduction.* 2000; 63: 977-81.

Benninghoff AD, Thomas P. Gonadotropin regulation of testosterone production by primary cultured theca and granulose cells of atlantic croaker: I. Novel role of CaMKs and interactions between calcium- and adenylylcicase-dependent pathways. *General and comparative Endocrinology.* 2006; 147: 276-87.

Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal*. 1984; 220: 345-60.

Berridge MJ. Inositol triphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annals New York Academy of Sciences*. 1987; 494: 39-51.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature*. 1989; 341: 197-205.

Clinton SK, Giovannucci E. Diet, nutrition and prostate cancer. *Ann Rev Nutr*. 1998; 18: 413-40.

Chen Y-C, Nagpal ML, Stocco DM, Lin T. Effects of genistein, resveratrol, and quercetin on steroidogenesis and proliferation of MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Journal of Endocrinology*. 2007; 192: 527-37.

Christensen AK. Leydig Cell. In: Greep RO, Astwood EB, Hamilton DW (eds). *Handbook of Physiology*. Washington: American Physiological Society, 1975. Sec. 7, v.5.

Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of vegetables. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50: 6910-6.

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(45): 28314-22.

Cooke BA, Janszen FHA, Van Driel MJA, Van der Molen HJ. Evidence for the involvement of lutropin-independent RNA synthesis in Leydig cell steroidogenesis. *Molecular and cellular Endocrinology*. 1979; 14: 181-9.

Cooke BA, Ashford L, Abayasekara DR, Choi M. The role of chloride ions in the regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells and adrenal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999; 69: 359-65.

Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animals models. *The Journal of Nutrition.* 2004; 134: 34315-405.

Dehejia A, Nozu K, Catt KJ, Dufau ML. Luteinizing hormone receptors and gonadotropic activation of purified rat Leydig cells. *J Biol Chem.* 1982; 257: 13781-86.

De Kretser DM, Risbridger GP, Kerr JB. Basic endocrinology of the testis. In: DeGroot LJ (ed) *Endocrinology*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. v.3. p.2307-35.

Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis and pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology.* 2003; 170: 4335-41.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annual Review of Biochemistry.* 1991; 60: 653-88.

Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in testis and ovary. *Vitamins and Hormones-Advances in Research and Applications.* 1978; 36: 461-600.

Dufau ML, Baukal AJ, Catt KJ. Hormone-induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylate cyclase in the Leydig cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1980; 77: 5837-41.

Dufau ML, Winters CA, Hattori M, Aquilano D, Baranao JLS, Nozu K, Baukal AJ, Catt KJ. Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1984; 20: 161-73.

Dufau ML. Endocrine regulation and communication functions of the Leydig cell. *Annual Review of Physiology*. 1988; 50: 483-508.

Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG. Protein serine/threonine kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 1987; 56: 567-613.

Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*. 2002; 23: 719-35.

Evans JJ. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev*. 1999; 20: 46-67.

Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*. 1973; 9: 500-32.

Galdieri M, Caporale C, Adam S. Calcium-dependent, phospholipid-dependent protein-kinase activity of cultured rat Sertoli cells and its modification by vitamin-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1986; 48: 213-20.

Gershengorn MC, Perlman JH. Second messenger signaling pathways: phosphatidyl inositol and calcium. In: DeGroot LJ (ed) *Endocrinology*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. v. 1. p.66-76.

Graham HN. Green tea composition and polyphenol chemistry. *Prev Med*. 1992; 21: 334-50.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular Steroidogenesis and its control. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York. 1988. p.331-385.

Gouni-Berthold L, Sachinidis A. Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10: 1261-71.

Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003; 410: 177-85.

Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol*. 2004; 233: 181-241.

Haider SG. Leydig Cell Steroidogenesis: Unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology*. 2007; 148 (6): 2581-82.

Haqqi TM, Anthiny DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, Mukhtar H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 4524-29.

Hannum YA, Bell RM. Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261: 9341-47.

Hedger MP, Eddy EM. Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biol Reprod*. 1986; 35: 1309-19.

Jo Y, King SR, Khan SA, Stocco DM. Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- dependent kinase in steroidogenic acute regulatory

protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biology of Reproduction*. 2005; 73: 244-55.

Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology*. 1995; 136(12): 5423-29.

Kahnt FW, Milani A, Steffen H, Nehler R. The rate-limiting step of adrenal steroidogenesis and adenosine 3':5'-monophosphate. *Eur J Biochem*. 1974; 44: 243-50.

Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem*. 1998; 273(41): 26285-88.

Kao Y-H, Hiipakka RH, Liao S. Modulation of endocrine system and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*. 2000; 141: 980-87.

Kaziyo Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1991; 60: 349-400.

Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. Green tea and skin. *Arch Dermatol*. 2000; 136(8): 989-94.

Kimura K, Katoh N, Sakurada K, Kubo S. Phospholipid-sensitive Ca^{+2} -dependent protein-kinase system in testis – localization and endogenous substrates. *Endocrinology*. 1984; 115(6): 2391-99.

Lee S, Miselis R, Rivier C. Anatomical and Functional Evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary. *Endocrinology*. 2002; 143 (11): 4447-54.

Leung PCK, Steele GL. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr. Rev.* 1992; 13: 476-98.

Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.* 2003; 17: 952-54.

Liao S, Hiipakka RA. Selective inhibition of steroid 5 α -reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214: 833-38.

Liao, S, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.* 1995; 96: 239-43.

Liu JP. Protein kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1996; 116: 1-29.

Liu, RH. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr* 2003; 78: 517-520.

Liu, RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 2004; 134: 3479-85.

Lorenz M, Wessle S, Follmann E, Michaelism W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangel V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 6190-95.

Luo L, Chen H, Stocco DM, Zirkin BR. Leydig cell protein synthesis and steroidogenesis in response to acute stimulation by luteinizing hormone in rats. *Biology of Reproduction*. 1998; 59: 263-70.

Luo L, Chen H, Zirkin B. Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? *Journal of Andrology*. 1996; 17(5): 509-15.

Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol*. 1993; 64: 630-36.

Mandel S, Weineb O, Amit T, Youdim MB. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*. 2004; 88: 1555-69.

Mandel S, Youdim MBH. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004; 36: 304-17.

Manna PR, Kero J, Tena-Sempere M, Pakarinen P, Stocco DM, Huhtaniemi IT. Assessment of mechanisms of thyroid hormone action in mouse Leydig cells: Regulation of the Steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenesis, and luteinizing hormone receptor function. *Endocrinology*. 2001; 142(1): 319-31.

Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2006; 37: 81-95.

Marsh JM. The role of cyclic AMP in gonadal function. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. 1975; 6: 137-99.

Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Conteúdo de Miricetina, Quercetina e Kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26 (2): 380-85.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55-63.

Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(suppl): 1698-702.

Nance CL, Shearer WT. Is green tea good for HIV-1 infection? *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2003; 112: 851-53.

Nagle DG, Ferreira D, Zhou Yu-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry.* 2006; 67: 1849-55.

Nikula H, Naor Z, Parvinen M, Huhtaniemi I. Distribution and activation of protein kinase C in the rat testis tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1987; 49: 39-49.

Nikula H, Huhtaniemi I. Gonadotropin-release hormone agonist activates protein kinase C in rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1988; 55: 53-9.

Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984; 308: 693-8.

Odell DW. The Leydig Cell. In: DeGroot LJ (ed) *Endocrinology.* 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1988. v.3, cap.129, p.2137-45.

Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S. Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 80 (3): 355-63.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 533-43.

Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: Biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev.* 1993; 14: 222-40.

Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004; 25: 947-70.

Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005; 45: 108-111.

Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry.* 1992; 267: 12393-96.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research.* 1995; 22(4): 375-83.

Ripple MO, Henry WF, Rago RP, Wilding G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 40-8.

Rommerts FFG, Cooke BA, Van der Molen HJ. The role of cyclic-AMP in regulation of steroid biosynthesis in testis tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1974; 5: 279-85.

Saez JM. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. *Endocrine Reviews.* 1994; 15(5): 574-626.

Satoh K, Sakamoto Y, Ogata A, Nagai F, Mikuriya H, Numazawa M, Yamada K, Aoki N. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 925-33.

Setchell BP, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. v.1. p.753-836.

Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JMT, Taylor PW. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrob. Agents.* 2004; 23(5): 462-7.

Steele GL, Leung PCK. Intragonadal signaling mechanisms in the control of steroid hormone production. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1992; 41(3-8): 515-22.

Steinschneider A, McLean MP, Billheimer JT, Azhar S, Gibori G. Protein kinase C-Catalyzed phosphorylation of sterol carrier protein 2. *Endocrinology.* 1989; 125: 569-71.

Stocco DM, Kilgore MW. Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin. *Biochem J.* 1988; 249: 95-103.

Stocco DM, Clark BJ. The requirement of phosphorylation on a threonine residue in the acute regulation of steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1991; 46: 337-47.

Stocco DM, Chen W. Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology.* 1991; 128: 1918-26.

Stocco DM, Sodeman TC. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem.* 1991; 266(29): 19731-38.

Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* 1996; 17: 221-44.

Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta.* 2000a; 1486: 184-97.

Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology.* 2000b; 164: 247-53.

Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Holt JA, Arakane F, Strauss JF 3rd. Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. *Steroids.* 1997; 62(4): 395-9.

Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and proliferative activities of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 7449-54.

Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand M-L, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Soder O. Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Endocrinology.* 2005; 187: 117-124.

Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods : fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 5315-21.

Wanderley MI, Negro-Vilar A. Pretreatment with phorbol ester and LHRH agonist reduces testosterone production and protein kinase C activity in rat Leydig cells challenged with PDBu and LHRH. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1557-65.

Wang H, Cao GH, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 701-5.

Wang ZY, Huang MT, Ferrara T, Wong CQ, Lou YR, Reuhl K, Latropoulos M, Yang CS, Conney AH. Inhibition effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Res.* 1992; 52: 1162-70.

Weber KS, Setchell KDR, Stocco DM, Lephart ED. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 α -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *Journal of Endocrinology.* 2001; 170: 591-9.

Williams RJ, Spencer JPE, Rive-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical & Medicine.* 2004; 36: 838-49.

Wu L-Y, Juan C-C, Ho L-T, Hsu Y-P, Yung-Pei H, Hwang LS. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 643-8.

Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J. Nutr.* 2000; 130: 2409-12.

Yang CS, Wang ZY. Tea and Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 1038-1049.

Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences* 2006; 78: 2073-80.

Zhang K, Das NP. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 2063-8.

Zhang K, Yang EB, Tang WY, Wong KP, Mack P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54 (9): 1047-53.

Green tea polyphenols affect testosterone production in rat Leydig cells

Marina S. Figueiroa¹, Juliany S. B. César Vieira¹, Disleide S. Leite¹, Ruben C. O. Andrade Filho¹, Patrícia S. Gouveia¹, Daniel P. Udrisar¹ and Maria I. Wanderley¹.

1 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

Correspondence: Maria Inês Wanderley

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Pernambuco

Cidade Universitária

50670-901 Recife, PE, Brasil

Telephone: +55-81-2126-8530

Fax: +55-81-2126-8976

E-mail: ineswanderley@gmail.com

Key words: Green tea polyphenols; Testosterone; Leydig cells; PKA; PKC

Running title: Green tea polyphenols inhibit testosterone *in vitro*

Research Article

Abstract

This study investigated the acute effects of green tea extract (GTE) and its polyphenol constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-epicatechin (EC) on basal and stimulated testosterone production by rat Leydig cells *in vitro*. Purified Leydig cells were incubated for 3 h with GTE, EGCG or EC and the testosterone precursor androstenedione, in the presence or absence of either protein kinase A (PKA) or protein kinase C (PKC) activators. GTE and EGCG, but not EC, inhibited both basal and kinase-stimulated testosterone production. Cells pretreated for 15 min with GTE or EGCG and allowed to recover for 1 hr were challenged with human chorionic gonadotropin (hCG), luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), 22(R)-hydroxycholesterol or androstenedione. Under these conditions the inhibitory effect of GTE/EGCG at the higher concentration used (69.2 and 100 µg/mL, respectively) on hCG/LHRH-stimulated or 22(R)-hydroxycholesterol-induced testosterone production was maintained whereas androstenedione-supported testosterone production returned to control levels, indicating that the inhibitory effect on 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) function was reversible. At the same pretreatment conditions but using lower concentration of GTE/EGCG (13.8 and 20 µg/mL, respectively) the inhibitory effect of these polyphenols on 22(R)-hydroxycholesterol-supported testosterone production was reverted to and even exceeded the control levels, indicating that the inhibitory effect of polyphenols on the mitochondrial P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}) function was reversible. We conclude that the inhibitory effects of GTE may be explained, at least in part, by its principal component EGCG and that the presence of a gallate group in its structure seems important to its high efficacy in inhibiting testosterone production. The mechanisms

underlying the effects of GTE and EGCG are probably diverse and involve the inhibition of the PKA/PKC signaling pathways, as well as the inhibition of the regulation of P450scc and 17 β -HSD function.

Introduction

Green tea (*Camellia sinensis*) is one of the most commonly consumed beverages worldwide. Its active components are reported to have several biological properties, including cancer chemoprevention, inhibition of the growth of tumor cells and antiviral and anti-inflammatory activities (Yang et al. 2000), antioxidant activity (Morel et al. 1993; Guo et al. 1996), and inhibitory effects on several enzymes, such as aromatase (Sato et al. 2002; Goodin and Rosegren 2003), angiotensin converting enzyme (Actis-Goretta et al. 2006) and thyroid peroxidase (Divi and Doerge 1996). Dried leaves of *Camellia sinensis* contain polyphenols (30-36 %), principally flavanols, more commonly known as catechins (Ahmad and Mukhtar 1999). The predominant catechins are epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epicatechin-3 gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) and epicatechin (EC).

The effects of catechins on the male reproductive system have been described. Epidemiological and laboratory studies suggest an association between diet and androgens that can alter prostate cancer risk (Ripple et al. 1997; Clinton and Giovannucci 1998; Parkin 2001; Wang et al. 2003). It has been shown that parenteral injection of EGCG can suppress human prostate and breast tumor growth in athymic mice (Liao et al.

1995) and reduce the weight of testis and accessory reproductive organs, as well the circulating level of LH and testosterone in intact rat (Kao et al. 2000). Although the anti-gonadotropic effect of catechins is explained as a secondary effect of EGCG on food intake (Kao et al. 2000) or on aromatase activity (Satoh et al. 2002; Godin and Rosegren 2003), a modulatory function could be present even at the gonadal level.

Currently there is no evidence for a direct effect of green tea catechins on the testicular steroidogenesis or on the enzymes involved in androgen production. Although the involvement of the protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) signalling pathways on the testicular androgen production is well known (Dehejia et al. 1982; Wanderley and Negro-Vilar 1996), it is not known whether green tea catechins modulate these pathways in Leydig cells. There is evidence that EGCG and others flavonoids can modulate the PKC (Lin 2002; Levites et al. 2003) or PKA signaling pathway in other animal models (Lin 2002; Lorenz et al. 2004). The aim of the present study was to investigate the direct *in vitro* effect of GTE and its purified catechins on the basal and the PKA- or PKC-stimulated testosterone production by rat Leydig cells.

Material and Methods

Material

Hank's balanced salt solution (HBSS) and Medium 199 were obtained from Gibco (Grand Island, NY). Collagenase (Type I), soybean trypsin inhibitor, leupeptin, phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), human chorionic gonadotropin (hCG), N⁶,2'-O-

dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (dbcAMP), EC, EGCG from green tea, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), 22(R)-hydroxycholesterol and 4-androstene-3,17-dione were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Bovine serum albumin (BSA, fraction V) was obtained from Miles (Naperville, IL). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) was purchased from Peninsula (San Carlos, CA). Percoll was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Green tea extract (GTE) preparation

Green tea extract was prepared according to Wang et al. (1992) with slight modifications. Five grams of dry green tea leaves were infused for 5 min in 100 ml of boiling saline water (90°C), allowed to cool to room temperature and then filtered. The resulting clear solution is similar to tea brews consumed by humans. The amount of solid matter present in the 5 % green tea extract was determined to be 6.92 mg per ml by drying samples in an oven (overnight at 100 °C) and weighing the dry residue. The extracts were prepared fresh on a daily basis. This preparation gave approximately 27 % of catechins, 8.0 % of caffeine and 0.4 % of theobromine. EGCG represent $\geq 50\%$ of total catechins (Wang et al.1992).

Animals and Leydig cell-enriched preparation

Adult (70-80 days old) male Wistar rats weighing 200-300g were kept in a controlled environment (temperature, 25-29°C; lights on from 5:00 to 18:00 h) with free access to standard laboratory chow and tap water. Isolation and purification of rat Leydig cell-enriched preparations were performed as described by Hedger and Eddy (1986). The

rats were killed by ether anesthesia and the testes were quickly removed and decapsulated. The decapsulated testes were incubated in an enzyme solution of 0.5 mg/ml collagenase, 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 5 µg/ml leupeptin in Hank's balanced salt containing 0.1% BSA (HBSS/BSA), pH 7.4, in a shaking water bath (20 min, 90 Hz, 34°C). The dispersed testes were suspended in 50 mL (final volume) HBSS/BSA and the dissociated tubules allowed to settle (5 min). The supernatant was filtered and washed with 5 mL HBSS/BSA. The filtered cell suspension was centrifuged (150 x g, 15 min, 20 °C), and the pellet was re-suspended in 5 mL HBSS/BSA and loaded onto the top of a discontinuous Percoll density gradient (20%, 35%, 43%, 68% and 90%) and centrifuged at 800 x g for 30 min at 20 °C.. Cells in the 43-68% interface (specific gravity: 1.0640-1.0960 g/mL) were collected, washed twice with M199 containing 0.1% BSA, and were re-suspended in M199/0.1% BSA and used immediately for the experiments.

Cell viability

To assess the effects of GTE and EGCG on cell viability the trypan blue exclusion and the MTT reduction assays were used. The trypan blue exclusion and the MTT reduction assays are widely used screening methods to measure plasma membrane integrity and an active mitochondrial function respectively. The trypan blue assay was performed after the period of 3 h incubation of cells with the different doses of GTE or EGCG. Cells were incubated with trypan blue (0,5%) for 20 min and the percentage of blue cells, indicating a capture of the colorant due to plasma membrane rupture, were counted. 90-95% of no colored cells was considered normal cell viability. The MTT assay is based on the reduction of a soluble pale yellow tetrazolium dye to water-

insoluble purple formazan crystals in living cells (Mossman, 1983). Cells ($0.3 \times 10^6/\text{mL}$) were incubated with GTE (69.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or EGCG (10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h at 34 °C under 95 % O_2 and 5 % CO_2 . After this time, the cells were washed twice with M199 and incubated for 1 h with M199 in order to remove the GTE/EGCG and then the cells re-suspended in fresh 100 μL M199. This procedure avoid a direct reaction between the polyphenols and the MTT. It is known that polyphenols can reduce MTT without living cells, so that the results obtained may not reflect the true cell viability to determine the effect of polyphenols (Peng et al., 2005). Then, 25 μL of MTT in PBS (5 mg/mL) was added to the cell suspensions followed by 3 h of incubation at 37 °C. After that, the cell suspensions were centrifuged at 400 x g for 5 min. The supernatant was removed, and 100 μL DMSO were added to each tube to dissolve formazan crystals overnight. Absorbance was measured at 630 nm in an ELISA reader. Multiple controls were included (blank tubes (with no cells) into which medium, MTT dye, and DMSO were added or cells treated with the toxic reagent saponin (0.1 %)). The animal care committee of the Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, approved all treatments.

***In vitro* testosterone secretion**

Cells (0.3×10^6 cells/0.5 ml) were treated (incubated) for 3 h with M199, green tea extract (6.92 - 692.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), EGCG (5-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or EC (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence or presence of hCG (1 mIU/ml), dbcAMP (1 mM), LHRH (10^{-7} M), PDBu (200 nM) or androstenedione (1-100 μM) in a shaking water bath (60 Hz, 34°C) under an atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 . It is noteworthy that a cup of green tea extract (100 mL) usually contains 50-150 mg/mL of tea polyphenols (Sakanaka and Okada, 2004). To determine reversibility of the inhibitory effect of GTE and EGCG, the cells were preincubated for

15 min with M199 GTE or EGCG, washed with fresh medium, allowed to recuperate for 60 min, and incubated again for 2 h with 0.5 mUI/ml hCG, 10^{-7} M LHRH, 20 μ M 22-hydroxycholesterol or 10 μ M androstenedione. This 15 min preincubation period was chosen because it was enough to detect the inhibitory effect of GTE or EGCG on testosterone production as that seen in after 3 h incubation (data not shown). At the end of incubation the cells were centrifuged and the supernatant was collected and stored at -20°C until the time for testosterone measurement by RIA.

RIA and statistical analysis

Testosterone was measured directly (without extraction) in the incubation medium by a charcoal-dextran RIA (Niswender et al. 1975) that employs [^3H]-testosterone as tracer and a primary antiserum raised in rabbits in our laboratory against testosterone-3-(0-carboxymethyl)oxime:BSA. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 8.1 % and 15.1 %, respectively. The testosterone antibody showed $<0.1\%$ cross-reactivity with androstenedione, dehydroepiandrosterone, androsterone, 17α -hydroxyprogesterone, β -estradiol or estrone. None of the substances tested interfered with the assays. The data from the different analyses were reported as the mean $\pm$ SEM of triplicate determinations and were representative of results obtained in at least two similar experiments. The data were analyzed statistically using the Student *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

GTE and EGCG inhibit basal and hCG-stimulated testosterone production

The modulatory effect of GTE and its pure constituents (EGCG and EC) was tested by incubating Leydig cell-enriched preparations with GTE or EGCG followed by determination of testosterone levels in the incubation medium. Cells were incubated with various concentrations (three different orders of magnitude) of GTE or EGCG. In Figures 1 and 2, Leydig cells were treated with and without GTE or the catechins EGCG and EC, respectively, in the absence and presence of maximum stimulation by hCG. The extract and the EGCG produced an inhibitory effect on basal and stimulated testosterone production. At 6.92, 69.2 and 692 $\mu\text{g/ml}$, GTE inhibited basal testosterone levels by $27.5 \pm 4.8\%$, $60.5 \pm 3.9\%$ and $93.1 \pm 0.2\%$ respectively, while EGCG at 5, 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$ produced $24.0 \pm 6.7\%$, $37.9 \pm 1.4\%$ and $58.2 \pm 1.4\%$ inhibition, respectively. The inhibitory effect of 6.92, 69.2 and 692 $\mu\text{g/ml}$ GTE on hCG-stimulated testosterone production were $11.2 \pm 6.0\%$, $56.8 \pm 1.5\%$ and $99.4 \pm 0.03\%$ respectively, while the inhibitory effect of 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$ EGCG upon stimulation with hCG was $46.5 \pm 7.8\%$ and $98.8\% \pm 0.06$, respectively. Exposure to EC at 200 $\mu\text{g/ml}$ showed no significant inhibitory effect on basal or stimulated testosterone production. In order to evaluate whether the effect of GTE or EGCG on testosterone production was due to a decrease in cell viability, the trypan blue exclusion and the MTT reduction assays were used. The trypan blue exclusion test for cell viability demonstrated that inhibition was not due to the toxicity of green tea extract *per se* at the concentrations of 6.92 $\mu\text{g/ml}$ or 69.2 $\mu\text{g/ml}$ or due to the toxicity of EGCG *per se* at any concentration used. This test showed that at the

above cited concentrations, the percentages of integral cells obtained after 3 h of incubation were comparable between the green tea extract- or EGCG-treated (91%) cells and the controls (95%). At the maximum concentration of GTE (692 µg/ml), cell viability was 80% of control; this difference (10-15 % less viable cells compared to the control group) could have contributed for the observed decrease in testosterone production. For this reason this concentration wasn't used in further experiments in the present study. When measured by MTT reduction, cell viability was not modified by any concentration of GTE or EGCG used. The two assays for cell viability demonstrated that inhibition of testosterone production was not due to the toxicity of GTE (6.92 µg/ml or 69.2 µg/ml) or EGCG (10-100 µg/mL) *per se*.

GTE and EGCG inhibit testosterone production elicited by activation of PKA and PKC

The action of GTE and EGCG was further investigated in the presence of a direct PKA activator, dbcAMP, and of both an indirect and direct PKC activator, LHRH and PDBu, respectively. Table 1 shows testosterone production in the presence of each maximum stimulus alone or with GTE or EGCG. Testosterone production was reduced completely in all groups (to < 98 % stimulated-respective basal), regardless of the nature of the stimulus.

EGCG inhibits the stimulatory effect of androstenedione on testosterone production

To further evaluate the effect of EGCG, the steroidogenic precursor androstenedione was used to support testosterone production (a measure of 17β-HSD

activity). Androstenedione crosses the cell membrane and moves to the smooth endoplasmic reticulum of Leydig cells where, after binding to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD), it is converted to testosterone. Several doses of androstenedione (1, 5, 10 and 20 μ M) were used. These high concentrations were used to obviate the interference of any endogenous precursor. As shown in Figure 3, EGCG decreased the production of testosterone at all concentrations of the precursor by approximately 50%. No significant inhibitory effect was observed in cells treated with EC.

Effect of pretreatment with GTE or EGCG on hCG- or LHRH-stimulated and androstenedione-supported testosterone production

The aim of this experiment was to examine the reversal of the inhibitory effect exerted by GTE or EGCG on hCG- or LHRH-stimulated and on androstenedione-supported testosterone production. The results shown in Figure 4 demonstrate that pretreatment with GTE followed by 1 h recuperation period induced a 65.3%, 76.1% and 57.7% decrease in the responsiveness to subsequent incubation with M199, stimulation with hCG and LHRH, respectively. The pretreatment with EGCG followed by a similar recuperation period induced a 58.4%, 58.7% and 66.6% decrease in the responsiveness to subsequent incubation with M199, stimulation with hCG or LHRH, respectively. In contrast to the effect observed with hCG or LHRH, the GTE or EGCG pretreatment did not reduce the responsiveness of Leydig cells to androstenedione. Similar results were observed with 15 min recuperation period (data not shown). These results indicate that

the inhibitory effect of GTE or EGCG on the steroidogenic process was reversible only in the androstenedione to testosterone enzymatic step.

The 22(R)-hydroxycholesterol induced testosterone production was examined as well, to further evidence the involvement of the earlier steps (before and after mitochondrial P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc)-catalyzed conversion of cholesterol to pregnenolone) of the steroidogenic process in the GTE/EGCG effect. 22(R)-hydroxycholesterol bypasses all signal transduction pathways and has access directly to mitochondria where it is a substrate for P450scc enzyme (Papadopoulos et al. 1992). The results showed in Figure 4 demonstrate that pretreatment with GTE or EGCG followed by 1 h recuperation period induced a 38.4% and 49.2% decrease in the responsiveness of Leydig cells to subsequent incubation with 22(R)-hydroxycholesterol, respectively. These results evidence that GTE and EGCG also reduce the function of the P450scc enzyme. However, when we pretreated the cells with lower concentration of GTE (13.8 $\mu\text{g/mL}$) or EGCG (20 $\mu\text{g/mL}$) a complete reversion of the inhibitory effect of the polyphenols on the 22(R)-hydroxycholesterol induced testosterone production was observed, and even a stimulatory effect was observed (Table 2).

Discussion

In this study the ability of green tea extract or of individual catechins to inhibit steroidogenesis by rat Leydig cells *in vitro* was examined through the modification of testosterone production. It was found that GTE and EGCG inhibited basal and stimulated testosterone production. This indicates that the effects of GTE or its pure catechin on testis are direct and clearly independent of any effects of the drug on the secretion of

gonadotropin. The concentrations of GTE used in the present study (6.92 and 69.2 $\mu\text{g/mL}$) are within the range of those of pure EGCG (5-100 $\mu\text{g/mL}$). These EGCG concentrations are similar to those used by most of the published *in vitro* tumor cell cytotoxicity studies (4.6 to 458.4 $\mu\text{g/mL}$), the efficacy of inhibition depending on the cell type used (IC_{50} = 10-60 $\mu\text{g/mL}$) (Yang et al. 2000; Nagle et al. 2006). Whereas concentrations higher than 4.6 $\mu\text{g/mL}$ have been referred to decrease cell survival (Yang et al. 2000; Levites et al. 2002; Nagle et al. 2006), the results of the trypan blue and MTT tests in our experimental conditions showed that the reduced testosterone production was not a consequence of a decline in Leydig cell viability. These results were confirmed by the absence of effect of EC (200 $\mu\text{g/mL}$). The absence of an inhibitory effect of EC on testosterone production suggests a structure-activity relationship. Since EGCG and EC only differ structurally from each other by the presence of a gallate group at 3' position, this group seems important for the high efficacy of EGCG in inhibiting testosterone production. This structure-activity relationship has been observed by other authors (Nam et al. 2001; Hiipakka et al. 2002; Doss et al. 2005). Since the inhibition is observed with EGCG, but not with EC, it cannot be caused by the antioxidant properties of these catechins. The activity of EGCG in whole cells indicates that the catechin interacts/crosses the cell membrane. It has been demonstrated that tea catechins interact with lipid bilayers by altering the membrane structure and that the presence of gallic acid esters in the structure of EGCG is responsible for its high affinity with the lipid bilayer and the high amounts incorporated (Hashimoto et al. 1999). Recently, a membrane receptor for EGCG in cancer cells was proposed (Tachibana et al. 2004).

To investigate the mechanisms of the inhibitory effect of GTE or EGCG on stimulated testosterone production, an established *in vitro* model was used based on the ability of hCG/dbcAMP or LHRH/PDBu to stimulate testosterone production via mechanisms involving PKA or PKC pathways activation, respectively (Dehejia et al. 1982; Wanderley and Negro-Vilar 1996). The present data showed that the GTE or EGCG inhibits hCG-, dbcAMP-, LHRH- and PDBu-stimulated testosterone production. These results suggest that GTE or EGCG act directly on Leydig cells to regulate testosterone secretion at the PKA/PKC level and/or at a point distal to the activation of PKA and PKC.

For further study of the effects of EGCG on testosterone production (the end product of the steroidogenic process) the function of the last enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) which converts androstenedione to testosterone, was also examined. To that end, the Leydig cells were incubated with the direct precursor of the last metabolic step, androstenedione. The inhibitory effect of EGCG was detected at all concentrations of androstenedione, indicating that the regulation of the 17 β -HSD is affected by EGCG and contributes to the reduction in the cell's steroidogenic capacity. This effect of GTE or EGCG on the function of the 17 β -HSD appears to be independent of their effects on PKA/PKC signaling pathways or on the transference of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane. This was demonstrated by the reversion of the inhibitory effect of the GTE or EGCG on androstenedione-supported and not on hCG/LHRH-stimulated or 22(R)-hydroxycholesterol-supported testosterone production, after a recuperation period following the pretreatment with the higher concentration of GTE(69.2 μ g/mL) or EGCG(100 μ g/mL) used. It is possible that the

reversibility on androstenedione-supported testosterone production is related to the constitutively expressed high levels of 17 β -HSD (Payne and O'Shaughnessy 1996). On the other side, the results also indicate that the steroidogenic step in the mitochondrial compartment (P450_{scc} function) remained inhibited in this experimental condition. However, after the pretreatment with lower concentration of GTE (13.8 μ g/mL) or EGCG (20 μ g/mL) it was observed reversion of the P450 _{scc} function, suggesting that the effect of inhibition/reversion can be concentration dependent. Several studies have addressed the ability of other subclasses of flavonoids to decrease the activity of a variety of steroidogenic enzymes such as P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{c21}, P450_{11 β} , 3 β -HSD (Wong and Keung 1999; Le Bail et al. 2000; Krazeisen et al. 2001; Ohno et al. 2002; Lacey et al. 2005), aromatase and 17 β HSD (Le Bail et al. 2000; Lacey et al. 2005). Additionally, EGCG has been demonstrated to inhibit ovarian aromatase activity (Goodin and Rosengren 2003) and estradiol and progesterone production by swine granulosa cells (Basini 2005). We can not discard also the possibility of an inhibitory effect of GTE/EGCG on the the regulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR protein) (StAR transcription and/or turnover and binding to cholesterol).

Taken together, the present results show that the GTE, and its major constituent EGCG, inhibit testosterone production by rat Leydig cells *in vitro* and that the inhibitory effects observed with GTE may be explained, at least in part, by the EGCG present in this extract. The results indicate that the mechanisms underlying these effects are probably diverse and involve the inhibition of the PKA/PKC signaling pathways as well the inhibition of the regulation of P450_{scc} and 17 β -HSD activity required for hormone synthesis. The inhibition of the regulation of P450_{scc} activity could explain the observed

inhibitory effect of GTE and EGCG on basal testosterone production, which is maintained after a recuperation period of 1 h.

Finally, the data presented here could explain, at least in part, the decrease in testosterone plasma levels observed in *in vivo* studies with green tea catechins (Kao et al. 2000) and provide insight into the protective effect that the catechins exert in androgen-dependent disorders, such as benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

References

Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I. and Fraga, C.G. (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* **54**: 229-234.

Ahmad, N. and Mukhtar, H. (1999) Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* **57**: 78-83.

Basini, G., Bianco, F. and Grasselli, F. (2005) Epigallocatechin-3-gallate from tea negatively affects swine granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* **28**: 243-256.

Clinton, S.K. and Giovannucci, E. (1998) Diet, nutrition, and prostate cancer. *Ann Rev Nutr* **18**: 413-440.

Dehejia, A., Nozu, K., Catt, K.J. and Dufau, M.L. (1982) Luteinizing hormone receptors and gonadotropic activation of purified rat Leydig cells. *J Biol Chem* **257**: 13781-13786.

Divi, R.L. and Doerge, D.R. (1996) Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol* **9**: 16-23.

Doss, M.X., Potta, S.P., Hescheler, J. and Sachinidis, A. (2005) Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutical target for prevention of proliferative diseases. *J Nutr Biochem* **16**: 259-266.

Goodin, M.G. and Rosegren, R.J. (2003) Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. *Toxicol Sci* **76**: 262-270.

Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W. (1996) Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* **1304**: 210-222.

Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y. and Nahayama, T. (1999) Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosc Biotechnol Biochem* **63**: 2252-2255.

Hedger, M.P. and Eddy E.M. (1986) Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biol Reprod* **35**: 1309-1319.

Hiipakka, R.H., Zhang, H-Z., Dai, W., Dai, Q. and Liao, S. (2002) Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol* **63**: 1165-1176.

Kao, Y-H., Hiipakka, R.H. and Liao, S. (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* **141**: 980-987.

Krazeisen, A., Breitling, R., Möller, G. and Adamski, J. (2001) Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol* **171**: 151-162.

Lacey, M., Bohday, J, Fonseka, S.M.R., Ullah, A.I. and Whitehead, A.S. (2005) Dose-response effects of phytoestrogens on the activity and expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase in human granulosa-luteal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**: 279-86.

Le Bail, J-C., Champavier, Y., Chulia, A-J. and Habrioux, G. (2000) Effect of phytoestrogens on aromatase, 3 β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci* **66**: 1281-1291.

Levites, Y., Amit, T., Mandel, S. and Youdim, M.B.H. (2003) Neuroprotection and neurorescue against A β toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* **17**: 952-954.

Levites, Y., Amit, T., Youdim, M.B.H. and Mandel S. (2002) Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* **277**: 30574-30580.

Liao, S., Umekita, Y., Guo, J., Kokontis, J.M. and Hiipakka, R.A. (1995) Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett* **96**: 239-243.

Lin, J.K. (2002) Cancer chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. *Arch Pharm Res* **25**: 561-571.

Lorenz, M., Wessle, S., Follmann, E., Michaelism W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K. and Stangel, V. (2004) A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-

dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* **279**: 6190-6195.

Morel, L., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P. and Cillard, J. (1993) Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* **45**: 13-19.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Meth* **65**: 55-63.

Nagle, D.G., Ferreira, D. and Zhou, Y-D. (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* **67**: 1849-1855.

Nam, S., Smith, D.M. and Ping Dou, Q. (2001) Ester bound-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **276**: 13322-13330.

Niswender, G.D., Akbar, A.M. and Nett, T.M. (1975) Use of specific antibodies for quantification of steroid hormones. In Academic Press Inc. *Methods in Enzymology* ed. O'Malley, B.W. and Hardman, J.G. New York, pp. 16-34.

Ohno, S., Shinoda, S., Toyoshima, S., Nakazawa, H., Makino, T. and Nakajin, S. (2002) Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**: 355-363.

Papapadopoulos, V., Guarnieri, P., Krueger, K., E., Guidotti, A. and Costa, E. (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5113-5117.

Parkin, D.M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* **2**: 533-543.

Payne, A.H. and O'Shaughnessy, P.J. (1996) Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell. In Cache River Press. *The Leydig cell* ed. Payne, A.H., Hardy, M.P. and Russel, L.D. Vienna, IL pp 259-286.

Peng, L., Wang, B. And Ren, P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **45**: 108-111.

Ripple, M.O., Henry, W. F. and Rago, R.P. (1997). Wilding G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **89**: 40-48.

Sakanaka, S. and Okada, Y. (2004) Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *porphyromonas gingivalis*. *J Agric Food Chem* **52**: 1688-1692.

Satoh, K., Sakamoto, Y., Ogata, A., Nagai, F., Mikuriya, H., Numazawa, M., Yamada, K. and Aoki, N. (2002) Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. *Food Chem Toxicol* **40**: 925-933.

Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. and Yamada, K. (2004) A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 380-381.

Walsh L.P., Webster, D.R. and Stocco, D.M. (2000) Dimethoate inhibits steroidogenesis by disrupting transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Endocrinol* **167**: 253-263.

Wanderley, M.I. and Negro-Vilar, A. (1996) Pretreatment with phorbol ester and LHRH agonist reduces testosterone production and protein kinase C activity in rat Leydig cells challenged with PDBu and LHRH. *Braz J Med Biol Res* **29**: 1557-1565.

Wang, Z-Y., Huang, M-T., Ferraro, T., Wong, C-Q., Lou, Y-R., Reuhl, K., Iatropoulos, M., Yang, C.S. and Conney, A.H. (1992) Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Res* **52**: 1162-1170.

Wong, C.K. and Keung, W.M. (1999) Bovine adrenal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (E.C. 1.1.1.145)/5-ene-4-ene isomerase (E.C. 5.3.3.1): characterization and its inhibition by isoflavones. *J Steroid Biochem Mol Biol* **71**: 191-202.

Yang, C.S., Chung, J.Y., Yang, G., Chhabra, S.K. and Lee, M.J. (2000). Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* **130**: 472S-478S.

Legends

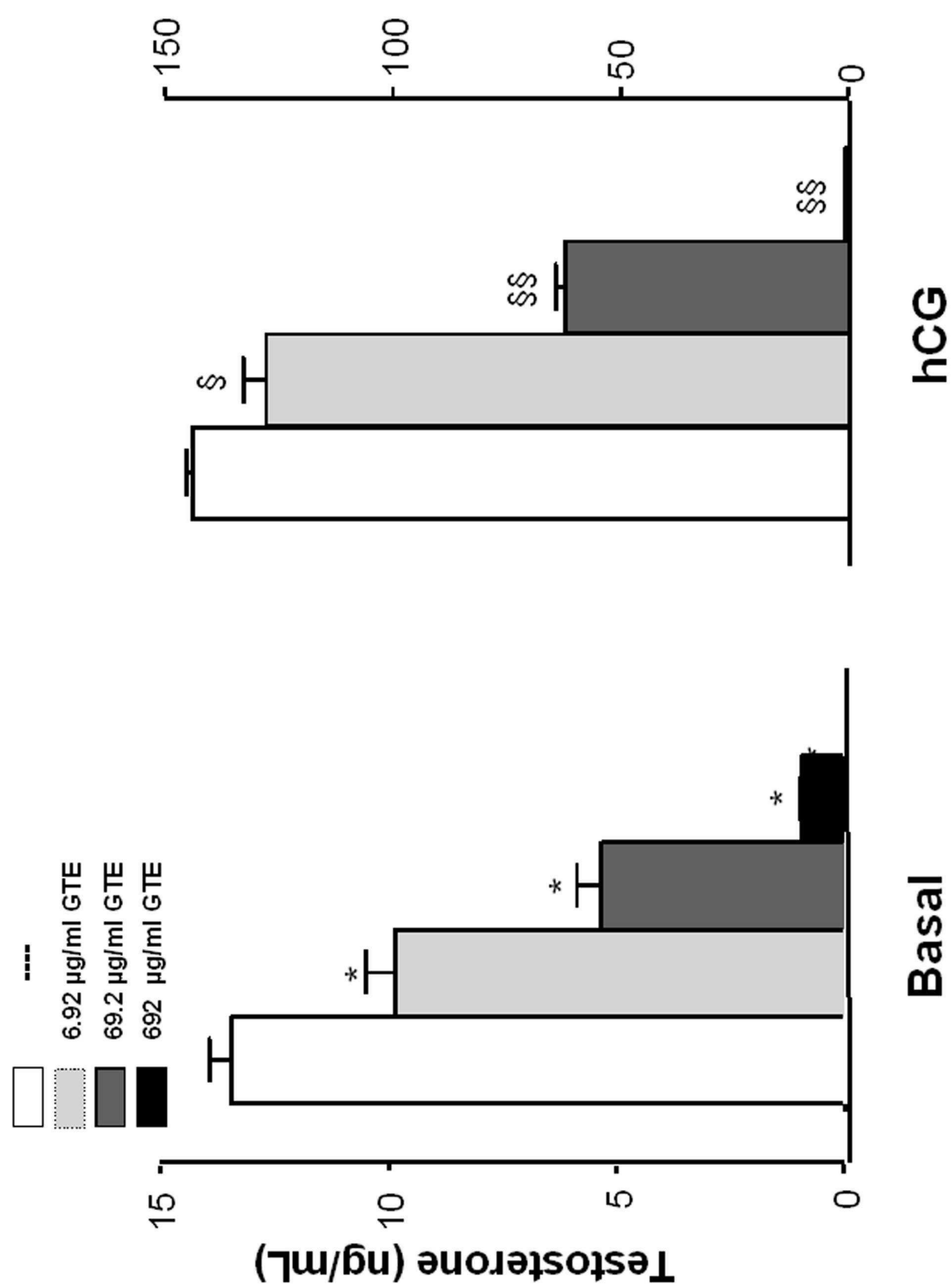
Figure 1. Effect of treatment of Leydig cells with different concentrations of GTE on basal or hCG-induced testosterone production. Leydig cells ($0.3 \times 10^6/0.5$ ml) were incubated for 3 h with hCG (1 mIU/ml) in the presence and absence of 6.92, 69.2 and 692 $\mu\text{g/ml}$ GTE. Results are the mean $\pm$ SEM of three determinations repeated in two different experiments. * $p < 0.0001$ vs basal; $^{\S}p < 0.01$ vs hCG; $^{\S\S}p < 0.0001$ vs hCG.

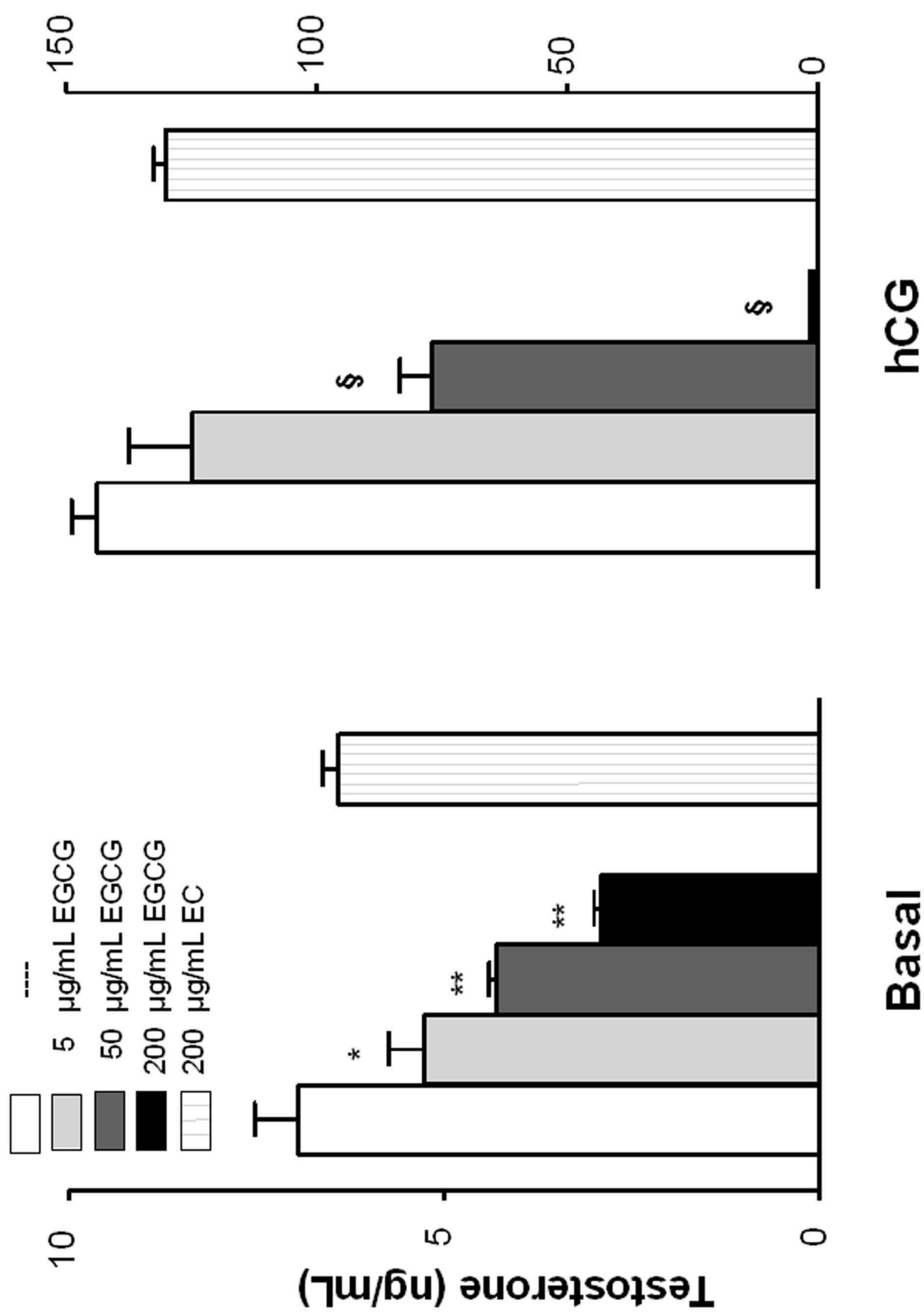
Figure 2. Effect of treatment of Leydig cells with different concentrations of EGCG on basal or hCG-induced testosterone production. Leydig cells ($0.3 \times 10^6/0.5$ ml) were incubated for 3 h with hCG (1 mIU/ml) in the presence and absence of 5, 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$ EGCG or 200 $\mu\text{g/ml}$ EC. Results are the mean $\pm$ SEM of three determinations repeated in two different experiments. * $p < 0.05$ vs basal; ** $p < 0.01$ vs basal; $^{\S}p < 0.001$ vs hCG.

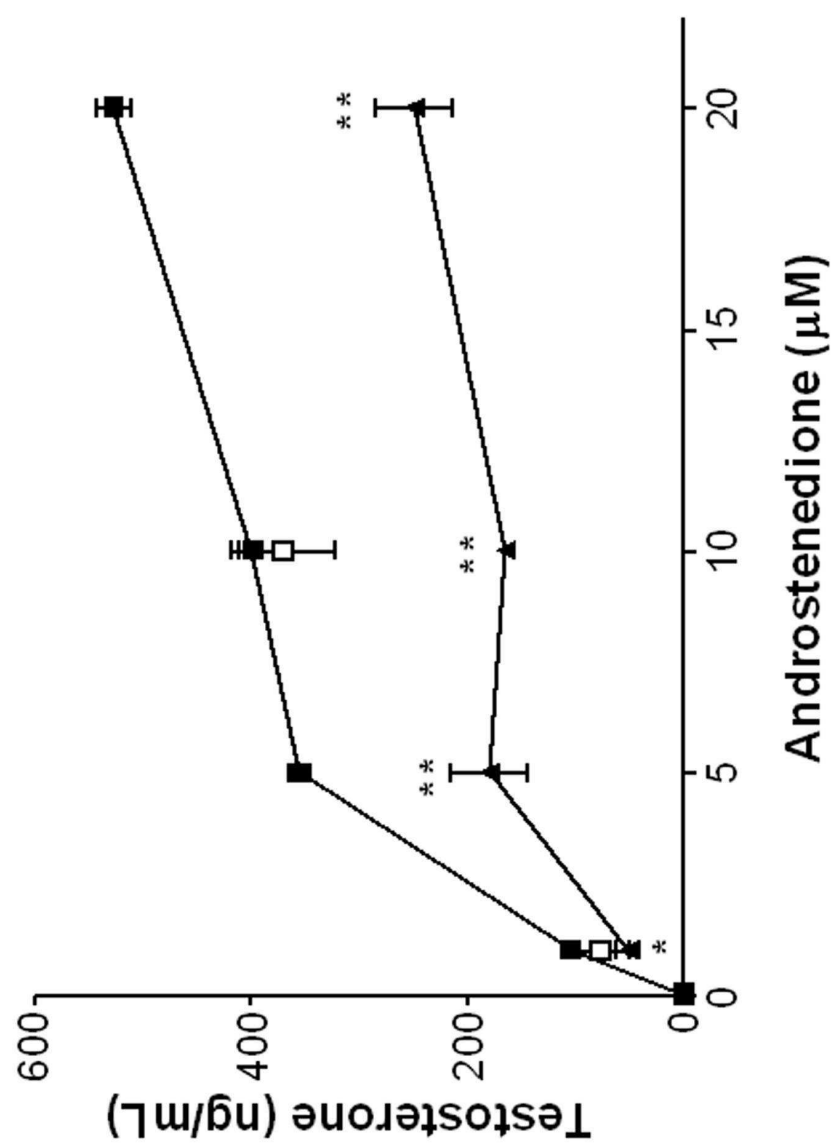
Figure 3. Effect of EGCG on the androstenedione-stimulated testosterone production. Leydig cells ($0.3 \times 10^6/0.5$ ml) were incubated for 3 h with androstenedione (1-20 μM) in the absence (■) and presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ EGCG (▲) or EC (□). Results are the mean $\pm$ SEM of three determinations repeated in two different experiments. * $p < 0.001$ vs respective androstenedione alone; ** $p < 0.0001$ vs respective androstenedione alone.

Figure 4. Effect of 15 min treatment with GTE (69.2 $\mu\text{g/ml}$) or EGCG (100 $\mu\text{g/ml}$) on testosterone production following a 1-h recovery in Leydig cells ($0.3 \times 10^6/0.5$ ml). To determine reversibility, cells were rinsed with fresh M199 and incubated in M199 for 1 h before further challenge with hCG (0.5 mIU/ml), LHRH (0.1 μM), 22(R)-

hydroxicholesterol (20 μM) or androstenedione (10 μM) during 2 h. The data represent the mean $\pm$ SEM of triplicate determinations.







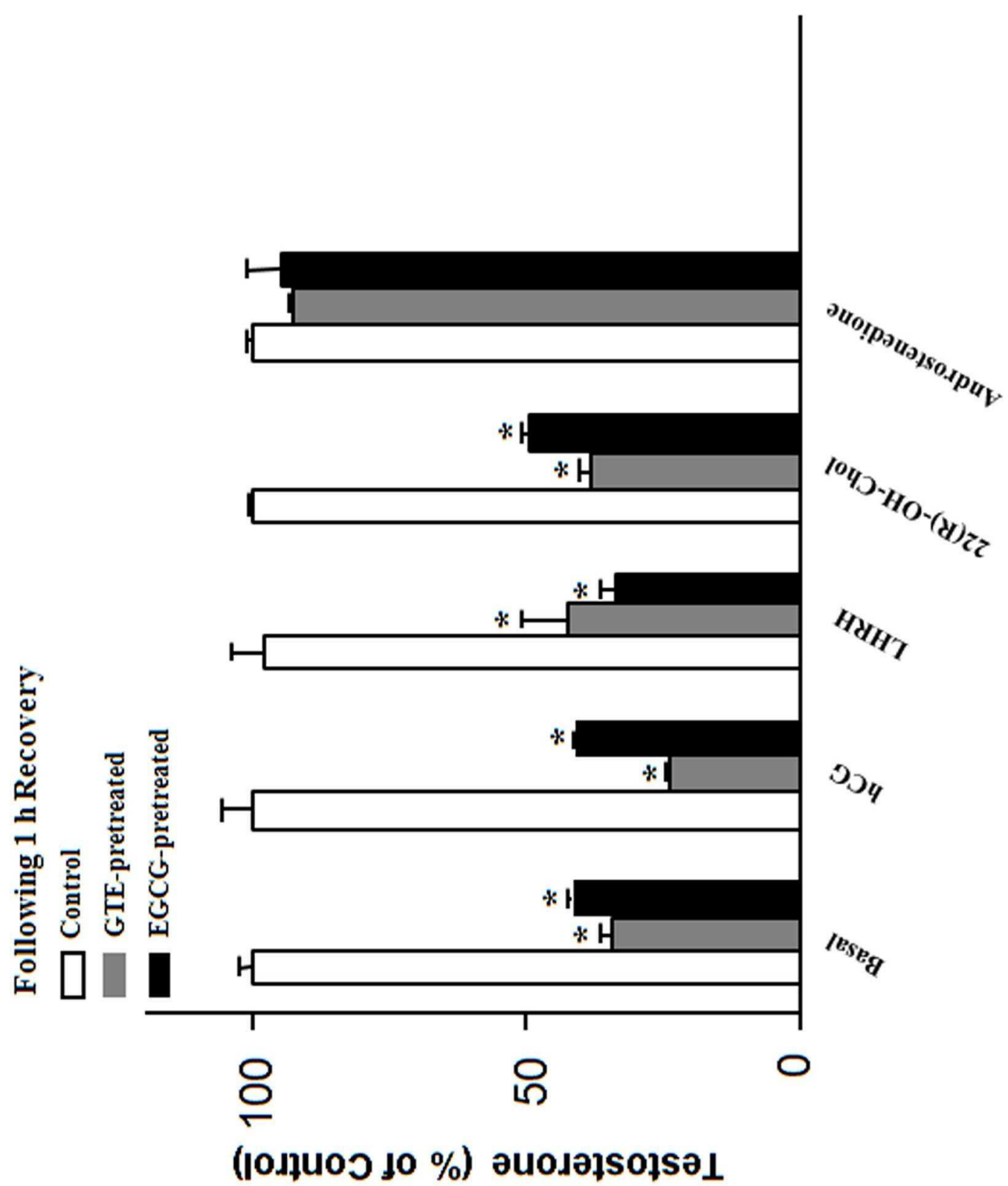


Table 1. Effect of GTE or EGCG added together with dbcAMP, LHRH or PDBu on testosterone production in rat Leydig cells preparation. Cells (0.3×10^6 ml) were incubated for 3 h. The data represent the mean $\pm$ SEM of triplicate determinations.

Additions	Testosterone (ng/ml)			
	Basal	dbcAMP (1mM)	LHRH (0.1 μ M)	PDBu (400 nM)
M199	2.57 $\pm$ 0.03	191.7 $\pm$ 11.6	5.40 $\pm$ 0.4	54.00 $\pm$ 5.0
GTE (69.2 μ g/ml)	1.03 $\pm$ 0.03*	4.2 $\pm$ 0.2*	0.44 $\pm$ 0.02*	1.47 $\pm$ 0.09*
EGCG (100 μ g/ml)	1.20 $\pm$ 0.06*	2.4 $\pm$ 0.06*	0.27 $\pm$ 0.05*	1.03 $\pm$ 0.03*

* $p < 0.0001$ vs. respective control (M199).

Table 2. Inhibitory effect of GTE (13.8 µg/ml) or EGCG (20 µg/ml) on basal or 22(R)-hydroxicholesterol-induced testosterone production and its reversion following a 1-h recovery in Leydig cells ($0.3 \times 10^6/0.5$ ml). To determine reversibility, cells were rinsed with fresh M199 after a 15 min pretreatment with GTE/EGCG and incubated in M199 for 1 h before further challenge with 22(R)-hydroxicholesterol (20 µM) during 2 h.

The data represent the mean ± SEM of triplicate determinations.

	Testosterone ng/mL					
	Treated (no recovery)			Pretreated (following 1h recovery)		
	M199	GTE	EGCG	M199	GTE	EGCG
Basal	0.85 ± 0.05	0.78 ± 0.06	0.68 ± 0.03 *	1.07 ± 0.03	1.09 ± 0.03	1.13 ± 0.03
22-OH-Chol	97.5 ± 0.10	70.3 ± 2.25**	65.3 ± 1.25 **	75.83 ± 0.83	116.0 ± 4.0 **	100.0 ± 5.0 **

*P < 0.05 vs. respective control (M199); **P < 0.001 vs. respective control (M199)

CONCLUSÕES

- O extrato aquoso do chá verde e a EGCG pura inibem a produção basal e estimulada de testosterona em células de Leydig de ratos *in vitro*.
- O GTE e a EGCG inibem a função das enzimas P450_{scc} e 17 β -HSD contribuindo, assim, na redução da capacidade esteroidogênica das células de Leydig.
- A presença do grupo galato na EGCG é importante para o seu efeito inibitório.
- Os efeitos inibitórios observados com o extrato aquoso do chá verde podem ser explicados, ao menos em parte, pela presença da EGCG em seu extrato.