

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

*Purinas extracelulares em células isoladas de
túbulos seminíferos*

Mestrando: Daniel Pens Gelain

Professora orientadora: Dra. Elena Aida Bernard

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2004



Concepção artística de uma célula de Sertoli, em associação com células germinativas em diferentes estágios meióticos.

A-F Holstein & Elke Schäfer

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Transdução de Sinal em Células Testiculares do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS) e por recursos pessoais da Professora Elena Aida Bernard.

*O erro não pode ser motivo de desmerecimento,
mas sim o início do aprendizado*

João Dreyer Netto

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos*

Albert Einstein

Dedicatória

Esta dissertação de mestrado é dedicada a todos os animais que têm sido confinados ou têm suas vidas sacrificadas nas pesquisas científicas em todo o mundo. Espero, com todo o meu coração, que este trabalho sirva, assim como todos os outros que utilizam animais, como mais um pequeno passo na busca por um nível de conhecimento que permita, no futuro, desenvolvermos tecnologias que tornem desnecessário o sacrifício de qualquer ser vivo em nome da ciência humana.

Agradecimentos

Aos meus pais, que apesar de todos os problemas financeiros e familiares, nunca, em nenhum segundo, deixaram de incentivar os meus estudos e de me mostrar a importância que o conhecimento tem na vida de um pessoa que quer ser realmente livre.

Ao povo do Brasil e especialmente do estado do Rio Grande do Sul, que financiou minha educação desde meus 5 anos de idade e o faz ainda hoje, e ao qual espero poder dar o retorno a este investimento à altura.

Aos professores José Cláudio Fonseca Moreira e Fátima Theresinha da Costa Rodrigues Guma, cujas inspiradoras aulas na minha graduação em Biologia pela UFRGS me fizeram apaixonar pela bioquímica.

À Fernanda, minha Fezinha, que tem estado ao meu lado em todos os momentos durante este mestrado, inclusive (e principalmente) nos mais difíceis; obrigado pela sua compreensão.

A todas as pessoas queridas com as quais eu tenho sido ausente nestes últimos dois anos - são tantas para este espaço, obrigado pela compreensão e paciência de todos.

Aos meus colegas de laboratório e do Departamento de Bioquímica: Emerson, Tião e Glorinha, que me ensinaram as primeiras técnicas; os bolsistas de Iniciação Científica Gisele, Fernanda, Marcelo, Fabiano e Vanessa, com os quais eu sempre pude contar no trabalho diário;

Professor Perry, sempre solícito para qualquer dúvida; nossa técnica Dona Lia - o que seria de mim sem a senhora! Colegas do laboratório 21 - Cláudia, Eduardo, Ana - que sempre nos ajudam com materiais, reagentes e até algumas culturas; aos professores Diogo e Dioguinho, pela ajuda com HPLC - sem o qual este trabalho jamais existiria; colegas do laboratório 25 - Fábio, Evandro, Felipão, Ramatis, Michael, Fernanda, Manuela, Amâncio, Guilherme, Marinho, Marcos, Martina, Márcio e Zé, pelas trocas de idéias, pelas discussões científicas, e outras inúteis (porém agradáveis), pela ajuda quando eu comecei a trabalhar com estresse oxidativo, pela amizade, chimarrão, confiança e vizinhança alegre e inspiradora, que tornam o nosso sisudo ambiente de trabalho em algo mais aconchegante e motivador, o que é indispensável para trabalhar com amor e dedicação; a todos os meus colegas, professores e funcionários do CPG- Bioquímica, por, de uma forma ou outra, fazerem parte desta etapa tão importante de minha vida.

Ao meu colega e principal parceiro nestes anos, Luiz Fernando de Souza, sem o qual minha história na Bioquímica-UFRGS jamais poderia ser contada;

E, principalmente, à pessoa que me deu a maior oportunidade na minha vida: Dra. Elena Aida Bernard, que nós todos chamamos respeitosamente de "Professora"; obrigado, professora, por ter acreditado, confiado e desafiado minha capacidade, além de ter compartilhado sua confiança, amizade e respeito. Seus ensinamentos vão muito além da formação de um profissional, e moldaram também meu caráter e minhas decisões. Sua dedicação pela pesquisa não é só um exemplo, mas sim uma inspiração para todos nós, nos ensinando que ciência se faz também com o coração. É uma honra imensa fazer parte do time de profissionais formados pela senhora. Obrigado por tudo.

Índice Geral

Índice de figuras e tabelas.....	9	
Siglas e abreviações.....	10	
Resumo.....	11	
Capítulo I - Introdução		
1. Breve histórico.....	13	
2. Receptores purinérgicos.....	14	
3. A sinalização purinérgica e o sistema reprodutor masculino.....	16	
4. Objetivos.....	21	
Capítulo II - Artigo		
Extracellular purines from cells of seminiferous tubules.....	23	
Capítulo III - Secreção de purinas extracelulares por células germinativas de ratos adultos e fragmentos de túbulos seminíferos de ratos imaturos e adultos		
1. Introdução.....	33	
2. Material e métodos.....	34	
2.1. Preparação de túbulos seminíferos.....	34	
2.2. Extração de células germinativas.....	34	
3. Resultados e discussão	35	
Capítulo IV - Discussão geral		
1. Considerações gerais.....	39	
2. Distinção do perfil de purinas extracelulares com o tipo celular.....	40	
3. Comparação entre as diferentes idades.....	43	
Capítulo V - Conclusões e perspectivas.....		46
Referências bibliográficas.....	48	

Índice de figuras e tabelas

Capítulo I

Figura 1. Modelo molecular do ATP.....	14
Tabela 1. Classificação atual dos receptores de adenosina	14
Figura 2. Esquema representativo do sistema purinérgico de sinalização extracelular.....	17
Figura 3. Fotomicrografia de túbulo seminífero.....	18

Capítulo III

Figura 1. Purinas extracelulares de túbulos seminíferos de ratos imaturos e adultos.....	35
Tabela 1. Purinas extracelulares de células germinativas de ratos imaturos e adultos	36

Siglas e abreviações

ADA	adenosina deaminase
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AMP-DA	adenosina monofosfato deaminase
AOPCP	α,β -metileno adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
EHNA	eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
dip	dipiridamole
FSH	hormônio folículo-estimulante
GTP	guanosina trifosfato
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	coeficiente de inibição
IMP	inosina monofosfato
IP ₃	inositol trifosfato
LDH	lactato desidrogenase
NBTI	S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina
XOR	xantina óxido-redutase

Resumo

As purinas extracelulares, principalmente ATP e adenosina, exercem diversos efeitos sinalizadores através da sua interação com receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos. Desde o início da década de 1980, tem sido observada a presença de receptores purinérgicos em células do sistema reprodutor masculino, em especial células de Sertoli e células germinativas. Foi descrito que as células de Sertoli expressam receptores para adenosina do subtipo A₁, além de receptores ionotrópicos (P2X), e de metabotrópicos (P2Y), para ATP. Já em células germinativas, conforme o estágio de maturação meiótica, foi observada uma expressão diferencial de distintos subtipos de receptores para adenosina e ATP. Baseados na observação das mudanças biológicas induzidas por estas moléculas nas células do sistema reprodutor masculino, diversos autores vêm propondo modelos hipotéticos de comunicação parácrina, entre as células de Sertoli e germinativas, mediados pela adenosina ou ATP extracelulares. No entanto, em mais de 20 anos de pesquisas neste campo, a origem das purinas extracelulares no interior dos túbulos seminíferos permanece como uma questão sem resposta. Neste trabalho, nosso grupo demonstrou que todas as células constituintes dos túbulos seminíferos – células de Sertoli, germinativas e peritubulares – são capazes de liberar espontaneamente purinas para o meio de incubação; no entanto, o perfil qualitativo e quantitativo de secreção difere entre os três tipos celulares. Além disso, nós demonstramos que existe uma diferença entre o conteúdo purinérgico extracelular de túbulos seminíferos de ratos em distintos estágios de maturação sexual (pré-púberes e adultos), provavelmente devido ao aumento da população de células germinativas no período de vida adulto do rato.

Capítulo I

Introdução

1. Breve Histórico

No ano de 1929, os pesquisadores A.N. Drury e A. Szent-Gyorgyi demonstraram pela primeira vez as potentes - e até então desconhecidas - ações extracelulares dos nucleosídeos e nucleotídeos purinérgicos, especialmente o ATP e a adenosina (fig. 1), através do trabalho intitulado “*The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mamalian heart*” [Drury & Szent-Gyorgyi, 1929]. Após este estudo pioneiro, houve um aumento considerável de publicações descrevendo as ações vasodilatadoras do ATP e adenosina [Gillespie, 1933; Holton & Holton, 1954; Holton, 1959; Berne 1963] até que, no início da década de 70, Geoffrey Burnstock propusesse a hipótese purinérgica [Burnstock et al., 1970; Burnstock, 1972]. Observando a existência de componentes neurotransmissores do sistema nervoso central que não eram adrenérgicos ou colinérgicos, mas sim nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, Burnstock propôs que essas substâncias pudessem atuar como neurotransmissores, baseado nos critérios revisados por Eccles [Eccles, 1964] para a classificação de neurotransmissores putativos. A grande inovação desta hipótese foi a proposição da existência de receptores de membrana específicos para o ATP e adenosina extracelulares.

Desde então, as pesquisas no campo da sinalização purinérgica prosperaram em laboratórios pelo mundo inteiro, e as descrições sobre os efeitos farmacológicos do ATP extracelular e seus metabólitos em funções fisiológicas de diferentes órgãos, sistemas, tecidos isolados e preparações de células purificadas têm crescido exponencialmente na literatura científica [Dubyak & El-Moatassim, 1993]. Estes trabalhos demonstraram que as respostas induzidas pelo ATP e adenosina são realmente mediadas por dois tipos principais de receptores de membrana, específicos para cada uma destas moléculas.

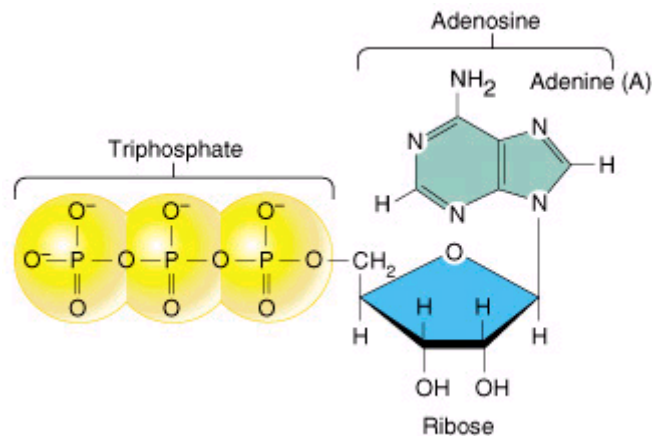


Figura 1: Modelo molecular do ATP. A base de adenina, juntamente com a ribose, constituem o nucleosídeo adenosina.

2. Receptores Purinérgicos

Os receptores purinérgicos têm sido classificados em dois grandes subgrupos, de acordo com a nomenclatura proposta por Burnstock [Burnstock, 1972]: receptores P1 - responsivos à adenosina, e receptores P2, que são ativados principalmente por ATP. De fato, os receptores P1 têm sido mais comumente citados simplesmente como receptores de adenosina (A), sendo que a nomenclatura usual faz referência direta aos seus subtipos conhecidos, os quais são classificados com base em suas distintas estruturas moleculares e perfis farmacológicos. Todos os quatro subtipos de receptores de adenosina acoplam-se à diferentes proteínas-G quando ativados, e suas principais características estão sumariadas na tabela 1.

Tabela 1. Classificação atual dos receptores de adenosina

	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
Proteína-G	G _{i/o}	G _s	G _s G _q	G _i G _q
Efeitos	↓AMPc, ↑IP ₃ , ↑K ⁺ , ↓Ca ²⁺	↑AMPc	↑AMPc, ↑IP ₃	↓AMPc, ↑IP ₃
Agonistas de origem fisiológica	adenosina	adenosina	adenosina	adenosina, inosina

adaptado de Ralevic & Burnstock, 1998.

Os receptores P2, por outro lado, são subdivididos em duas grandes famílias, e têm sido denominados de acordo com essa divisão. Assim, os receptores ionotrópicos são denominados P2X, enquanto que os receptores metabotrópicos são chamados P2Y. Os trabalhos mais recentes têm dado conta de cerca de 12 diferentes subtipos de receptores P2X, bem como uma média similar de receptores P2Y. Entre os critérios de classificação dos receptores P2, podemos incluir sua velocidade de dessensitização, efeitos sobre o influxo e/ou mobilização interna de cálcio, formação de poros na membrana ou acoplamento à proteínas G, e afinidade por diferentes agonistas sintéticos (geralmente análogos não metabolizáveis do ATP) ou naturais - entre os quais o ADP e nucleotídeos de uridina [Ralevic & Burnstock, 1998].

A presença de enzimas, na membrana plasmática, que atuam na degradação de purinas extracelulares, também tem sido observada com frequência na maioria das células [Zimmermann, 2000]. Estas enzimas - denominadas ectonucleotidases - estão intimamente envolvidas no controle da função dos receptores purinérgicos, uma vez que seus substratos são os agonistas destes receptores. Assim, um sinal evocado pelo ATP ou adenosina pode ser interrompido conforme a atividade das ectonucleotidases nestas moléculas. Além disso, muitas vezes, os efeitos decorrentes da adição de ATP extracelular a um sistema biológico devem-se na verdade à sua degradação e conseqüente produção de adenosina, que por sua vez ativa seus receptores específicos (convertendo uma sinalização P2 em P1 - figura 2). A ecto-adenosina deaminase também pode estar envolvida neste controle, uma vez que ela é responsável pela degradação da adenosina, produzindo inosina, e já foi constatado que a inosina é capaz de ativar receptores A₃ sob determinadas circunstâncias [Tilley et al, 2000].

Representantes de todas as diferentes classes de receptores purinérgicos foram encontrados no sistema reprodutor masculino, bem como foi descrita a atividade das ectonucleotidases, como veremos a seguir.

3. A Sinalização Purinérgica e o Sistema Reprodutor Masculino

Os mecanismos de sinalização envolvidos na comunicação parácrina entre os diferentes tipos celulares constituintes dos testículos (entre os principais temos as células de Leydig, células de Sertoli, células mióides peritubulares e as células da linhagem germinativa - figura 3) são tão complexos quanto é intensa a troca de informações entre estes tipos celulares. De fato, a produção de gametas - o processo de gametogênese - é, sob o estrito ponto de vista evolutivo, o processo mais importante durante o efêmero período de vida de qualquer organismo. É por esta razão que podemos observar tantas peculiaridades na fisiologia e bioquímica das células testiculares, quando comparamos com processos similares em outros órgãos e sistemas relacionados a processos vegetativos. A principal destas peculiaridades é a complexidade envolvida na regulação e manutenção dos ciclos de divisões reducionais celulares - o processo meiótico. No entanto, são tantos os fatores envolvidos nesta regulação, que mesmo o pouco que se sabe - em relação ao que desconhecemos - deste assunto é extenso o suficiente para alguns autores já afirmarem, com razão, que a comunicação parácrina entre as células testiculares é a mais complexa existente em todo o organismo [para revisão, ver Jégou & Sharpe 1993].

Levando-se em conta o crescente número de trabalhos reportando as ações sinalizadoras de receptores purinérgicos em distintos sistemas e tipos celulares, a descoberta da existência destes receptores em testículos, no início da década de 80 [Williams & Risley, 1980], é hoje encarada quase que com naturalidade. No entanto, o estudo subsequente das funções exercidas por estes receptores nas células testiculares e, conseqüentemente, na regulação da espermatogênese, revelou não só uma especificidade de ação como também um importante envolvimento em processos centrais do metabolismo destas células.

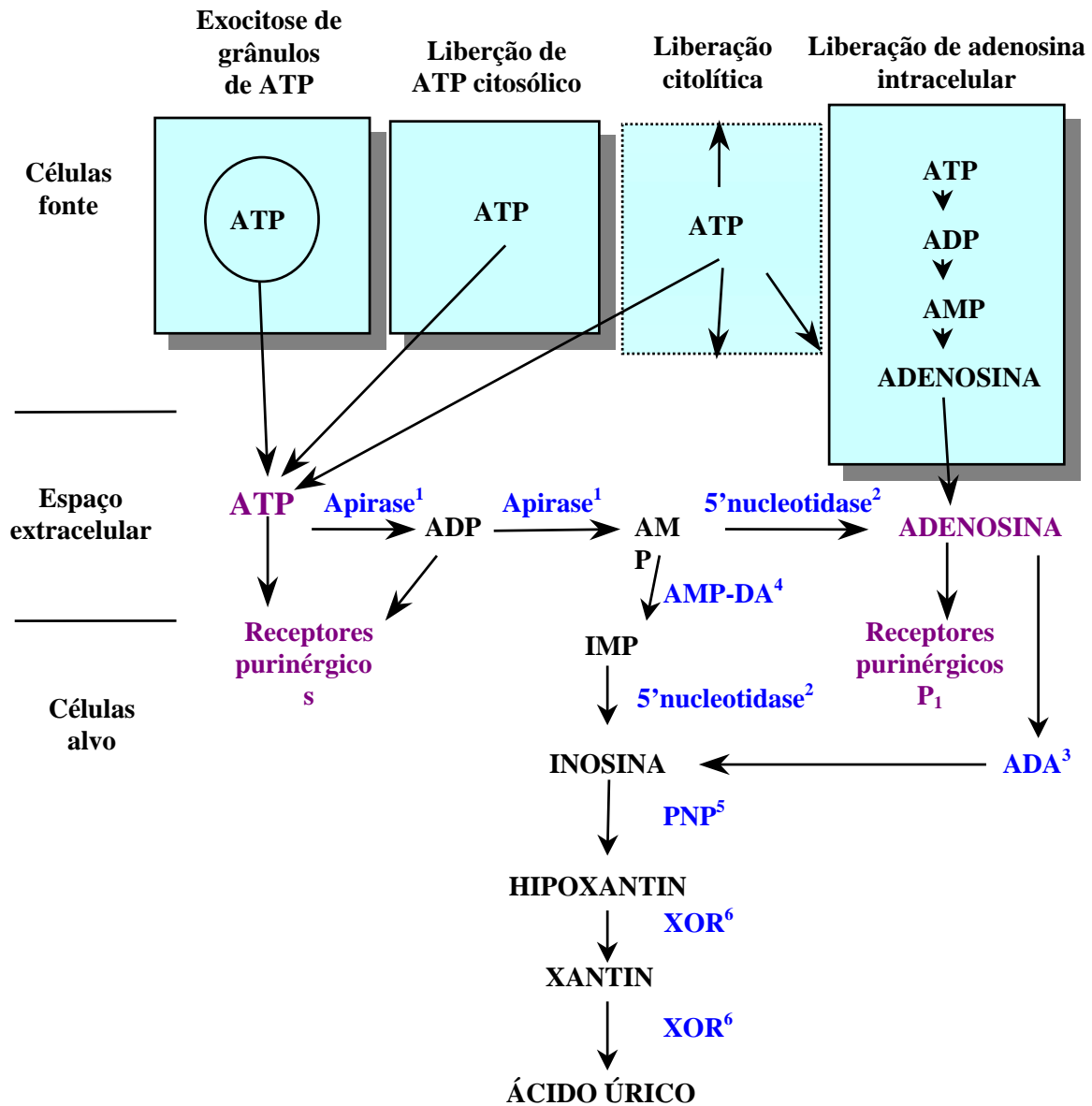


Figura 2: Esquema representativo do sistema purinérgico de sinalização extracelular. Em azul estão representadas as enzimas da cascata de degradação purinérgica: 1) apirase (ou ATP-difosfohidrolase), 2) 5'-nucleotidase, 3) adenosina deaminase (ADA), 4) AMP deaminase (AMP-DA), 5) purinonucleosídeo-fosforilase (PNP) e 6) xantina óxido-redutase (XOR). Em ratos, ainda há a uricase, que converte ácido úrico em alantoina.

O grupo de pesquisadores italianos liderado por Marco Conti foi o primeiro a demonstrar que os receptores de adenosina presentes em células de Sertoli eram capazes de inibir o aumento de AMP cíclico (AMPC) resultante da estimulação com o hormônio gonadotrófico folículo-estimulante (FSH) [Monaco & Conti, 1986]. Sabendo-se que o FSH regula ativamente desde a diferenciação até processos relacionados à espermatogênese nestas células, este dado sugeria um sistema de *cross-talking* entre os receptores de adenosina e um dos hormônios mais importantes na fisiologia testicular.

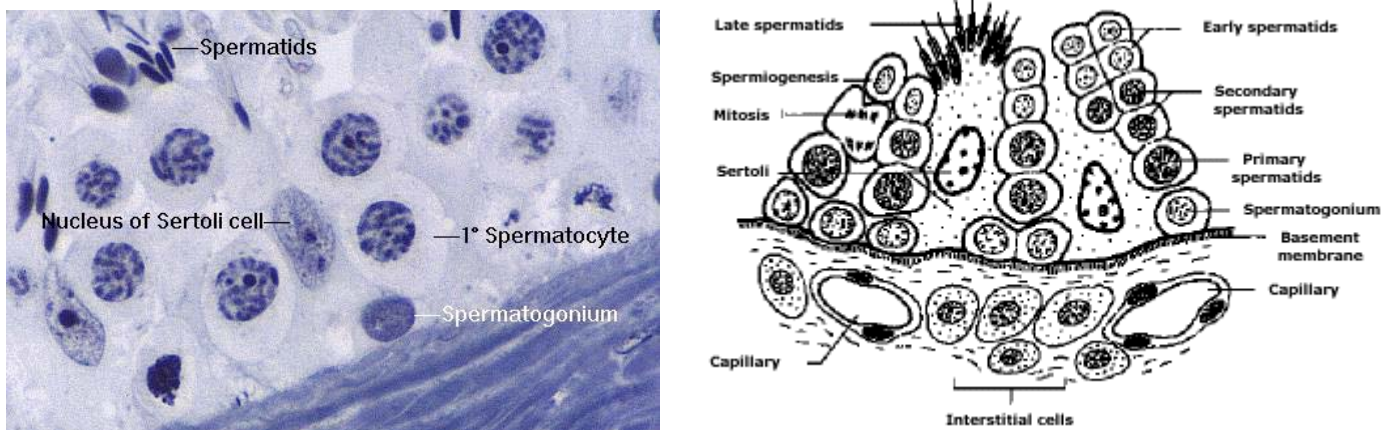


Figura 3. Fotomicrografia de uma secção transversal de túbulo seminífero de rato adulto, demonstrando o núcleo de uma célula de Sertoli, juntamente com células germinativas, associadas ao seu citoplasma, em diferentes estágios espermatogênicos: espermatogônia (2n), espermatócitos primários (2n) e espermatídes (n), próximas à luz do túbulo. Ao lado direito, representação esquemática da fotografia, incluindo estágios intermediários das células germinativas e o interstício testicular.

Trabalhos posteriores não só elucidaram melhor a natureza e a função dos receptores de adenosina nas células de Sertoli (identificando-os como pertencentes ao subgrupo de receptores A_1 [Rivkees, 1994]) como identificaram receptores P2 nestas células, também associados à funções específicas da célula de Sertoli, como secreção de transferrina [Meroni et al., 1998], de estradiol [Rossato et al., 2001] e modulação dos níveis de cálcio intracelular e de respostas ao FSH [Filippini et al., 1994; Foresta et al., 1995, Lalevée et al., 1999]. Estes trabalhos demonstraram que o ATP, em células de Sertoli, atua por diferentes vias, sendo uma delas regulada pela ativação de receptores P2Y₂ (dado confirmado por Ko et al., 2003) e a outra por

receptores P2X, de diferentes subtipos. Um recente trabalho de imunodeteccção de diferentes subtipos de receptores P2X em testículos de ratos adultos demonstrou a expressão de receptores P2X₂ e P2X₃ em células de Sertoli em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero, com a concomitante expressão do receptor P2X₇ em todos os estágios [Glass et al., 2001], sugerindo que estas células devem responder de maneira diferenciada ao ATP durante as distintas fases da espermatogênese.

A presença de receptores purinérgicos para adenosina e ATP também foi detectada em células da linhagem espermatogênica, onde também é possível observarmos uma expressão diferencial de distintos subtipos de receptores conforme o tipo celular e o estágio de maturação do rato. Por exemplo, é possível encontrar receptores A₁ e A₃ em espermátócitos e espermátides arredondadas ou alongadas [Rivkees, 1994], mas em espermatozóides são expressos receptores A₁ [Minelli et al., 2000] e A₂ [Fraser, 1990]. Esta expressão diferencial de receptores purinérgicos, conforme o estágio da espermatogênese, têm levado todos estes autores a sugerir que tais receptores estariam envolvidos na regulação deste processo. Além disso, alguns autores demonstraram que estes receptores podem estar relacionados aos processos de capacitação e de fertilidade dos espermatozóides [Fraser, 1990].

A presença de ectonucleotidases também foi descrita em testículos. Nosso grupo demonstrou, recentemente, que células de Sertoli são capazes de metabolizar o ATP extracelular até inosina, através da degradação seqüencial pelas enzimas ecto-apirase, ecto-5'-nucleotidase (produzindo adenosina, convertendo sinalização P2 em P1), e ecto-adenosina deaminase [Casali et al., 2001]. Assim, pode-se dizer que, tanto os receptores purinérgicos, como as enzimas responsáveis pela metabolização seqüencial do ATP extracelular em ADP, AMP, adenosina e inosina, estão presentes no interior dos túbulos seminíferos. Estes dados sugerem um envolvimento do sistema purinérgico na íntima e intrincada sinalização entre as

células de Sertoli e germinativas, uma vez que é no interior dos túbulos seminíferos que se constitui o micro-ambiente seletivo isolado da circulação sistêmica pela barreira hemato-testicular das células de Sertoli.

No entanto, existe um dado ainda não elucidado nestes mais de 20 anos de pesquisas sobre o sistema purinérgico testicular (iniciados pelo trabalho publicado por Williams & Risley, em 1980), e que tem sido alvo de certa controvérsia: a origem das purinas extracelulares nos testículos. Alguns autores têm sugerido, por exemplo, que o ATP extracelular poderia surgir nos testículos através da sua liberação por fibras nervosas autonômicas que foram encontradas relativamente próximas às células de Sertoli [Foresta et al., 1995; Rossato et al., 2001]. No entanto, outros autores excluem esta possibilidade, baseados na observação da ausência de terminações nervosas no interior dos túbulos seminíferos, e na alta velocidade com que estas substâncias são metabolizadas no espaço extracelular pela ação de ectonucleotidases, impedindo que ativem estes receptores [Conti et al., 1989]. Além disso, trabalhos utilizando co-culturas de células de Sertoli e germinativas [Welsh & Ireland, 1992] forneceram dados utilizados por alguns autores para sugerir que as células germinativas poderiam secretar ATP para controlar funções P₂-dependentes das células de Sertoli [Foresta et al., 1995; Lalevée et al., 1999]. No entanto, embora os trabalhos sobre a função dos receptores purinérgicos nas células testiculares tenham realizado inferências sobre a natureza das purinas extracelulares no interior dos túbulos seminíferos (e sobre quais células seriam responsáveis por sua liberação), todos estes modelos hipotéticos nunca foram suportados por nenhuma evidência experimental direta. Portanto, se levarmos em consideração que o estudo da presença e da função dos receptores purinérgicos e ectonucleotidases no sistema reprodutor masculino, no decorrer destes anos, têm indicado um envolvimento destas rotas de sinalização em processos fundamentais da função reprodutora masculina, como citamos anteriormente, parece

ser de grande importância esclarecer como estas substâncias são originadas no interior dos túbulos seminíferos. Neste sentido, nosso grupo elaborou e executou o projeto de pesquisa cujos resultados são apresentados nesta Dissertação de Mestrado.

4. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: 1) investigar se as células componentes dos túbulos seminíferos de ratos imaturos (células de Sertoli, germinativas e mióides peritubulares) são capazes de liberar purinas para o meio extracelular; 2) identificar os perfis qualitativos (quais purinas eram liberadas) e quantitativos (quantidades, concentrações e tempos) desta secreção purinérgica; 3) comparar o perfil de secreção entre fragmentos de túbulos seminíferos de ratos imaturos e adultos, bem como de células germinativas de ratos destas duas idades.

Capítulo II

Secreção de purinas extracelulares por células isoladas de túbulos seminíferos de ratos imaturos

Gelain, DP; Souza, LF; Bernard, EA: Extracellular purines from cells of seminiferous tubules. *Molecular and Cellular Biochemistry* 245(1):1-9, 2003

Extracellular purines from cells of seminiferous tubules

Daniel Pens Gelain, Luiz Fernando de Souza and Elena Aida Bernard

Laboratório de Transdução de Sinal em Células Testiculares, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 9 October 2002; accepted 19 July 2002

Abstract

It has been long postulated that extracellular purines can modulate the function of the male reproductive system by interacting with different purinergic receptors of Sertoli and germinative cells. Many authors have described the biological changes induced by extracellular ATP and/or adenosine in these cells, and some hypothetical models for paracrine communication mediated by purines were proposed; however, the cellular source(s) of these molecules in seminiferous tubules remains unknown. In this study, we demonstrated for the first time that Sertoli cells are able to release ATP (0.3 nmol/mg protein) and adenosine (0.1 nmol/mg protein) in the extracellular medium, while germinative and myoid peritubular cells are able to secrete adenosine (0.02 and 0.37 nmol/mg protein, respectively). Indeed, all the three types of cells were able to release inosine at significant concentrations (about 0.4 nmol/mg protein). This differential secretion depending on the cellular type suggests that these molecules may be involved in the paracrine regulation and/or control of the maturation processes of these cells. (*Mol Cell Biochem* 245: 1–9, 2003)

Key words: Sertoli, extracellular nucleotides, germ cells, peritubular cells, seminiferous tubules, purinoceptors

Introduction

Extracellular ATP and adenosine modulate various biological responses through their interaction with different purinergic receptor subtypes on a wide variety of cells [1]. These receptors are commonly divided according to their affinity for ATP or adenosine: P₂ receptors, which are subclassified into P₂Y (G-protein coupled receptors) and P₂X (ligand-gated ion channels), have high affinity for ATP and ADP [2, 3]. P₁ receptors, subdivided into A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (according their effect on adenylyl cyclase activity), have high affinity for adenosine and AMP [4].

It has been long postulated that extracellular purines can modulate the function of the male reproductive system [5]. In fact, it is well known that testicular cells express a variety of purinergic receptors [4, 6, 7]. It was observed that Sertoli cells express A₁ purinoceptors, which are related to the inhibition of the FSH-stimulated accumulation of cAMP and

androgen aromatization [8]. These cells also express P₂Y receptors that affect PI turnover and intracellular [Ca²⁺] mobilization [9]. The activation of these receptors induces biological effects related to responsiveness to FSH, such as the inhibition of cAMP accumulation [9], the increase of γ -glutamyl-transpeptidase activity and transferrin secretion [10]. Triggering of ATP receptors also causes membrane depolarization dependent on Na⁺ influx, with consequent opening of voltage-gated Ca²⁺ channels [11].

In spermatogenic cells, P₂ receptors are also described [12], and it is known that P₂Y₂ stimulation modulates Ca²⁺-activated K⁺ channels [13]; moreover, the presence of P₁ receptors has been described in these cells: A₁ adenosine receptors were found in spermatozoa [14], while A₃ receptors were detected in spermatocytes and round and elongating spermatis [4]. A₁ and A₃ receptor function inhibits adenylyl cyclase activity, and it has been proposed that this inhibition may have an important role in regulating spermatogenesis [4, 8]. It has

also been proposed that adenosine may influence the capacitation process and/or fertility in spermatozoa through interaction with A_2 receptors [15, 16], thereby stimulating adenylyl cyclase activity [17]. Recent work based on immunohistochemistry detected P_2 ionotropic receptors of the subtypes P_2X_2 , P_2X_3 , P_2X_5 and P_2X_7 on germinative cells in various steps of gamete development, while Sertoli cells showed P_2X_2 and P_2X_3 immunostaining in different stages of the cycle of seminiferous epithelium, as well as P_2X_7 detection in all stages [18].

Sertoli and germinative cells are absolutely interdependent. The different junctions that interconnect these cells are considered the most sophisticated within the body [19]. Sertoli cells through their specialized tight junctions form a selective barrier between the blood and the seminiferous tubule lumen, separating premeiotic, meiotic and postmeiotic germ cells from the immune system [19–21]. During spermatogenesis, germinative cells are supported by Sertoli cells [22–25], which have their secretory activity precisely regulated by germinative and myoid peritubular cells through the cross-talking of signaling molecules [26–33].

Extracellular degradation of ATP proceeds by a cascade of cell surface-bound enzymes. This hydrolysis converts P_2 into P_1 purinergic signaling. Previous observations of our laboratory demonstrated that Sertoli cell cultures are able to convert extracellular ATP into inosine through the action of ectonucleotidases [34]. Since it was observed that activation of purinergic receptors can induce functional changes in these cells, various hypothetical models have been proposed for paracrine communication between germinative and Sertoli cells involving extracellular nucleotides [5, 6, 9, 11, 35]; however, the source of these molecules remains unknown. In the present study we investigated the presence of nucleotides and/or their metabolic products in the extracellular space of Sertoli cells. In addition, we investigated the secretion of these compounds in germinative and myoid peritubular cells. This is the first work reporting the presence of extracellular nucleotides, nucleosides and their metabolites in cells of seminiferous tubules.

Materials and methods

Materials and animals

All drugs, kits and enzymes were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Pregnant Wistar rats were housed individually in plexiglass cages. Litters were restricted to eight pups each. The animals were maintained on a 12 h light/dark cycle at a constant temperature of 23°C, with free access to commercial food and water. Male immature rats (18 days old) were killed by ether inhalation.

Isolation and culture of Sertoli and myoid peritubular cells

Sertoli and myoid peritubular cells were isolated as previously described [37], following the method of Tung and Fritz [38]. Testes of immature rats were removed, decapsulated and enzymatically digested with trypsin and deoxyribonuclease for 30 min at 34°C, and centrifuged at 750 × g for 5 min. The pellet was washed with soybean trypsin inhibitor, centrifuged and incubated with collagenase and hyaluronidase for 30 min at 34°C. After incubation, this fraction was centrifuged (10 min at 40 × g). The pellet was taken to isolate Sertoli cells, and the supernatant was used to isolate peritubular cells. After counting, Sertoli cells were plated on 25 cm² flasks (3×10^5 cells/cm²) in DMEM/F12 (1:1, low glucose) 1% FBS, supplemented with sodium bicarbonate, HEPES and gentamicin, and maintained in 5% CO₂ at 34°C for 24 h to attach. Then medium was changed for DMEM/F12 serum-free and cells were taken for assay after 48 h of culture. Sertoli cell cultures were estimated to be 90–95% pure, as assessed by alkaline phosphatase assay.

Peritubular cells were isolated from the supernatant fraction of the collagenase-treated tubules, and were cultured in 25 cm² flasks in DMEM/F12 10% FBS. In these conditions, the only cell type of seminiferous tubules that can proliferate are peritubular cells. These cells were allowed to confluence and then subcultured at 25% density in the same medium. When cells reached confluence, they were harvested for assay.

Isolation of germinative cells

Germ cell-enriched suspensions were prepared as previously described [39, 40]. Testes from immature rats were removed and decapsulated. Seminiferous tubules were homogenized and incubated with trypsin for 15 min at 37°C. The homogenate was centrifuged for 5 min at 700 × g and washed with soybean trypsin inhibitor. Cells were centrifuged and incubated with collagenase for 20 min at 37°C, and then centrifuged and resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS). The suspension was filtered in a nylon mesh of 100 μm-diameter, to eliminate Sertoli and Leydig cells. Germinative cells were then counted and suspended in phenol red-free HBSS supplemented with pyruvate (2 mM) and lactate (6 mM). These cells were immediately used for assay.

Assay and measurement of extracellular purines

To evaluate the presence of nucleotides, nucleosides and other purine derivatives in the incubation medium, we used the method described by Ciccarelli *et al.* [41] to detect extracellular guanine and adenine-based purines of astrocytes. Isolated cells in culture were gently washed 3 times to remove

remnants of medium and eventual dead or dying cells, and then incubated with phenol red-free HBSS supplemented with HEPES 15 mM for different periods of time in 5% CO₂ at 34°C. After incubation the medium was removed and centrifuged to eliminate debris. Samples were treated with TFA 7% to precipitate proteins, evaporated in vacuum centrifuge (-61°C) and resuspended at 1/10 of the original volume in order to allow the detection of the low concentrations of purinergic compounds found in these cells. The sample purine contents were determined by a reverse-phase HPLC system equipped with a C-18 column (Supelcosil™, Supelco®, 25 cm × 4.6 mm) and UV detector. Cell viability was assessed by the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the incubation medium after the end of the experimental procedures, using a commercial kit from Sigma.

Two elution programs described for detection and quantification of purines were carried out. A linear gradient from 100% buffer A (KH₂PO₄ 60 mM and tetrabutylammonium chloride 5 mM, pH 6.0) to 100% buffer B (buffer A 70% plus methanol 30%) over a 25-min period, at a flow rate of 1.2 ml/min for identification of purinergic bases and nucleosides [41]. In order to detect nucleotides the elution program described by Cunha *et al.* [42] was used to separate ATP and its degradation products: 10 min with 96% buffer A (KH₂PO₄ 100 mM, pH 6.5) and 4% buffer B (buffer A plus methanol 30%), followed by a 5-min linear gradient up to 50% of buffer B, and held for 10 min, at a flow rate of 1.25 ml/min (UV absorption of 245 nm). To ascertain that the substances detected in samples were effectively purine-based compounds, each sample was loaded with standard solutions of nucleotides, nucleosides and purinergic bases from Sigma.

Kinetics of degradation of extracellular ATP and adenosine was assessed by adding ATP or adenosine 25 μM to the incubation medium, and the appearance/disappearance of their metabolic products on the extracellular space was evaluated by HPLC. In order to block the formation of extracellular adenosine from AMP, we used the most effective inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, α,β-methylene adenosine diphosphate (AOPCP) 100 μM. S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) 10 μM and dipyrindamole (dip) 10 μM were used to inhibit the transport of adenosine and/or inosine, and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) 10 μM was used to inhibit adenosine deaminase. Protein content was measured as described by Lowry *et al.* [43].

Statistical analysis

Each point of extracellular levels of purines in all cellular preparations represents mean ± S.E.M. values of at least three separate experiments. Statistical analysis were performed on the raw data by ANOVA, with Duncan's *post hoc* test. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

HPLC analysis revealed that isolated Sertoli cells spontaneously released purines in the incubation medium (Fig. 1). Concentration of extracellular ATP measured in 5, 10, 15 and 60 min of incubation ranged between 0.22 ± 0.02 and 0.32 ± 0.04 nmol/mg protein (70–100 nM), while adenosine concentrations ranged between 0.05 ± 0.02 and 0.15 ± 0.03 nmol/mg protein (11–36 nM). Inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin were also detected in all time points analyzed (not shown). No guanine nucleotides or nucleosides, nor deoxy-inosine, deoxy-adenosine, cAMP, UTP, UDP and IMP were found in any period of incubation studied. An aliquot of the incubation medium was used for measurement of LDH activity, to assess cellular viability. There was no membrane damage during assay (data not shown), indicating that purines found are not leakage from cells. Two unidentified U.V. absorbing peaks were observed in all chromatograms; their retention times were about 7.5 and 11.2 min.

ADP and AMP were detected in all time points analyzed, and this could suggest that extracellular adenosine and inosine may be the result of the action of ectonucleotidases on released ATP. We previously reported that Sertoli cells are able to convert extracellular ATP into inosine by the action of these enzymes [34], so we evaluated the rate of degradation of exogenous ATP and adenosine (25 μM) and the appearance of their metabolites during 30 min of incubation (Fig. 2). AOPCP and EHNA were used to inhibit different steps of ectonucleotidase pathway, and dip/NBTI were used to suppress nucleoside uptake (Table 1).

Once ATP was added to the incubation medium of Sertoli cells (Fig. 2A), it was quickly degraded to less than 20% in 5 min. Blockade of AMP conversion into adenosine by inhibiting ecto-5'-nucleotidase with AOPCP 100 μM abolished adenosine production (Table 1). However, addition of adenosine/inosine uptake inhibitors dipyrindamole and NBTI (10 μM) caused an accumulation of extracellular adenosine and inosine, even in the presence of AOPCP (Table 1). Similar results were obtained without addition of ATP, where the presence of dip/NBTI increased inosine and adenosine concentration (data not shown). Kinetics of adenosine degradation (Fig. 2B) showed that its deamination to inosine is slow; after 30 min of incubation, concentration of adenosine in the medium is still above 15 μM, and inosine concentration is below 10 μM. Indeed, when ecto-adenosine deaminase was inhibited by EHNA, the concentration of inosine was found to be about 0.43 μM (Table 1), similar values to that obtained at the release experiments (about 0.2–0.4 μM after 60 min of incubation). This value was increased when dip/NBTI were concomitantly added.

Extracellular purines from isolated germinative and peritubular cells were also detected by HPLC analysis of the incu-

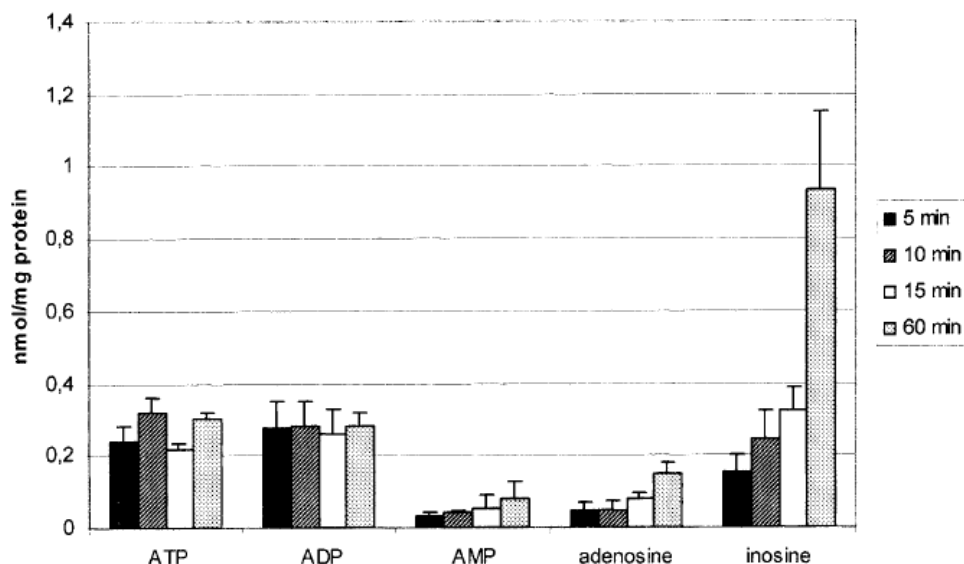


Fig. 1. Extracellular purines in Sertoli cells incubation medium. Purines in the incubation medium of Sertoli cells cultured for the indicated intervals were identified by HPLC analysis. Hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin were detected, but not shown. Individual peaks were identified by addition of standard solutions in the samples. Each value is the mean \pm S.E.M. of three or four experiments ($n = 3$).

Table 1. Degradation of exogenous ATP or adenosine (25 μ M) in Sertoli cells (30 min)

	ATP 25 μ M	ATP + AOPCP	ATP + dip/NBTI	ATP + AOPCP + dip/NBTI	Adenosine 25 μ M	Adenosine + EHNA	Adenosine + EHNA + dip/NBTI
ATP (μ M)	0.97 \pm 0.18	0.93 \pm 0.09	0.22 \pm 0.07*	0.26 \pm 0.03*	–	–	–
ADP (μ M)	7.27 \pm 0.09	5.23 \pm 0.41*	4.62 \pm 0.19*	11.1 \pm 0.58*	–	–	–
AMP (μ M)	1.17 \pm 0.15	3.93 \pm 0.15*	0.99 \pm 0.12	8.07 \pm 0.32*	–	–	–
adenosine (μ M)	2.67 \pm 0.03	0.27 \pm 0.04*	4.53 \pm 0.23*	3.33 \pm 0.88	17.57 \pm 0.43	28.37 \pm 0.37*	36.17 \pm 1.00*
inosine (μ M)	0.5 \pm 0.15	0.23 \pm 0.09	3.69 \pm 0.41*	3.33 \pm 0.13*	7.91 \pm 0.17	0.43 \pm 0.03*	2.57 \pm 0.22*

Purinergic compounds resulting from degradation of exogenous ATP or adenosine (25 μ M) were identified by selective HPLC analysis of the incubation medium collected after 30 min of incubation. AOPCP 100 μ M, and EHNA 10 μ M were used to inhibit ecto-5' nucleotidase and adenosine deaminase activities, and dipyrindimole/NBTI 10 μ M were used to inhibit nucleoside uptake. *Different from respective control ($p < 0.05$).

bation medium (Table 2). Adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine were present in both cell types after 60 min of incubation, besides some non-identified peaks. In both cellular preparations, the following compounds were tested and not found: ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, IMP, uric acid, allantoin, deoxy-inosine, cAMP, UTP, and UDP. Lactate dehydrogenase activity was also absent in all preparations.

Once extracellular ATP was not detected in these cells, we verified if extracellular adenosine and inosine may be produced from ATP by the action of ectonucleotidases. Kinetics of disappearance of exogenous extracellular ATP (25 μ M) showed an elevated production of adenosine in the two cellular types (Figs 3A and 3B), which is significantly decreased in the presence of AOPCP (Table 3). However, when dip/NBTI were added in cells with ecto-5'-nucleotidase inhibited, the values

of adenosine and inosine were higher than that obtained with AOPCP alone, although still lower than it is without any treatment (Table 3). The rate of adenosine (25 μ M) deamination was

Table 2. Extracellular purines released by germinative and peritubular cells

	Germ cells	Peritubular cells
Adenosine	0.02 \pm 0.008	0.37 \pm 0.056
Inosine	0.35 \pm 0.023	0.25 \pm 0.054
Hypoxanthine	0.28 \pm 0.021	0.92 \pm 0.021
Xanthine	0.48 \pm 0.047	0.84 \pm 0.011

Extracellular purines from seminiferous tubules, germinative and peritubular cells cultured for 1 h. Results are expressed in nmol/mg protein. Peaks were identified by addition of standard solutions in samples. Data are representative of 3 experiments ($n = 3$).

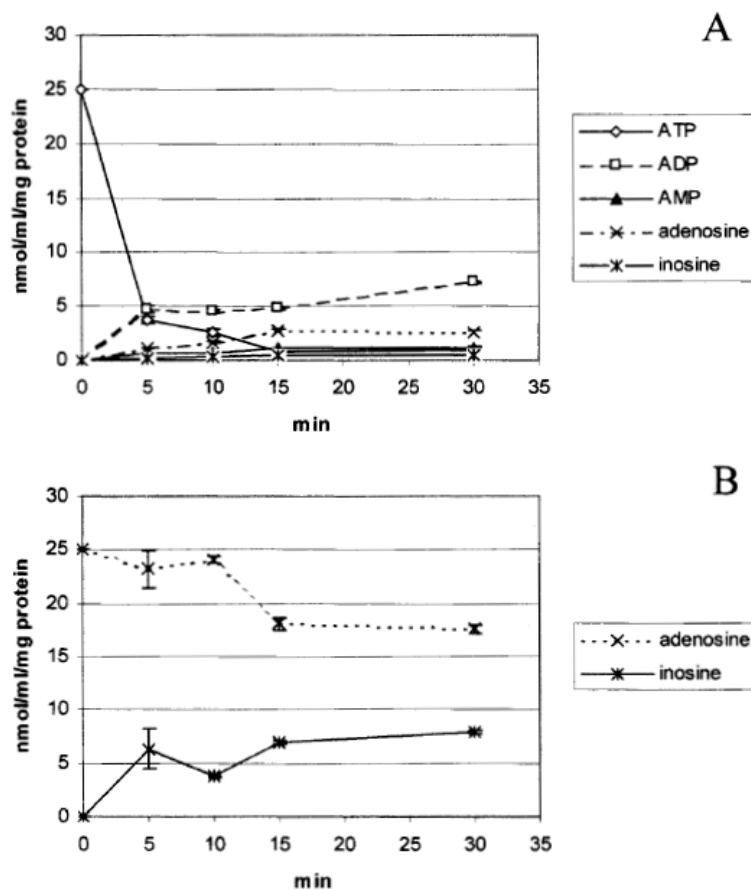


Fig. 2. Kinetics of extracellular ATP and adenosine degradation in Sertoli cells. Exogenous ATP (A) or adenosine (B) 25 μ M were added in the incubation medium. Kinetics of appearance/disappearance of their metabolites during 30 min was evaluated by HPLC analysis. Each point represents mean \pm S.E.M. of three experiments ($n = 3$).

also slow in the two preparations (Figs 3C and 3D), and the presence of inosine persisted even when both cellular types were treated with EHNA (Table 3), although its concentrations have diminished. In cells treated with EHNA and dip/NBTI, inosine concentrations were significantly higher than in cells with EHNA alone.

Discussion

As described above, the presence of purinergic receptors in testis has been reported by many authors, as well as the role of the extracellular purines as mediators of signaling pathways in cells of the male reproductive system [4, 6–11]. Several models have been proposed for paracrine communication

mediated by extracellular ATP and/or adenosine between the different cell types of the seminiferous tubules, principally Sertoli and germinative cells. It was demonstrated that extracellular ATP inhibits some FSH-dependent effects on Sertoli cells – with an EC_{50} of approximately 9 μ M [9, 10], and it has been suggested that germinative cells may modulate the function of Sertoli cells by secreting ATP, which also causes an increase in calcium levels in Sertoli cells by activating P_2 receptors [11, 35].

Conti *et al.* [5] suggested that germinative cells are able to release adenosine into the extracellular space of seminiferous tubules, in response to changes in their intracellular ATP pool. The activation of adenosine receptors of Sertoli cells, consequently, might result in an increase in energy supply and oxygen available to the germinative cells. However, these models of metabolic integration and coordination between germina-

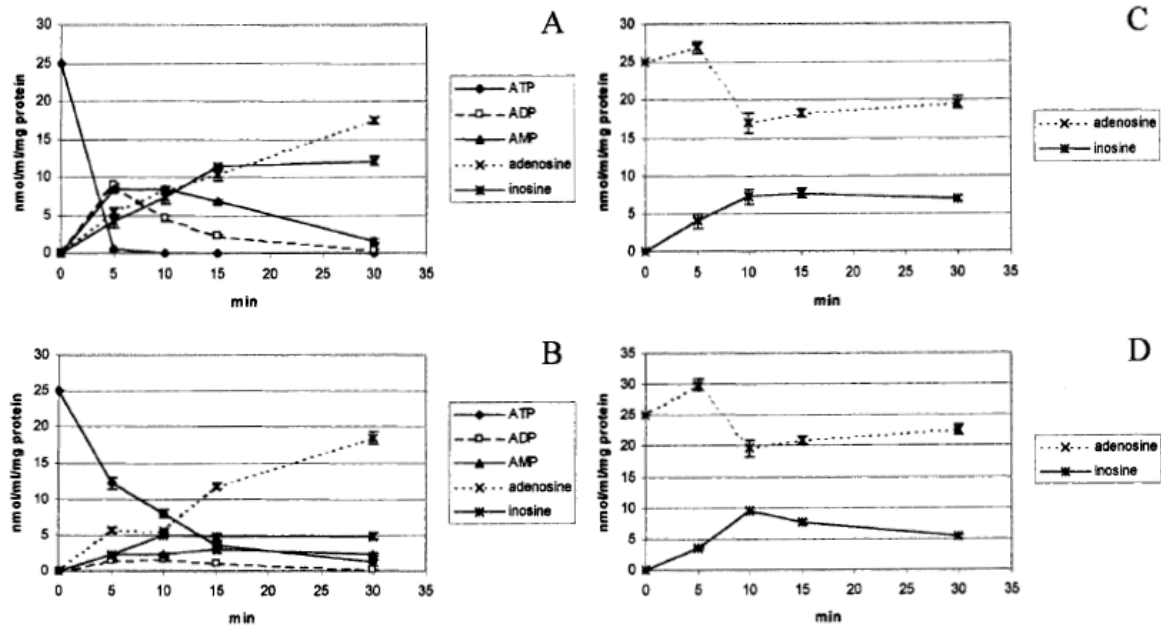


Fig. 3. Kinetics of extracellular ATP and adenosine degradation in germinative and peritubular cells. Cells were incubated with ATP or adenosine and the incubation medium was analyzed by HPLC. (A) germinative cells + ATP 25 μ M; (B) peritubular cells + ATP 25 μ M; (C) germinative cells + adenosine 25 μ M; (D) peritubular cells + adenosine 25 μ M. Each point represents mean \pm S.E.M. of three experiments ($n = 3$).

Table 3. Degradation of exogenous ATP or adenosine in germinative and peritubular cells

	ATP 25 μ M	ATP + AOPCP	ATP + AOPCP + dip/NBTI	Adenosine 25 μ M	Adenosine + EHNA	Adenosine + EHNA + dip/NBTI
<i>Germ cells</i>						
ATP (μ M)	0.03 \pm 0.02	5.31 \pm 1.64*	6.48 \pm 1.17*	—	—	—
ADP (μ M)	0.29 \pm 0.22	2.97 \pm 0.34*	3.29 \pm 1.02*	—	—	—
AMP (μ M)	1.62 \pm 0.22	25.60 \pm 0.60*	24.27 \pm 1.53*	—	—	—
Adenosine (μ M)	17.51 \pm 0.43	2.06 \pm 0.08*	4.19 \pm 0.90 [‡]	19.09 \pm 1.51	31.52 \pm 2.31*	32.26 \pm 1.25*
Inosine (μ M)	12.19 \pm 0.55	2.43 \pm 0.14*	4.81 \pm 0.86 [‡]	6.91 \pm 0.42	1.12 \pm 0.95*	4.41 \pm 0.31 [§]
<i>Peritubular cells</i>						
ATP (μ M)	1.17 \pm 0.44	0.6 \pm 0.12	1.37 \pm 0.18	—	—	—
ADP (μ M)	0.22 \pm 0.02	2.33 \pm 0.35*	3.17 \pm 0.44*	—	—	—
AMP (μ M)	2.23 \pm 0.19	17.5 \pm 0.68*	16.27 \pm 0.43*	—	—	—
Adenosine (μ M)	18.47 \pm 0.84	0.6 \pm 0.06*	3.13 \pm 0.35 [‡]	22.63 \pm 0.81	34.5 \pm 0.31*	37.26 \pm 0.29*
Inosine (μ M)	4.84 \pm 0.43	0.62 \pm 0.04*	1.86 \pm 0.15 [‡]	5.33 \pm 0.35	1.47 \pm 0.29*	3.4 \pm 0.21 [§]

Purineric compounds resulting from degradation of exogenous ATP or adenosine (25 μ M) were identified by selective HPLC analysis of the incubation medium collected after 30 min of incubation. AOPCP 100 μ M and EHNA 10 μ M were used to inhibit ecto-5' nucleotidase and adenosine deaminase activities, and dipyrindamole/NBTI 10 μ M were used to inhibit nucleoside uptake. *Different from respective control. [‡]Different from AOPCP treatment. [§]Different from EHNA treatment ($p < 0.05$).

tive and Sertoli cells were never supported by experimental evidence of the secretion of purines by any of these cells.

In this study, we demonstrated the presence of purines in the extracellular medium of the cells of seminiferous tubules from immature rats. Although it could be possible that the

purines detected were released from damaged cells, the absence of LDH activity in the incubation medium, analyzed in all the experiments, indicates that purineric content was not derived from cytolysis. No extracellular guanine nucleotides and nucleosides were detected in the cellular types stud-

ied, indicating that purinergic paracrine communication into the seminiferous tubules of immature rats is probably mediated only by adenine-based purines.

Extracellular medium of Sertoli cells presents a relatively constant concentration of ATP (about 80–100 nM). Since we found a considerable rate of ATP degradation by these cells, when incubated with the exogenous nucleotide added, it seems clearly reasonable to suggest that both release and subsequent hydrolysis of ATP are very important to maintain these concentrations. The ectonucleotidases present on its surface seem to play a central role in the control of the steady-state concentrations of ATP in the extracellular space. Indeed, data from the assays carried out in the presence of the inhibitor of ecto-5'-nucleotidase (AOPCP), seem to indicate that the degradation of ATP is not essential for the appearance of extracellular adenosine and/or inosine; when the re-uptake of these nucleosides is inhibited by dipyrindamole and NBTI, adenosine as well as inosine increases on the extracellular medium of Sertoli cells, even if the dephosphorylation of AMP is blocked. Therefore, the concentration of extracellular adenosine found seems to be resulting from the degradation of nucleotides, its own release/uptake and the deamination to inosine.

On the other hand, the high levels of inosine found do not appear to agree with the rate of adenosine deamination observed in the experiments in which exogenous adenosine is added. Indeed, with concomitant inhibition of adenosine deaminase and blockade of nucleoside uptake, the extracellular levels of inosine found were similar to that observed in the release assay. These data seem to suggest that the inosine found in the extracellular medium of Sertoli cells is due to its own secretion and not to extracellular metabolism. Physiologic importance of this process is up to here unknown, but some works have described new findings on the biological functions of inosine: recent reports revealed that in mast cells this nucleoside can interact with A_3 purinoceptors [44, 45], leading to an extravasation of serum proteins; activation of these receptors also leads to activation of protein kinase B in basophilic leukemia 2H3 mast cells [46].

As was suggested by Conti *et al.* [5], we found adenosine (besides inosine, hypoxanthine and xanthine) in the extracellular space of germinative cells. Peritubular cells demonstrated the same pattern in their pool of extracellular purines, but the concentration of adenosine was higher. Unlike Sertoli cells, these cellular types had a high production and accumulation of extracellular adenosine when incubated with exogenous added ATP – as we verified in the kinetic assay. This concentration significantly diminished when ecto-5'-nucleotidase was inhibited: in this condition, concentrations of adenosine and inosine decreased 8- and 5-fold, respectively, in germinative cells, while in peritubular cells both nucleosides almost completely disappeared. However, concomitant treatment of AOPCP and dip/NBTI caused an ac-

cumulation of adenosine and inosine in both cell types, indicating that other route, in addition to extracellular AMP dephosphorylation, may generate these nucleosides. Furthermore, in assays carried out to evaluate the kinetics of adenosine degradation in both cell types, the adenosine is partially converted to inosine (20–24%). When the adenosine deaminase was inhibited, the inosine concentration decreased to values similar to that found without the adenosine addition. Blockade of nucleoside uptake caused an accumulation of inosine, even in the presence of EHNA – indicating an efflux of this nucleoside. Although these data could suggest that extracellular adenosine and inosine found are mainly released by these cellular types, it may not be discharged that the production of these nucleosides is related to the release and subsequent degradation of ATP, since the high rate of hydrolysis of this nucleotide can explain its absence in both germinative and peritubular cell preparations. Also, it is important to note that, neither in binding experiments [6] nor in the study of expression of receptors [4], adenosine receptors were found in peritubular cells, nor P2 receptors have been demonstrated to date in this cell type [47].

The concentration of adenosine found in the incubation medium of germinative and peritubular cells after 1 h of incubation (7 and 123 nM, respectively) suggests that these cells are able to trigger A_1 purinoceptors-dependent responses of Sertoli cells; it is known that low concentrations of extracellular adenosine inhibit estrogen production in Sertoli cells, with an IC_{50} of 100 nM [48] – furthermore, it is known that binding experiments with synthetic agonists of A_1 receptors indicated an affinity of 1–3 nM [6]. This and other responses induced by adenosine in Sertoli cells could play an important role in regulating the metabolic function of germ cells and, consequently, in their maturation processes. Extracellular ATP concentrations found in Sertoli cells (100 nM), in contrast, do not seem to be correlated to autocrine P2 receptors triggering, once the EC_{50} described for these receptors varies from 1 to 300–400 μ M [49]. However, it should be remembered that *in vivo*, under the influence of other signals, these concentrations can be modulated.

A point that also deserves special attention is the presence of extracellular inosine in all cell types studied. As mentioned above, recent reports have related unknown physiologic functions exerted by this nucleoside – mainly by activation of A_3 receptors. Considering that germinative cells possess A_3 purinoceptors that inhibit adenylyl cyclase activity [4], it remains to be determined whether extracellular inosine can induce functional changes through activation of these receptors.

In conclusion, this is the first work showing the release of purine-based nucleotides, nucleosides and their metabolites by the cells of the seminiferous tubules; the exact role of these compounds in paracrine and autocrine signaling of these cells and in the regulation of their maturation remains to be clearly determined.

Acknowledgements

We would like to thank Drs Diogo O. Souza and Diogo Lara for their helpful advice and technical assistance on HPLC, and Dr. Richard Rodnigh for the critical review of the manuscript. CNPq and PROPESQ-UFRGS supported this work.

References

- Dubyak GR, El-Moatassim C: Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577–C606, 1993
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi R: Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587–600, 2000
- Katzur AC, Koshimizu TA, Tomic M, Schultze-Mosgau A, Ortmann O, Stojilkovic SS: Expression and responsiveness of P2Y₂ receptors in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4085–4091, 1999
- Rivkees SA: Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 135: 2307–2313, 1994
- Conti M, Boitani C, Demanno D, Migliaccio S, Monaco L, Szymeczek C: Characterization and function of adenosine receptors in the testis. *Ann NY Acad Sci* 564: 39–47, 1989
- Monaco L, Conti M: Localization of adenosine receptors in rat testicular cells. *Biol Reprod* 35: 258–266, 1986
- Stiles GL, Pierson G, Sunay S, Parsons WJ: The rat testicular adenosine A₁ receptor-adenylate cyclase system. *Endocrinology* 119: 1845–1851, 1986
- Monaco L, DeManno DA, Martin MW, Conti M: Adenosine inhibition of the hormonal response in the Sertoli cell is reversed by Pertussis toxin. *Endocrinology* 122: 2692–2698, 1988
- Filippini A, Riccioli A, De Cesaris P, Panicia R, Teti A, Stefanini M, Conti M, Ziparo E: Activation of inositol phospholipid turnover and calcium signaling in rat Sertoli cells by P2-purinergic receptors: Modulation of follicle-stimulating hormone responses. *Endocrinology* 134: 1537–1545, 1994
- Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Scheingart HF, Cigorraga SB: Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells. *J Endocrinol* 157: 275–283, 1998
- Foresta C, Rossato M, Bordon P, Di Virgilio F: Extracellular ATP activates different signaling pathways in rat Sertoli cells. *Biochem J* 311: 269–274, 1995
- Wong PY: Control of anion and fluid secretion by apical P2-purinergic receptors in the rat epididymis. *Br J Pharmacol* 95: 1315–1321, 1988
- Wu WL, So SC, Sun YP, Chung YW, Grima J, Wong PY, Yan YC, Chan HC: Functional expression of P2U receptors in rat spermatogenic cells: Dual modulation of a Ca(2+)-activated K⁺ channel. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 728–732, 1998
- Minelli A, Allegrucci C, Piomboni P, Manucci R, Lluís C, Franco R: Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. *J Histochem Cytochem* 48: 1163–1171, 2000
- Fenichel P, Gharib A, Emiliozzi C, Donzeau M, Menezo Y: Stimulation of human sperm during capacitation *in vitro* by an adenosine agonist with specificity for A2 receptors. *Biol Reprod* 54: 1405–1411, 1996
- Fraser LR: Adenosine and its analogues, possibly acting at A2 receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J Reprod Fertil* 89: 467–476, 1990
- Fraser LR, Duncan AE: Adenosine analogues with specificity for A2 receptors bind to mouse spermatozoa and stimulate adenylyl cyclase activity in uncapacitated suspensions. *J Reprod Fertil* 98: 187–194, 1993
- Glass R, Bardinini M, Robson T, Burnstock G: Expression of nucleotide P2X receptor subtypes during spermatogenesis in the adult rat testis. *Cells Tissues Organs* 169: 377–387, 2001
- Jégou B, Sharpe RM: Paracrine mechanisms in testicular control. In: D. de Krester (ed). *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, 1993, pp 271–310
- Dym M, Fawcett DW: The blood–testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3: 308–326, 1970
- Plöen L, Setchell BP: Blood–testis barriers revisited. A homage to Lennart Nicander. *Int J Androl* 15: 1–4, 1992
- Jutte NHPM, Grootegoed JA, Rommerts FFG, van der Molen HJ: Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fert* 62: 399–405, 1981
- Mita M, Price JM, Hall PF: Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. *Endocrinology* 110: 1535–1541, 1982
- Jutte NHPM, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FFG, van der Molen HJ: FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fert* 68: 219–226, 1983
- Jutte NHPM, Eikvar L, Levy FO, Hansson VM: Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells. *J Reprod Fert* 73: 497–503, 1985
- Le Magueresse B, Jégou B: *In vitro* effects of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages. *Endocrinology* 122: 1672–1680, 1988
- Verhoeven G, Cailleau J: Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that inhibits induction of aromatase activity in Sertoli cells. *Endocrinology* 123: 2100–2110, 1988
- Welsh MJ, Ireland ME: The second messenger pathway for germ cell-mediated stimulation of Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 217–224, 1992
- Onoda M, Djakiew D: A 24,500 Da protein derived from rat germ cells is associated with Sertoli cell secretory function. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 688–695, 1993
- Grima J, Pineau C, Bardin CW, Cheng CY: Rat Sertoli cell clusterin, α₂-macroglobulin, and testins: Biosynthesis and differential regulation by germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 89: 127–140, 1992
- Shubhada S, Glinz M, Lamb DJ: Sertoli cell secreted growth factor – cellular origin, paracrine and endocrine regulation of secretion. *J Androl* 14: 99–109, 1993
- Pineau C, Syed V, Bardin CW, Jégou B, Cheng CY: Identification and partial purification of a germ cell factor that stimulates transferrin secretion by Sertoli cells. *Recent Prog Horm Res* 48: 539–542, 1993
- Norton JH, Vigne JL, Skinner MK: Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PmodS: Analysis of common signal transduction pathways. *Endocrinology* 134: 149–157, 1994
- Casali EA, da Silva TR, Gelain DP, Kaiser GRRF, Battastini AMO, Sarkis JF, Bernard EA: Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats. *Braz J Med Biol Res* 34: 1247–1256, 2001
- Lalevéé N, Rogier C, Becq F, Joffre M: Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 61: 343–352, 1999
- Shabanowitz RB, Kierszenbaum AL: Newly synthesized proteins in seminiferous intertubular and intratubular compartments of the rat testis. *Biol Reprod* 35: 179–190, 1986

37. Rocha AB, Guma FCR, Casali EA, Scherer GS, Elena MA, Bernard EA: Influence of the biomatrix on the response of Sertoli cells to FSH. *Arch Physiol Biochem* 105: 473–477, 1997
38. Tung PS, Fritz IB: Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotypic expression *in vitro*. *Biol Reprod* 30: 213–229, 1984
39. Syed V, Hecht NB: Up-regulation and down-regulation of genes expressed in cocultures of rat Sertoli cells and germ cells. *Mol Reprod Dev* 47: 380–389, 1997
40. Meistrich ML, Longtin J, Brock WA, Grimes SR Jr, Mace ML: Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod* 25: 1065–1077, 1981
41. Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'alimonte I, Ballerini P, Caciagli F, Rathbone M: Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93–98, 1999
42. Cunha RA, Sebastião AM, Ribeiro JA: Separation of adenosine-triphosphate and its degradation products in innervated muscle of the frog by reverse phase high-performance liquid-chromatography. *Chromatographia* 28: 610–612, 1989
43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
44. Jin X, Shepperd RK, Duling BR, Linden J: Inosine binds to A₃ receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest* 100: 2849–2857, 1997
45. Tilley SL, Wagoner VA, Salvatore CA, Jacobson MA, Koller BH: Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A₃ receptors on mast cells. *J Clin Invest* 105: 361–367, 2000
46. Gao Z, Li BS, Day YJ, Linden J: A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol Pharmacol* 59: 76–82, 2001
47. Lu Q, Porter LD, Cui X, Sanborn BM: Ecto-ATPase mRNA is regulated by FSH in Sertoli cells. *J Androl* 22: 289–301, 2001
48. Monaco L, Toscano MV, Conti M: Purine modulation of the hormonal response of the rat Sertoli cell in culture. *Endocrinology* 115: 1616–1624, 1984
49. Burnstock G, Williams M: P2 purinergic receptors: Modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 862–869, 2000

Capítulo III

Secreção de purinas extracelulares por células germinativas de ratos adultos e fragmentos de túbulos seminíferos de ratos imaturos e adultos

1. INTRODUÇÃO

No trabalho apresentado no capítulo II desta dissertação, nós demonstramos que células constituintes de túbulos seminíferos de ratos imaturos, quando isoladas, são capazes de liberar purinas extracelulares para o meio de incubação. Os diferentes tipos celulares estudados – as células de Sertoli, germinativas e peritubulares – demonstraram perfis qualitativos distintos de secreção, especialmente as células de Sertoli em comparação com os outros dois tipos celulares. No entanto, em uma condição *in vivo*, estes tipos celulares encontram-se intimamente relacionados na constituição anatômica dos túbulos seminíferos, o que poderia modificar drasticamente o perfil de purinas extracelulares, devido às influências que estas células exercem umas sobre as outras nesta condição.

Para esclarecer esta questão, nós investigamos qual o perfil de purinas liberado para o meio de incubação por fragmentos de túbulos seminíferos de ratos imaturos, onde os três tipos celulares estudados no capítulo II apresentam-se na mesma condição de associação anatômica que aquela encontrada *in vivo*. Além disso, com o objetivo de traçar um quadro comparativo entre o conteúdo de purinas extracelulares liberadas por células testiculares de ratos em diferentes estágios de maturidade sexual, nós comparamos as purinas encontradas nas preparações de túbulos seminíferos de ratos imaturos com o perfil encontrado em preparações de túbulos seminíferos de ratos adultos (90 dias de idade). Como o tipo celular predominante em túbulos seminíferos de ratos adultos é a célula germinativa, nós também realizamos preparações de células germinativas de ratos desta idade, e comparamos o perfil de purinas liberadas por estas células com aquele encontrado nos túbulos seminíferos de ratos da mesma idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação de túbulos seminíferos.

Segmentos de túbulos seminíferos de ratos imaturos ou adultos foram coletados mecanicamente, conforme descrito por Shabanowitz & Kierszenbaum (1986). Os testículos foram removidos, descapsulados, e colocados em uma placa de Petry contendo solução salina balanceada de Hanks sem corante (HBSS s/c). Cada segmento (2-6 mm de comprimento) foi coletado direto da placa individualmente e lavado sequencialmente em placas contendo HBSS s/c, a fim de remover células intersticiais. Os segmentos foram então usados para incubação, na relação de aproximadamente 1 mg proteína/ml, com o mesmo tampão, em tubos de ensaio, durante 60 minutos, em atmosfera humidificada, 5% CO₂ e 34°C. O conteúdo purinérgico do meio de incubação foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), como descrito no trabalho anterior. A integridade celular foi medida pela dosagem da atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação, usando um kit comercial Sigma.

2.2. Extração de células germinativas

Para comparar o perfil de purinas extracelulares de células germinativas de ratos imaturos (18 dias de idade) com o perfil de células obtidas de ratos adultos (90 dias de idade), foram utilizados os mesmos procedimentos de extração, ensaio e quantificação de purinas extracelulares descritos na seção de “Material e Métodos” do artigo do capítulo II, utilizando ratos de 90 dias de idade. Atividade da LDH foi usada como marcador de rompimento da membrana plasmática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por HPLC das purinas do meio de incubação de túbulos seminíferos de ratos imaturos (fig.1) demonstrou a presença de ATP, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico. Já no meio extracelular de túbulos seminíferos de ratos adultos foram encontradas as mesmas purinas, com exceção do ATP, mas em maior concentração. Além disso, foi detectada a presença de GTP no meio de incubação dos túbulos de ratos adultos, sendo que este nucleotídeo não foi detectado em túbulos de ratos imaturos nem em qualquer outra preparação celular de testículos de ratos dessa idade.

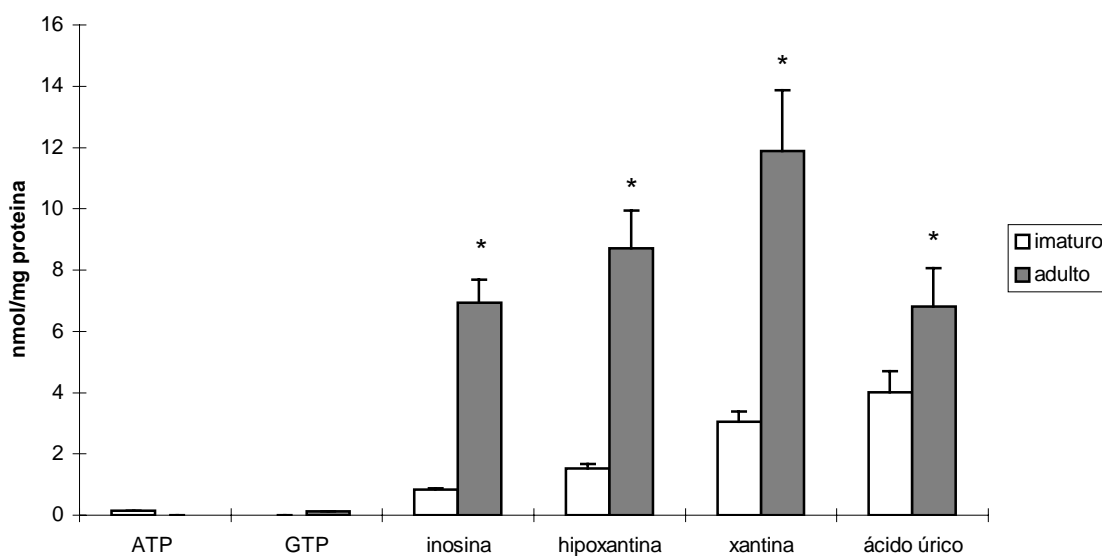


Figura 1. Purinas extracelulares de túbulos seminíferos de ratos imaturos e adultos. O conteúdo purinérgico liberado durante 1 hora de incubação foi analisado por HPLC. Dados representativos de 3 experimentos realizados em triplicata. Cada barra representa média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, ANOVA, Tukey's *post hoc*.

Diferentemente do que foi observado com células germinativas de ratos imaturos (cap. II, tabela I), a análise do meio de incubação de células germinativas obtidas de ratos adultos demonstrou a presença de GTP, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico. A tabela 1

demonstra as concentrações das purinas extracelulares detectadas nestas células, em comparação com os valores obtidos com células de ratos imaturos, demonstrados no capítulo II.

Tabela 1 - Purinas extracelulares em células germinativas de ratos imaturos e adultos

	imaturos	adultos
GTP	ND	0,56 ± 0,025
adenosina	0,02 ± 0,008	ND
inosina	0,35 ± 0,023	1,36 ± 0,41
hipoxantina	0,28 ± 0,021	1,51 ± 0,25
xantina	0,48 ± 0,047	3,11 ± 0,67
ácido úrico	ND	1,95 ± 0,29

Purinas extracelulares de células germinativas obtidas de ratos Wistar imaturos (18 dias) e adultos (90 dias) incubadas por 60 minutos. As purinas foram identificadas por HPLC, e os resultados estão expressos em nmol/mg de proteína. Dados representativos de 3 diferentes experimentos realizados em triplicata (n=3). Cada valor representa média ± erro padrão. ND= não detectado.

Estes resultados demonstram, em primeiro lugar, uma importante diferença entre os compostos purinérgicos extracelulares em túbulos de ratos de diferentes idades, não apenas de forma quantitativa - as concentrações de inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico são significativamente maiores em túbulos de ratos adultos do que de imaturos (fig. 1) - mas também qualitativa: foram detectadas baixas concentrações de ATP no meio de incubação de túbulos seminíferos de ratos imaturos, enquanto que em túbulos de ratos adultos não foi detectado este nucleotídeo, mas sim o GTP, também em baixas concentrações.

Analisando o conteúdo purinérgico liberado por células germinativas obtidas de ratos adultos (tabela 1), foi detectado um perfil semelhante ao dos túbulos seminíferos de ratos da idade correspondente. Comparando com os dados obtidos com células germinativas de ratos imaturos, nós percebemos que as células germinativas de ratos adultos possuem uma concentração maior de metabólitos purinérgicos (inosina, hipoxantina e xantina), sendo que há também a presença de ácido úrico e GTP, que não foram detectados em células de ratos

imatuos. No entanto, não foi detectada a presença de adenosina nas células germinativas de ratos adultos, como foi demonstrado nas células correspondentes em ratos imatuos.

Capítulo IV

Discussão Geral

1. Considerações gerais

Neste trabalho demonstramos a presença e degradação de purinas no meio extracelular de túbulos seminíferos e de seus componentes celulares isolados. Como citamos anteriormente, diversos autores têm sugerido modelos de comunicação parácrina mediada por agonistas purinérgicos entre células de Sertoli e germinativas, com implicações na regulação da espermatogênese. Os dados obtidos neste trabalho nos permitem realizar algumas observações sobre estes modelos. A primeira constatação é a de que a presença de nucleotídeos (ATP, ADP, GTP), nucleosídeos (adenosina, inosina) e seus produtos de degradação (hipoxantina, xantina e ácido úrico) no meio de incubação de fragmentos de túbulos seminíferos, bem como nas preparações de células de Sertoli, germinativas e peritubulares isoladas, nos indica que todas estas células são capazes de liberar espontaneamente purinas. O fato de existirem diferenças quantitativas e qualitativas entre os perfis de purinas liberadas por estas células indica que, provavelmente, estas moléculas estejam envolvidas em processos de sinalização celular no interior dos túbulos seminíferos. Esta observação, em primeiro lugar, contraria as inferências de alguns autores de que seriam as terminações nervosas dos testículos as principais fontes de liberação destas moléculas no sistema reprodutor masculino [Foresta et al., 1995; Rossato et al., 2001]. Além disso, sugere que as células constituintes dos túbulos seminíferos podem regular reciprocamente suas funções através da liberação de agonistas purinérgicos e ativação de seus respectivos receptores, de maneira autônoma, uma vez que tem sido extensamente demonstrada a capacidade destas purinas de influenciar vários processos importantes nestas células. A ausência de atividade da enzima citosólica LDH no meio de incubação demonstra que estes compostos não provêm de uma possível ruptura celular (dados não mostrados).

2. Distinção do perfil de purinas extracelulares com o tipo celular

Observa-se uma clara distinção do perfil de purinas extracelulares de acordo com o tipo celular analisado. Esta observação tem relevância se percebermos que as células germinativas e de Sertoli possuem distintos receptores purinérgicos que, segundo diversos autores, podem estar relacionados tanto à liberação de fatores essenciais às células germinativas pelas células de Sertoli [Conti et al., 1989] como também poderiam estar relacionados à regulação das próprias funções das células de Sertoli relacionadas à manutenção da espermatogênese, como a resposta ao FSH [Monaco & Conti, 1986; Filippini et al., 1994]. Foi demonstrado que a ativação de receptores para ATP inibe o aumento de AMPc induzido por este hormônio, sendo que o IC₅₀ observado para este efeito foi de aproximadamente 9 µM [Filippini et al., 1994]. Apesar de muitos autores terem sugerido que as células germinativas poderiam controlar algumas funções das células de Sertoli pela secreção de ATP e consequente ativação de receptores P2 [Foresta et al., 1995; Lalevéé et al., 1999; Rossato et al., 2001; Filippini, 1994], nossos dados sugerem que é mais provável que o ATP extracelular exerça uma função de controle autócrino nas respostas das células de Sertoli ao FSH - como já foi especulado por Lalevéé et al., [1999], em seu estudo sobre os perfis de aumento de cálcio citosólico induzido por ATP, FSH e AMPc. Os nossos dados reforçam esta sugestão, já que mostram a presença de ATP no meio de incubação de células de Sertoli e não em germinativas, além da alta atividade ecto-ATPásica presente nas preparações de células germinativas. Esta observação nos indica que, a menos que a atividade ATPásica seja diminuída, através de uma possível regulação exercida por outros fatores autócrinos/parácrinos, em uma condição *in vivo* - o que é bem plausível - é muito difícil que as células germinativas consigam ativar receptores para ATP em células de Sertoli, mesmo sendo capazes de liberar estas moléculas. O mesmo vale para as

células peritubulares, onde encontramos perfil semelhante. Além deste efeito sobre a resposta ao FSH, foi descrito que o ATP extracelular aumenta a concentração citoplasmática de cálcio, através da produção de fosfoinosítídeos via fosfolipase C, e do influxo de cálcio extracelular via abertura de poros específicos na membrana [Filippini et al., 1994; Foresta et al., 1995]. Sabendo que o FSH também induz modificações nas concentrações de cálcio intracelular nas células de Sertoli [Lalevée et al., 1999; Ko et al., 2003], pode-se sugerir que o ATP também atue como um regulador autócrino na modulação das concentrações de cálcio pelo FSH.

No entanto, a hipótese de liberação de ATP e subsequente degradação por ectonucleotidases em células germinativas e peritubulares não pode ser simplesmente descartada, uma vez que a produção de adenosina extracelular em diversos tipos celulares está mais relacionada à degradação do ATP do que a liberação da adenosina *per se*, como tem sido demonstrado por diversos autores [Ralevic & Burnstock, 1998]. Em nossos experimentos com inibidores da ecto-5'-nucleotidase, α,β -metileno-ADP (AOPCP), e inibidores de captação de nucleosídeos, dipiridamole e S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina (dip/NBTI), nós constatamos que a degradação de ATP extracelular pode produzir quantidades significativas de adenosina e inosina, apesar de uma fração destes nucleosídeos ainda acumular-se no meio de incubação quando esta rota é inibida. Estes dados parecem indicar que a presença de adenosina e inosina no meio de incubação devem-se tanto à degradação de ATP liberado no meio de incubação como também à liberação direta de adenosina, a qual é posteriormente transformada em inosina pela ecto-adenosina deaminase.

Em relação à adenosina, foi observado que a ativação de receptores para este nucleosídeo, em células de Sertoli, atenua funções estimuladas pelo FSH, como a aromatização de andrógenos em estrógenos [Monaco & Conti, 1986; Monaco et al., 1984] e a secreção de piruvato [Conti et al., 1989]. Baseado nestas informações, Conti propôs que a ativação de

receptores de adenosina nas células de Sertoli estaria implicada na regulação das necessidades metabólicas das células germinativas [Conti et al., 1989], já que o metabolismo energético destas células é continuamente dependente da produção e secreção de metabólitos intermediários pelas células de Sertoli (lactato e piruvato). O modelo de Conti propõe que, um aumento na demanda energética das células germinativas, levaria a um aumento na secreção de adenosina, uma vez que o aumentado consumo de ATP intracelular resultaria em uma elevação da concentração de adenosina no citosol destas células; isto, por sua vez, acarretaria em aumento de transporte de adenosina para o meio extracelular através de transportadores equilibrativos de nucleosídeos. Esta adenosina transportada para o exterior das células germinativas seria capaz de ativar os receptores A_1 das células de Sertoli, os quais têm sido localizados justamente na região dos túbulos seminíferos correspondente à interface entre as células de Sertoli e germinativas [Conti, 1989; Rivkees, 1994]. Assumindo este modelo como correto, poderíamos sugerir que a adenosina é capaz de informar a célula de Sertoli sobre o *status* energético das células germinativas, e modificar as suas funções de acordo com essa condição.

Apesar deste modelo ser meramente especulativo, a observação de que a ativação dos receptores de adenosina em células de Sertoli é capaz de atenuar algumas de suas funções metabólicas, somadas com nossos dados demonstrando a presença de adenosina extracelular em células germinativas sob condições basais - embora em baixas concentrações, podem ser um indicativo do envolvimento da comunicação parácrina adenosinérgica na regulação das funções metabólicas das células germinativas pelas células de Sertoli.

3. Comparação entre as diferentes idades

Os dados provenientes da comparação entre o conteúdo purinérgico liberado por túbulos seminíferos extraídos de ratos de diferentes idades (18 dias e 90 dias - fig. 1, cap. III) chamam a atenção principalmente por dois fatores: primeiro, a secreção de ATP por túbulos de ratos imaturos, e de GTP por adultos; e segundo, a ausência de detecção de adenosina em ambas as preparações, mas com uma presença marcante de seus produtos de degradação enzimática: inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico. Para interpretar corretamente qualquer dado proveniente da comparação entre túbulos seminíferos imaturos e adultos, deve-se sempre levar em conta a principal diferença entre eles: a presença maciça de células germinativas em seus diversos estágios de maturação nos túbulos de animais adultos. Com cerca de 18 dias de idade, a população predominante de células nos túbulos seminíferos constitui-se de células de Sertoli, as quais estão cessando a divisão celular, iniciando sua maturação morfológica e diferenciação (constituindo a barreira hemato-testicular) e, segundo alguns autores, atingindo um estágio "bioquimicamente adulto" [Vitale-Calpe et al., 1973; Jégou et al., 1982; Lacroix et al., 1977]. Nessa idade as células da linhagem germinativa iniciam a divisão meiótica e começam a adentrar nos diferentes estágios da espermatogênese, aumentando o peso testicular - incluindo nesta relação as células intersticiais de Leydig - em aproximadamente 3000%, e constituindo cerca de 80% do volume do testículo adulto. Sendo assim, pareceu-nos razoável questionar se a maior proporção de células germinativas, em todos os seus diferentes estágios de maturação, nos túbulos adultos, seria responsável pela diferença no perfil de purinas extracelulares encontrada nas duas preparações. Os experimentos subsequentes nos indicaram que sim.

A análise do conteúdo purinérgico liberado por células germinativas extraídas de ratos adultos nos mostra um perfil semelhante ao encontrado em túbulos seminíferos de ratos adultos: presença de GTP, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico (cap. III, fig. 2). Levando-se em conta a grande quantidade de células germinativas nos túbulos seminíferos adultos, nós podemos concluir que o conteúdo purinérgico extracelular dos túbulos seminíferos de ratos adultos é influenciado principalmente pela secreção das células germinativas. Não existem dados disponíveis para inferir sobre a significância fisiológica da presença de GTP, ao invés de ATP, no meio de incubação de túbulos de ratos adultos; no entanto, perfil semelhante de secreção já foi descrito em astrócitos [Cicarelli et al., 1999].

Por outro lado, em células germinativas de ratos imaturos, foi detectada a presença de adenosina, inosina, hipoxantina e xantina (cap. II, tabela 2), enquanto que no meio de incubação de túbulos seminíferos de ratos imaturos foram encontrados ATP, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico (cap. III, fig.1). Neste caso, não podemos afirmar que as células germinativas são as principais secretoras destas moléculas, pois a população celular predominante em túbulos seminíferos de ratos desta idade é constituída por células de Sertoli. A ausência de detecção de adenosina em túbulos seminíferos pode ser explicada pela sua metabolização em outros produtos que foram detectados - inosina e hipoxantina, por exemplo - além da presença de outros tipos celulares, sendo que a liberação total de purinas por outras células predominantes, como as células de Sertoli, diluiria as já baixas concentrações de adenosina liberadas por células germinativas. Além disso, nós constatamos que as células de Sertoli isoladas são capazes de secretar todas os metabólitos de adenina encontrados no meio de incubação de túbulos seminíferos de ratos imaturos, ou seja, ATP, inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico (cap. II, fig. 1). Este dado nos sugere que o conteúdo purinérgico extracelular dos túbulos seminíferos de ratos imaturos deve-se principalmente à secreção destas

moléculas pelas células de Sertoli. Embora a análise do meio de incubação de culturas de células de Sertoli permita também a detecção de ADP, AMP e adenosina (cap. II, fig.1), que não foram detectados nos túbulos seminíferos de ratos imaturos, as altas taxas de degradação de ATP por ectonucleotidases e de adenosina pela ecto-adenosina deaminase observadas em células germinativas e peritubulares (cap. II, fig. 3) poderiam explicar a ausência de detecção destas purinas nas preparações de túbulos seminíferos.

Levando em consideração estas observações, nos é permitido traçar um quadro comparativo entre túbulos seminíferos de ratos adultos e imaturos, sendo que as purinas extracelulares predominantes no microambiente dos túbulos seminíferos provêm predominantemente das células de Sertoli até o período pré-púbere do rato, enquanto que na fase adulta – correspondente à maturidade sexual - teriam sua origem nas células germinativas. A significância fisiológica desta observação permanece a ser esclarecida.

Capítulo V

Conclusões e perspectivas

Com os dados apresentados nesta Dissertação de Mestrado, nós podemos concluir que as células de túbulos seminíferos são capazes de liberar purinas envolvidas em processos de sinalização celular, sob condições basais de incubação. Além disso, cada tipo celular apresenta um perfil de secreção particular. A ausência de nucleotídeos e nucleosídeos de guanina em quase todas as preparações – exceto naquelas provenientes de ratos adultos, onde se encontrou GTP – nos indica que a comunicação parácrina purinérgica nos túbulos seminíferos é mediada apenas por moléculas com base de adenina nos estágios de imaturidade sexual. O aparecimento de GTP em estágios adultos sugere que as mudanças nos estágios de maturidade sexual são acompanhadas por mudanças na comunicação parácrina purinérgica entre estas células, e este dado merece estudos mais aprofundados. As principais perspectivas abertas por este trabalho estão no estudo da modulação destas purinas (e vice-versa) por outros fatores relacionados à fisiologia testicular, como o FSH, testosterona, retinol e insulina, além de estudos mais aprofundados sobre o papel exato destas purinas na sinalização autócrina e parácrina destas células, bem como na regulação de seus processos metabólicos e na sua maturação.

Referências Bibliográficas

- Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *J. Physiol. (Lond.)* 204:317-322.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmac. Rev.* 24:509-581.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell DG, Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmac.* 40:668-688.
- Casali EA, da Silva TR, Gelain DP, Kaiser GRRF, Battastini AMO, Sarkis JJF, Bernard EA (2001) Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34:1247-1256.
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'alimonte I, Ballerini P, Caciagli F, Rathbone M (1999) Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25:93-98.
- Conti M, Boitani C, Demanno D, Migliaccio S, Monaco L, Szymeczek C (1989) Characterization and function of adenosine receptors in the testis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 564:39-47.
- Dubyak GR, El-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* 265:C577-C606.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)* 68:213-237.
- Eccles JC (1964) *The physiology of synapses.* Springer-Verlag, Berlin.
- Filippini A, Riccioli A, De Cesaris P, Paniccchia R, Teti A, Stefanini M, Conti M, Ziparo E (1994) Activation of inositol phospholipid turnover and calcium signaling in rat Sertoli cells by P2-purinergic receptors: modulation of follicle-stimulating hormone responses.

Endocrinology 134:1537-1545.

Foresta C, Rossato M, Bordon P, Di Virgilio F (1995) Extracellular ATP activates different signaling pathways in rat Sertoli cells. *Biochem. J.* 311:269-274.

Fraser LR (1990) Adenosine and its analogues, possibly acting at A2 receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J. Reprod. Fert.* 89:467-476.

Gillespie JH (1933) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol. (Lond.)* 80:345-349.

Glass R, Bardinini M, Robson T, Burnstock G (2001) Expression of nucleotide P2X receptor subtypes during spermatogenesis in the adult rat testis. *Cells Tissues Organs* 169:377-387.

Holton FA, Holton P (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of ATP in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 126:124-140

Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol. (Lond.)* 145:494-504.

Jégou B, Le Gac F, de Kretser DM (1982) Study on tubule fluid and interstitial fluid production. Effect of age and hormonal regulation in immature rats. *Biol. Reprod.* 27:590-595.

Jégou B, Sharpe RM (1993) Paracrine mechanisms in testicular control. En: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. De Kretser DM (ed), Academic Press, San Diego, 271-310.

Ko WH, Au CL, Yip CY (2003) Multiple purinergic receptors lead to intracellular calcium increases in cultured rat Sertoli cells. *Life Sci.* 72:1519-1535.

- Lalevée N, Rogier C, Becq F, Joffre M (1999) Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 61:343-352.
- Lacroix M, Smith FE, Fritz IB (1977) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 9:227-236.
- Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Schteingart HF, Cigorruga SB (1998) Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells. *J. Endocrinol.* 157:275-283, 1998.
- Minelli A, Allegrucci C, Piomboni P, Manucci R, Lluís C, Franco R (2000) Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 48:1163-1171.
- Monaco L, Conti M (1986) Localization of adenosine receptors in rat testicular cells. *Biol. Reprod.* 35:258-266.
- Monaco L, Toscano MV, Conti M (1984) Purine modulation of the hormonal response of the rat Sertoli cell in culture. *Endocrinology* 115:1616-1624.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413-492.
- Rivkees SA (1994) Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 135:2307-2313.
- Rossato M, Merico M, Bettella A, Bordon P, Foresta C (2001) Extracellular ATP stimulates estradiol secretion in rat Sertoli cells in vitro: modulation by external sodium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178:181-187.

- Shabanowitz RB, Kierszenbaum AL (1986) Newly synthesized proteins in seminiferous intertubular and intratubular compartments of the rat testis. *Biol. Reprod.* 35:179-190.
- Tilley SL, Wagoner VA, Salvatore CA, Jacobson MA, Koller BH (2000) Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A₃ receptors on mast cells. *J. Clin. Invest.* 105:361-367.
- Vitale-Calpe R, Fawcett DW, Dym M (1973) The normal development of the blood testis barrier and the effects of clomiphene and oestrogen treatment. *Anat. Rec.* 176:333-344.
- Welsh MJ, Ireland ME (1992) The second messenger pathway for germ cell-mediated stimulation of Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:217-224.
- Williams M, Risley EA (1980) Biochemical characterization of putative central purinergic receptors by using 2-chloro[3H]adenosine, a stable analog of adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6892-6896.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:299-309.