

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**PAPEL DOS CANAIS K^+_{ATP} NA RESPOSTA
ELETROFISIOLÓGICA AO FSH E AO ISOPROTERENOL
EM CÉLULAS DE SERTOLI**

LAUREN DE SOUZA OLIVEIRA

ORIENTADORA

PROF.^A. DR.^A. ELOÍSA DA SILVEIRA LOSS

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Porto Alegre, Abril, 2011.

Aos meus pais, que me proporcionaram a base essencial da educação, dos princípios morais, além de me estimularem a apoiar na busca pelo conhecimento e me amar incondicionalmente.

Ao meu amor, Paulo Vinícius Falkemback Zanatta, que desde sempre foi um grande incentivador do meu progresso, tanto pessoal como profissional.

Agradeço imensamente pelo apoio, atenção, carinho e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de pesquisa do LABENEX: Alexandre Luz de Castro, Bianca Moraes Fracasso, Gustavo Monteiro Escott, Laura Ayres, Marcell Villaverde Dielopor participarem desse trabalho;

À professora Eloísa Loss, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pela orientação, dedicação, apoio e solicitude;

À professora Ana Paula Jacobus, pela afabilidade e diligência ao transmitir o conhecimento;

Ao Professor Wassermann, pelo legado científico e estrutural;

À Uira, Dona Elsa e Alice pelo carinho e palavras de apoio;

Ao professor Marcelo Lacerda Grillo, pelas aulas expositivas, orientação do estágio de docência para a graduação, atenção e generosidade dispensadas;

À amiga Chris Danilevicz Krebs por me transmitir os ensinamentos básicos de laboratório e os referentes às técnicas utilizadas no LABENEX e auxiliar na fase de inserção no grupo de pesquisa;

À amiga Fernanda Carvalho Cavalari, por dividir as angústias e as conquistas desse período, pelo apoio e pela amizade de 15 anos;

Aos meus irmãos, Wagner e Vinícius, pela amizade e pelo companheirismo;

À minha cunhada, Betina, pela afabilidade;

Às minhas tias Solange e Sônia, pelo incentivo ao estudo;

Aos meus sogros Paulo e Senita, pela afeição a mim dedicada;

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 CÉLULA DE SERTOLI	16
1.2 FUNÇÕES DAS CÉLULAS DE SERTOLI	20
1.3 CONTROLE ADRENÉRGICO SOBRE OS TESTÍCULOS	23
1.4 HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)	25
1.5 ISOPROTERENOL.....	29
1.6 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR)	31
1.6.1 RECEPTOR DE FSH (FSHR).....	34
1.6.2 RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS (β -AR)	35
1.7 CANAIS IÔNICOS PRESENTES NAS CÉLULAS DE SERTOLI	36
1.7.1 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K+ATP).....	37
1.7.2 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (CCDV).....	40
2. OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.2 TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRB).....	46
3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	47
3.4 ELETROFISIOLOGIA.....	50
3.4.1 PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	50
3.4.2 PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO.....	52
3.4.3 EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO.....	53
3.4.4 CÁLCULO DA INTENSIDADE DO PULSO APLICADO.....	56

3.4.5 CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA.....	57
3.5 EXPERIMENTOS DE CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	57
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1 ENVOLVIMENTO DA ADENILATO CICLASE NA CAPTAÇÃO DE CÁLCIO ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) E NA AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO FSH SOBRE A CÉLULA DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.....	60
4.2 ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS Gi E Gs NA AÇÃO DO FSH NO POTENCIAL DE MEMBRANA E NA CAPTAÇÃO DE CÁLCIO PELAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.....	61
4.3 EFEITO DE SULFONILUREIAS SOBRE A RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DO ISOPROTERENOL NAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS.....	61
4.4 AÇÃO DA TOXINA PERTUSSIS (PTX) SOBRE O EFEITO ELETROFISIOLÓGICO DO ISOPROTERENOL E A CAPTAÇÃO DE CÁLCIO.....	66
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

LH: Hormônio Luteinizante

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

LHRH: Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

SSN: Nervos Espermáticos Superiores

ISN: Nervos Espermáticos Inferiores

TH: Tirosina Hidroxilase

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

N-terminal: Terminal Amino

C-terminal: Terminal Carboxila

α : alfa

β : beta

γ : gama

GDP: Guanosina difosfato

GTP: Guanosina Trifosfato

$^{45}\text{Ca}^{2+}$: íon cálcio marcado radiotivamente

AMPC: Adenosina monofosfato cíclica

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

PIK₃: Fosfatidil Inositol-3-quinase

CCDV: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem

K⁺_{ATP}: Canais de Potássio Dependentes de ATP

K_{ir}: Canais de Potássio Retificadores de Influxo

ATP: Adenosina Trifosfato

ADP: Adenosina Difosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

Ag: Prata

AgCl: Cloreto de Prata

KCl: Cloreto de Potássio

pH: Potencial de Hidrogênios

KRb: Solução de Krebs

PLC: Fosfolipase C

DAG: Diacilglicerol

IP₃: Inositol-3,4,5-Trifosfato

PI: Fosfatidil Inositol

PIP: Fosfatidil Inositol-4-Fosfato

PIP₂: Fosfatidil Inositol-4,5-Bisfosfato

MgADP: Magnésio ligado a Adenosina Difosfato

SUR: Receptor de Sulfoniluréia

NBF: Sítio de Ligação a nucleotídeo

ABC: Proteínas cassete

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Microambiente testicular, evidenciando o epitélio seminífero em células de Sertoli e células germinativas.....	18
Figura 2 Representação esquemática da célula de Sertoli (CS), do fluido ou líquido intersticial (FI) e do fluido tubular seminífero (FTS).....	19
Figura 3 Padrão de glicosilação das subunidades dos hormônios glicoprotéicos.....	28
Figura 4 Figura esquemática da sinalização intracelular do isoproterenol.....	33
Figura 5 Estrutura do canal de K^+_{ATP} com as subunidades SUR e Kir.....	42
Figura 6 Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.....	55
Figura 7 (A) Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos. (B) Representação de um registro de controle de uma célula de Sertoli.....	55
Figura 8 Efeito de SQ22536 (100 μ M) sobre a ação eletrofisiológica do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Registro eletrofisiológico do efeito de SQ22536 sobre a ação eletrofisiológica do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	64
Figura 9 Ação da toxina colérica (1ng/mL) sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$ nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	65
Figura 10(A) Perfil da ação do isoproterenol (2 μ M) no potencial de membrana das células de Sertoli. (B) Célula típica.....	66
Figura 11(A) Efeito da aplicação tópica de tolbutamida (10 μ M) sobre a ação do isoproterenol (2 μ M) no potencial de membrana das células de Sertoli. (B) Célula com aplicação tópica da tolbutamida (10 μ M) e do isoproterenol (2 μ M).....	66
Figura 12 (A) Efeito da perfusão de tolbutamida (10 μ M) sobre a ação do isoproterenol (2 μ M) no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Célula com perfusão de tolbutamida (10 μ M) e aplicação tópica do isoproterenol (2 μ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	68
Figura 13 Efeito da aplicação tópica de glibenclamida (10 μ M) sobre a ação do isoproterenol (2 μ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	69
Figura 14 Efeito da aplicação tópica da tolbutamida (10 μ M) sobre a ação do FSH (4mU/mL) nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	70
Figura 15 (A) Efeito da PTX (1 μ g/mL) sobre a ação eletrofisiológica do isoproterenol (2 μ M) nas células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Registro	

eletrofisiológico da PTX (1µg/mL) sobre a ação eletrofisiológica do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	71
Figura 16: Efeito da PTX (1µg/mL) sobre a ação do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos.....	72
Figura 17 Efeito inibidor de verapamil (100µM) sobre a fase hiperpolarizante da ação do FSH (4mU/mL).....	74
Figura 18 Efeito da forskolina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli (n=10, *p<0,05).....	76
Figura 19 Efeito de PTX (1µg/mL) sobre a ação do FSH (4mU/mL) no potencial de membrana das células de Sertoli. Pré-incubação de 3 horas antes da aplicação tópica do FSH.....	78
Figura 20 Esquema hipotético da ação do FSH e do isoproterenol na membrana das células de Sertoli. FSH produz primeiro uma hiperpolarização, relacionada com a abertura dos canais de K ⁺ _{ATP} envolvendo a via Gs/AC/AMPC, assim como o isoproterenol ao se ligar ao seu receptor β-adrenérgico. A despolarização está relacionada com a ativação da via Gi. VDCC: canal de cálcio dependente de voltagem. AC: adenilato ciclase. ISO: isoproterenol. aa: aminoácido. FSH-R: receptor do FSH. β-AR: beta-adrenérgico. K ⁺ _{ATP} : canal de potássio sensível ao ATP.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.....	52
--	----

RESUMO

O hormônio folículo-estimulante (FSH) produz um efeito dual sobre o potencial de membrana das células de Sertoli, com uma fase inicial rápida, que compreende uma hiperpolarização, por um período de segundos e uma fase de despolarização, que ocorre mais lentamente, por um período de minutos. A fase de despolarização envolve um mecanismo relacionado à entrada de cálcio estimulada pelo FSH. O Isoproterenol, um agonista de receptores β -adrenérgicos, induz uma hiperpolarização imediata e prolongada na membrana de células de Sertoli de ratos imaturos. Este efeito é provavelmente resultante da queda de $[ATP]_i$ a qual libera a inibição exercida pelo nucleotídeo sobre o canal de K^+_{ATP} . Dessa forma, objetivou-se estudar a ação do Isoproterenol sobre o potencial de membrana das células de Sertoli para melhor avaliar o componente hiperpolarizante produzido por FSH nas células de Sertoli, além de estudar a captação de Ca^{2+} estimulada pelo FSH e pelo isoproterenol. O potencial de membrana foi registrado utilizando túbulos seminíferos isolados de testículos de ratos Wistar machos de 15 dias de idade. O registro intracelular da célula de Sertoli foi realizado utilizando microcapilares preenchidos com KCl 3mmol/L acoplados a um eletrômetro. Foi realizada a aplicação tópica isolada de FSH (4mU/mL) e Isoproterenol (2 μ M). Depois, em experimentos individuais, foram aplicados topicamente, FSH e isoproterenol, 5 minutos após a aplicação tópica da Tolbutamida (10 μ M) e Glibenclamida (10 μ M), sulfonilureias de ação hipoglicemiante, que exercem efeito de fechamento dos canais de K^+_{ATP} . A Tolbutamida (10 μ M), ainda, foi perfundida 15 minutos antes da aplicação do Isoproterenol, a fim de testar se esta sulfoniluréia impediria de forma mais significativa a ação deste. Na técnica de captação de Ca^{2+} , utilizou-se FSH e isoproterenol com toxina pertussis (PTX), bloqueador da subunidade Gi da proteína G para avaliar o seu envolvimento na captação de Ca^{2+} nas células de Sertoli de ratos imaturos. Utilizou-se a toxina colérica, estimulador da proteína Gs, para avaliar o envolvimento do AMPc na captação de Ca^{2+} nas células de Sertoli de ratos imaturos. Fez-se uso de SQ22536, inibidor da enzima adenilato ciclase, para avaliar o envolvimento dessa enzima na ação estimulante do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos. Os resultados foram dados como média \pm SEM. Os dados da variação do potencial de membrana foram

analisados pelo teste ANOVA para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni. O FSH teve sua hiperpolarização inibida quando foi aplicado tolbutamida (10 μ M) anteriormente. O SQ22536 também aboliu a hiperpolarização causada pelo FSH. O Isoproterenol, quando aplicado isoladamente produziu uma resposta hiperpolarizante sobre o potencial de membrana, alterando de $-32,4\text{mV} \pm 1,32\text{ mV}$ para $-40,0 \pm 0,78\text{ mV}$, aos 60 segundos após a sua aplicação (* $p < 0,001$) (n=6 células de Sertoli). A aplicação tópica de Tolbutamida (10 μ M) bloqueou a ação do Isoproterenol (2 μ M), causando uma despolarização de $-41,0 \pm 0,47\text{mV}$ variou até $-39,0 \pm 2,02\text{mV}$, aos 120 segundos após a aplicação do Isoproterenol ($p > 0,05$) (n=6 células de Sertoli). A perfusão com Tolbutamida foi mais eficaz no bloqueio da resposta beta-adrenérgica, causando uma despolarização de $-41,6 \pm 1,21\text{ mV}$ para $-35,4 \pm 0,98\text{ mV}$, aos 120 segundos após a aplicação tópica do Isoproterenol ($p > 0,05$) (n=9 células de Sertoli). A aplicação tópica de Glibenclamida (10 μ M), a qual é um inibidor do canal de K^+_{ATP} , bloqueou a ação do Isoproterenol (2 μ M), causando despolarização, demonstrando que a hiperpolarização do isoproterenol está relacionada com a abertura desses canais. A tolbutamida (10 μ M), quando aplicada topicamente, impediu a fase de hiperpolarização característica causada pelo FSH (4mU/mL), causando despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos. O Isoproterenol apresentou uma resposta hiperpolarizante rápida sobre o potencial de membrana, causada, provavelmente, por uma abertura dos canais de K^+_{ATP} na membrana das células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. PTX quando aplicada topicamente e anteriormente à aplicação de isoproterenol não impediu a hiperpolarização característica causada por isoproterenol. A ação hiperpolarizante de isoproterenol independe de proteína Gi. PTX não impede a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo isoproterenol. A toxina colérica, que estimula proteína Gs, não estimula a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli de ratos imaturos.

ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone (FSH) produces a dual effect on the membrane potential of Sertoli cells, with an initial rapid phase, which comprises a hyperpolarization for a period of seconds and a depolarization phase, which occurs more slowly, within minutes. The depolarization phase involves calcium entry stimulated by FSH. Isoproterenol, an agonist of β -adrenergic receptors, induces an immediate and prolonged hyperpolarization on the membrane of Sertoli cells from immature rats. The aim of this work is to study the involvement of K^+_{ATP} channels in the hyperpolarization effect of isoproterenol on the membrane of Sertoli cells. This work also aimed to study the action of Isoproterenol on the membrane potential of Sertoli cells to better understand the hyperpolarizing component produced by FSH in Sertoli cells, in addition to study the Ca^{2+} uptake stimulated by FSH and by isoproterenol. Membrane potential was recorded using isolated seminiferous tubules of testes of 15 days-old rats. The record of intracellular Sertoli cell was performed using microcapillary filled with KCl 3 mmol/L coupled to an electrometer. We performed a single topical application of FSH (4 mU/mL) and Isoproterenol (2 μ M). Then, in individual experiments were applied topically, FSH and isoproterenol, 5 minutes after topical application of Tolbutamide (10 μ M) and glibenclamide (10 μ M), sulfonylurea a hypoglycemic action, exercising effect closing of K^+ channels ATP. The Tolbutamide (10 μ M) also was infused 15 minutes before application of Isoproterenol in order to test whether this would prevent sulfonylurea most significantly to the action of isoproterenol. In the technique of $^{45}Ca^{2+}$ uptake, we used FSH and isoproterenol with pertussis toxin (PTX), blocking the G protein subunit G_i to evaluate its involvement on Ca^{2+} uptake in Sertoli cells from immature rats. We used the cholera toxin, a stimulator of G_s protein, to evaluate the involvement of AMPc on Ca^{2+} uptake in Sertoli cells from immature rats. SQ22536, an inhibitor of the enzyme adenylate cyclase, was used to evaluate the involvement of this enzyme in the stimulatory action of FSH in Sertoli cells from immature rats. The results were given as mean \pm SEM. The data of the change in membrane potential were analyzed by ANOVA for repeated measures with Bonferroni post-test. The hyperpolarization produced by FSH was inhibited when tolbutamide was applied (10 μ M). The

SQ22536 also abolished the hyperpolarization caused by FSH. The Isoproterenol when used alone produced a hyperpolarizing response on the membrane potential, changing from $-32.4\text{mV} \pm 1.32\text{ mV}$ to $-40.0 \pm 0.78\text{ mV}$ at 60 seconds after its application ($*p < 0.001$) ($n=6$ Sertoli cells). Topical application of Tolbutamide ($10\mu\text{M}$) blocked the action of Isoproterenol ($2\mu\text{M}$), causing a depolarization of $-41.0 \pm 0.47\text{ mV}$ ranged up to $-39.0 \pm 2.02\text{ mV}$ at 120 seconds after application of Isoproterenol ($p > 0.05$) ($n=6$ Sertoli cells). The Tolbutamide infusion was more effective in blocking beta-adrenergic response, causing a depolarization of $-41,6 \pm 1,21\text{ mV}$ to $-35,4 \pm 0,98\text{ mV}$ at 120 seconds after the topical application of Isoproterenol ($p > 0.05$) ($n=9$ Sertoli cells). Isoproterenol produces a rapid hyperpolarization on membrane potential of Sertoli cells. This effect was blocked by tolbutamide, indicating that the activation of beta-adrenergic receptors involves opening of K^+_{ATP} channels in the membrane of Sertoli cells from immature rat testes. PTX, when applied topically prior to application of isoproterenol did not prevent the characteristic hyperpolarization caused by isoproterenol. The hyperpolarizing action of isoproterenol is independent of Gi protein. PTX does not prevent the uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ stimulated by isoproterenol. The cholera toxin, which stimulates Gs protein, does not stimulate $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from immature rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULA DE SERTOLI

A célula de Sertoli é uma célula somática cuja localização é no interior dos túbulos seminíferos das gônadas masculinas, os testículos. Possui formato piramidal, tendo sua base voltada para a membrana basal dos túbulos seminíferos, chamada de região basal, enquanto sua membrana apical é voltada para o lúmen dos túbulos, denominada região adluminal (MRUK & CHENG, 2004). Ademais, são células com uma estrutura colunar e ocupam aproximadamente 17-19% do epitélio seminífero de ratos adultos (WONG & RUSSELL, 1983; RUSSELL *et al*, 1990).

As células de Sertoli fornecem suporte estrutural, nutricional e mecânico para o processo da gametogênese além de apresentar um importante papel no controle de processos bioquímicos das células germinativas e propiciar um microambiente adequado nos túbulos seminíferos das gônadas masculinas.

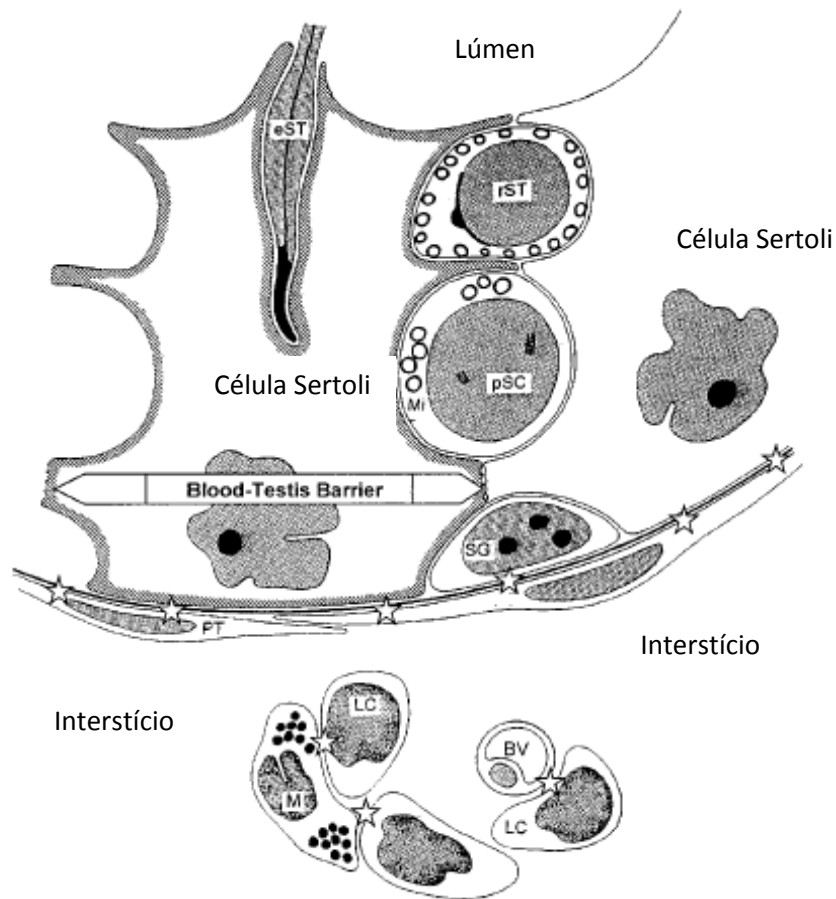


Figura 1:Microambiente testicular, evidenciando o epitélio seminífero com Células de Sertoli e células germinativas, a barreira hemato testicular e células intersticiais de Leydig, no interstício:(**LC**) células de Leydig; (**M**) macrófagos; (**BV**) vasos sanguíneos; no compartimento adluminal: (**pSC**) espermatócitos primários; (**rST**) espermátides arredondadas ; (**eST**) espermátides alongadas; (**Mi**) mitocôndrias. (adaptado de SCHLATT, 1997).

Haja vista a necessidade de garantir um ambiente propício ao desenvolvimento da gametogênese, no interior dos túbulos seminíferos, as células de Sertoli secretam um fluido iso-osmótico com maior teor de potássio que o sangue. O fluido tubular seminífero (FTS) é de crucial importância para tal processo, além de fornecer um meio de transporte aos gametas masculinos em desenvolvimento. Os elementos centrais desse fluido são a água e alguns eletrólitos (RUSSEL, 1993; RATO *et al*, 2010).

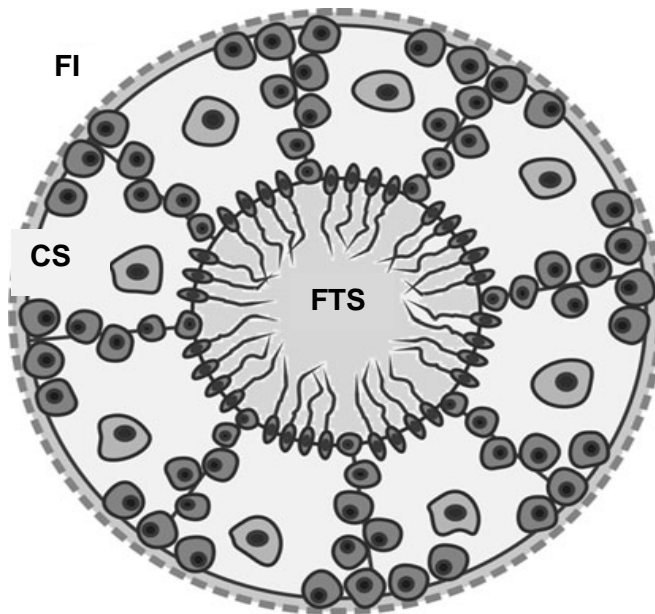


Figura 2: Representação esquemática da célula de Sertoli (CS), do fluido ou líquido intersticial (FI) e do fluido tubular seminífero (FTS). (RATO *et al*,2010).

As células de Sertoli expressam diferentes transportadores de membrana e transportadores de água, os quais são envolvidos nas funções celulares e de secreção (RATO *et al*, 2010).

A conversão de célula de Sertoli imatura para a adulta ocorre durante a fase de puberdade, chamada de maturação ou diferenciação; a qual é caracterizada por várias etapas (JEGOU, 1992;SHARPE*et al*, 1994; MCLAREN, 1998). A maturação de tais células envolve perda da capacidade proliferativa, formação de junções apertadas (*tight junctions*) entre as células de Sertoli, formando a barreira sangue-testículo ou barreira hemato-testicular (BHT) e aumentando as funções que não estão presentes nas células de Sertoli imaturas (SHARPE *et al*, 2003).

Aproximadamente no início da puberdade, as células de Sertoli sofrem grandes alterações em sua morfologia e em sua função, modificando seu estado de proliferativo (imaturo), para não proliferativo (maduro). Células de

Sertoli organizam-se de forma adjacente, e, após a formação das junções apertadas, é criado um compartimento adluminal (intratubular) que propicia as etapas meióticas e pós-meióticas da espermatogênese. Este compartimento formado proporciona a nutrição e suporte físico adequado à progressão espermatogênica, fornecendo acesso direto às células germinativas a vários fatores necessários ao seu desenvolvimento (JEGOU, 1992; MCLAREN *et al*, 1998; SHARPE, 1994).

Nesta fase há um significativo aumento no número de células de Sertoli nos túbulos seminíferos (LINDSEY & WILKINSON, 1996). Durante este período inicia-se a proliferação espermatogonial e sua meiose (MCCARREY, 1993), células de Leydig adultas iniciam sua diferenciação (NEF *et al*, 2000; BAKER *et al*, 1999) e ocorre a formação da barreira hematotesticular (CYR *et al*, 1999), sendo este eventos relacionados a mudanças funcionais das células de Sertoli. Também é observado entre 5 e 10 dias o aumento dos níveis circulantes de FSH (MICHAEL *et al*, 1980, JEAN-FAUCHER *et al*, 1983).

No testículo, as junções apertadas são encontradas entre as células de Sertoli aproximadamente ao nível da barreira hemato-testicular, onde elas coexistem com especializações ectoplásmicas basais (MRUK & CHENG, 2010).

A BHT serve como um "segurança" para impedir que as substâncias nocivas atinjam as células germinativas em desenvolvimento principalmente as espermátides na fase pós-meiótica. A BHT também contribui, pelo menos em parte, para um estado imune aos testículos, de modo que os anticorpos anti-esperma não possam se desenvolver e agir contra os antígenos que são

expressos transitoriamente durante a espermatogênese (SU, MRUK & CHENG, 2010).

A BHT divide fisicamente o epitélio seminífero em dois compartimentos: um compartimento basal onde situam-se espermatogônias e espermatócitos, e um compartimento adluminal, no qual células germinativas mais desenvolvidas são seqüestradas da lâmina basal para o interior dos túbulos. A fim de que as células germinativas entrem no compartimento adluminal, elas devem atravessar a BHT, um evento celular que requer a participação de diversas moléculas e vias de sinalização (MRUK & CHENG, 2010).

Uma complexa sequência de interações locais envolvem os vários tipos de células testiculares, tais como a célula de Sertoli, células de Leydig e peritubulares, as quais são responsáveis pelo controle do processo de espermatogênese (WALKER & CHENG, 2005).

1.2 FUNÇÕES DAS CÉLULAS DE SERTOLI

A espermatogênese é o processo pelo qual as células germinativas imaturas sofrem divisão, diferenciação e meiose para dar origem a espermátides alongadas. Tal processo ocorre dentro dos túbulos seminíferos, os quais são as unidades funcionais do testículo, através da estreita associação das células germinativas com as células somáticas e as células de Sertoli (CHENG *et al*, 2009; RATO *et al*, 2010).

A espermatogênese é um evento bioquímico complexo, envolvendo a participação do hipotálamo e a glândula pituitária através da secreção do hormônio GnRH do hipotálamo, e dois hormônios hipofisários: FSH e LH. Neste processo, ocorre a transformação gradual de células germinativas a espermatozóides, ocorre em um período de tempo determinado para cada espécie, sendo limitado ao ambiente dos túbulos seminíferos. Tal processo envolve proliferação celular, gerada através de repetidas divisões mitóticas, duplicação cromossômica, produção de espermatídes e diferenciação destas espermatídes a espermatozóides. A espermatogênese ocorre em ciclos repetidos no epitélio seminífero, caracterizada por específicas associações celulares estabelecidas em pontos específicos no tempo. Quando estas associações geram distintas alterações morfológicas, são identificados diferentes estágios no ciclo. (EHMCKE,2006; JOHNSON,2008; AMANN, 2008; DYM E RAJ, 1977; RUSSELL E GRISWOLD, 1993; CHENG *et al*, 2009; KOPERA *et al*, 2010).

A espermatogênese é composta por quatro distintas fases em que acontecem mudanças moleculares, cabendo salientar que ocorre de forma diversa dependendo da espécie estudada. De maneira que a fase 1 é de proliferação e diferenciação espermatogonial; a fase 2 de meiose dos espermatócitos, incluindo a última síntese de DNA nos espermatócitos pré-leptóteno e duas divisões meióticas formando espermatídes; a fase 3 de espermiogênese ou transformação de espermatídes esféricas em espermatídes maduras; e a fase 4 compreende a espermição ou liberação através do rompimento do ancoramento das espermatídes maduras às células de Sertoli.

Este gameta masculino é liberado no lúmen tubular (CHENG E MRUK, 2002; AMANN, 2008; MCLACHLAN, 2002, KOPERA *et al*, 2010).

Estes processos são interdependentes, entretanto cada um tem distintas demandas por moléculas regulatórias, provenientes de forma parácrina, das células de Sertoli, das células mióides peritubulares e das células de Leydig, bem como da rede vascular adjacente. Em humanos, o intervalo entre o início do processo meiótico da espermatogônia do tipo A_{clara} e a espermição compreende 74 dias (HELLER & CLERMONT, 1964).

A fertilidade masculina é regulada por uma combinação de sinais hormonais e ambientais. Nos testículos, a produção de espermatozoides (espermatogênese) é regulada pelo FSH e testosterona. Esses hormônios enviam sinais para que as células de Sertoli produzam fatores necessários à manutenção da sobrevivência e maturação dos espermatozoides em desenvolvimento (SHARPE, 1994).

A interação entre células de Sertoli e células germinativas, no epitélio seminífero, é definida para cada uma das fases de desenvolvimento estando sob controle hormonal através de mecanismos endócrinos clássicos, coordenados pelo eixo hipotálamo-hipófise testículo, bem como por mecanismos intrínsecos mediados por hormônios, fatores de crescimento, citocinas, moléculas sinalizadoras intracelulares e por neurotransmissores (DE KRETZER E KERR, 1994; SHARPE, 1994). Em ambos os mecanismos, a célula de Sertoli desempenha um papel central (GRISWOLD, 1998).

A célula de Sertoli, durante a puberdade, isola o ambiente tubular, concentrando o transporte intercelular de vários fatores para as células

germinativas (DYM & FAWCETT, 1970). Esta organização tecidual proporciona um ambiente controlado favorável ao desenvolvimento da série espermatogênica, que é mediado primariamente pela secreção de LH, FSH e testosterona de maneira diferente, nos diferentes estágios de desenvolvimento (SU, MRUK & CHENG, 2010). Este controle hormonal envolve comunicação intracelular e com o ambiente intra e extratubular, bem como sob o controle neuroendócrino hipotalâmico-hipofisiário.

Vários estudos experimentais revelaram que a célula de Sertoli produz e secreta diversas proteínas (GRISWOLD, 1998; GNESSI, 1997, LOSS *et al*, 2007).

As células de Sertoli secretam glicoproteínas as quais podem ser classificadas baseadas em suas características bioquímicas, como proteínas transportadoras, proteases e inibidores de proteases, glicoproteínas formadoras da membrana basal e glicoproteínas regulatórias. Estas glicoproteínas agem como fatores de crescimento ou fatores parácrinos (GRISWOLD, 1998). Estudos recentes têm mostrado que os transportadores de numerosos hormônios são expressos pelas células de Sertoli.

1.3 CONTROLE ADRENÉRGICO SOBRE OS TESTÍCULOS

As gônadas de mamíferos recebem uma densa inervação simpática. As gônadas de mamíferos machos têm inervações sensoriais e eferentes do gânglio espinal e do plexo paravertebral. Terminações nervosas convergem para o testículo ao longo de duas vias principais: os nervos espermáticos

superiores (SSN) e os nervos espermáticos inferiores (ISN) (SETCHELL, 1994).

Estudos de ultraestrutura relatam a presença de terminais adrenérgicos na lâmina própria dos túbulos seminíferos (PRINCE, 1996).

Mayerhofer e colaboradores (1992) descreveram que as catecolaminas apresentam concentrações máximas, em testículos de hamsters, no primeiro dia após o nascimento, ocorrendo uma diminuição gradual pós-natal. A infusão de adrenalina, noradrenalina e isoproterenol (agonista β -adrenérgico), na artéria espermática, promoveu um aumento da testosterona sérica no leito vascular espermático do cão (EIK-Nes,1969) e injeções sistêmicas de isoproterenol, resultam em hipertrofia das células de Leydig e aumento do peso dos testículos da ratos recém nascidos (MAYERHOFER,1992).

Ao examinar a função testicular em hamster, após aplicação intratesticular unilateral de 6-hidroxidopamina, uma droga neurotóxica conhecida por produzir atuar nas terminações nervosas produzindo depleção dos estoques de noradrenalina, Mayerhofer e colaboradores (1990) notaram que, após aplicada a injeção de 6-hidroxidopamina, houve alterações degenerativas no epitélio germinativo; 24 horas após o tratamento, houve diminuição dos receptores do LH.

Além da inervação extrínscica, recebida pelos testículos, Mayerhofer e colaboradores (1996) sugerem que haja uma fonte intragonadal de catecolaminas. Em estudo realizado por Dees (1995), atentando para a possibilidade de haver uma fonte similar de catecolaminas nas gônadas masculinas, observou-se que os testículos de primatas, recebem estimulação

catecolaminérgica dual, proveniente de inervação extrínseca, já bem demonstrada, e outra de células, localizadas na própria gônada. Onde a ação desta última, ocorre, predominantemente no período pré-puberal, em relação à vida adulta do animal (MAYERHOFER, 1996).

1.4 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) é uma gonadotrofina de natureza glicoprotéica, produzida pelas células gonadotróficas da hipófise anterior e esta gonadotrofina desempenha um papel essencial na reprodução. Seu receptor (FSHR) pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), especialmente à família de receptores do tipo rodopsina ou família A (ULLO-AGUIRRE *et al*,2007; ROZELL & OKRAINETZ, 2009).

O FSH desempenha diversas atividades em ambos os tecidos reprodutivos masculino e feminino; incluindo: crescimento, divisão e diferenciação das células de Sertoli e também das células da granulosa. Este hormônio também está envolvido diretamente na produção de gametas masculinos e femininos, bem como na produção de hormônios (inibina e estradiol) que fazem retroalimentação, influenciando a secreção de FSH pela hipófise (PHIFER, 1973).

O FSH desempenha um papel central no controle das funções da célula de Sertoli. O FSH determina o número das células de Sertoli que estarão presentes em machos adultos através de sua ação sobre o controle da

proliferação destas células no estágio pré-puberal (SHARPE *et al*, 2003; ORTH, 1982; TROPOUIX *et al*, 1998). Em ratos, a mitose das células de Sertoli decresce em torno de 15 dias de idade do animal, tendo o FSH o controle na diferenciação destas células, o que é fundamental para o desenvolvimento qualitativo e quantitativo de uma espermatogênese normal no adulto (GRISWOLD, 2003).

O FSH é um membro da família dos hormônios glicoprotéicos, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), o hormônio estimulador da tireóide (TSH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG). Tanto LH como FSH, ambos são produzidos pelo mesmo tipo de células, gonadotrofos da pituitária, enquanto o TSH é produzido pelos tireotrofos também da pituitária e o hCG pelos trofoblastos da placenta (PHIFER, 1973).

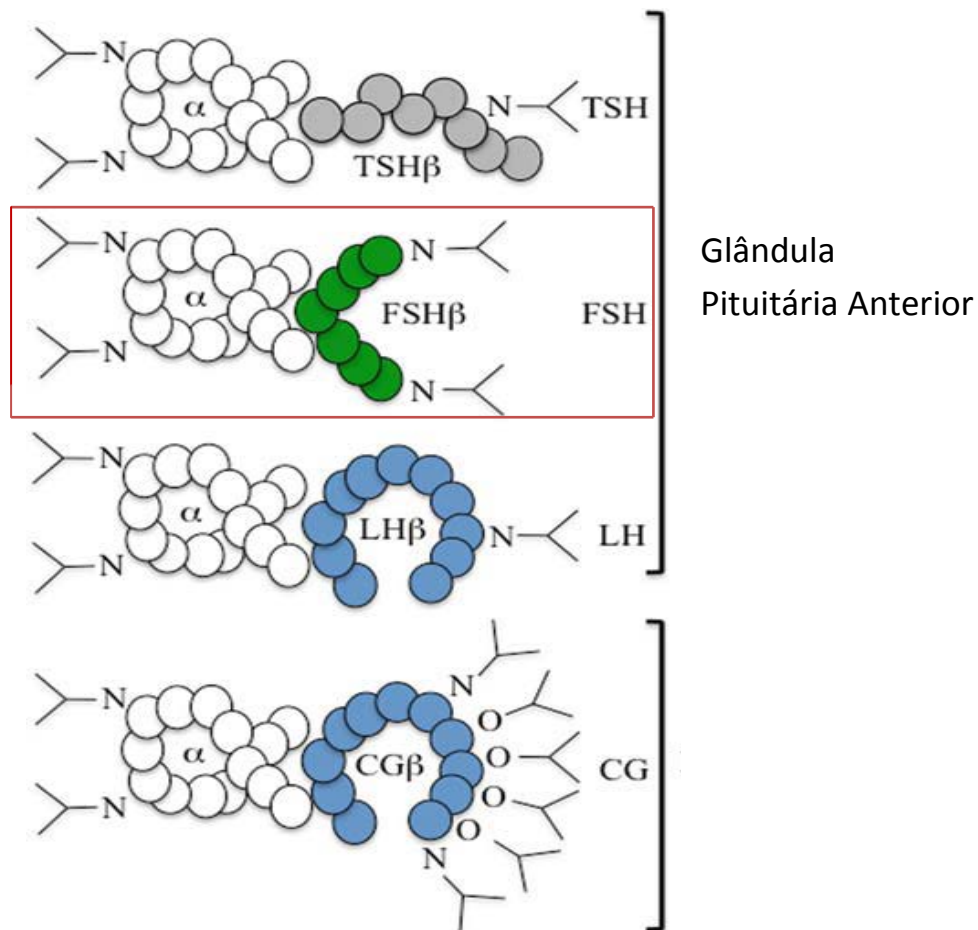


Figura 3: Padrão de glicosilação das subunidades de hormônios glicoprotéicos. Hormônios glicoprotéicos possuem sequência de aminoácidos idênticas nas subunidades alfa. No entanto, as suas subunidades beta contêm quantidades variáveis de glicosilação ligadas à porção N-terminal, que confere especificidade hormonal a esses hormônios. Em destaque a molécula de FSH. Adaptado de Rozell & Okrainetz, 2009.

Os hormônios glicoprotéicos são assim chamados porque contêm carboidratos ligados às suas subunidades (FARES, 2006).

Cada membro dessa família tem duas subunidades, α e β . A subunidade α tem a mesma sequência de aminoácidos para cada um dos hormônios glicoprotéicos, enquanto a subunidade β confere sua conformação biológica e imunológica (LAPTHORN *et al*, 2001).

Cada sequência primária das cadeias α e β apresenta duas glicosilações. Estas glicosilações ocorrem através de modificações pós translacionais, onde os oligossacarídeos adicionados determinam propriedades funcionais ao hormônio, como a capacidade e a afinidade na ligação ao seu receptor, levando a ativação das vias de sinalização intracelular (AREY *et al*, 1997).

Sabe-se que FSH é liberado da hipófise como um *pool* heterogêneo em relação ao tipo de isoformas circulantes (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1995; STANTON *et al*, 1996).

Ainda por responder, está a questão de como um tipo específico de FSH glicosilado interage com um mesmo receptor e deflagra uma variedade de respostas intracelulares diversas. Na tentativa de elucidação desta questão surgiram algumas hipóteses como o FSH interagindo através de várias formas com seu receptor, provocando sinalizações diferenciadas, ou ainda, diferentes glicofomas do hormônio ligando-se a diferentes receptores acoplados a diferentes vias de sinalização (BABU *etal*, 2000; BABU *et al*, 2001, ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2003). Entretanto, ainda não existem evidências suficientes para atestar ou eliminar as alternativas citadas.

De acordo com Jacobus *et al* (2010), há diversas formas de glicosilação do FSH e pode ocorrer uma variabilidade na interação com seu receptor por este motivo. Justifica-se, assim, pensar que o efeito trófico do FSH consiste em uma mistura de sinais com diferentes afinidades e atividades intrínsecas pleiotrópicas.

1.5 Isoproterenol

Diversas evidências sugerem que as catecolaminas estão envolvidas na regulação do desenvolvimento dos testículos (MAYERHOFER *et al*, 1992).

Estudos que buscavam investigar a capacidade do parênquima testicular responder a estímulos catecolaminérgicos *in vitro*, constataram que adrenalina, noradrenalina e isoproterenol, agonistas dos receptores beta-adrenérgicos, estimularam significativamente a produção de testosterona nos testículos de hamsters dourados (MAYERHOFER *et al*, 1992).

O isoproterenol (ISO) é uma catecolamina sintética e, portanto, um agonista de receptores β -adrenérgicos; que se ligando a receptores beta-adrenérgicos, na superfície celular, pode sinalizar por meio de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (SUGDEN & CLERK, 1998; FREY & OLSON, 2003; HYE-MIN HONG *et al*, 2011). Para Wang *et al* (2010), a proteína G constitui um componente limitante na ativação do GPCR.

Cascatas de transduções de sinalização intracelular funcionam geralmente através de várias vias de sinalização. Ocorrem mudanças intracelulares as quais são iniciadas com o contato do agonista beta-adrenérgico com o seu receptor e mediadas pela ativação da cascata de sinalização que atua sobre vários fatores de transcrição (HONG *et al*, 2011).

Ao se ligar ao GPCR, o isoproterenol ativa a subunidade $G\alpha$ da proteína G- Tipo G_s - do referido receptor; em seguida, há a estimulação da adenilato

ciclase (AC). A adenilato ciclase é responsável por catalisar a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e então, conseqüentemente à essa reação, há a redução dos estoques intracelulares de ATP. A diminuição dos estoques de ATP causam uma diminuição da afinidade do nucleotídeo pelo canal de potássio dependente de ATP (K^+_{ATP}). Justo que o ATP exerce efeito de bloqueio no canal de K^+_{ATP} , então, devido a menor afinidade do nucleotídeo, o canal abre-se e permite o extravasamento de K^+ para o meio extracelular, deixando o meio intracelular cada vez menos positivo (JACOBUS *et al*,2005).

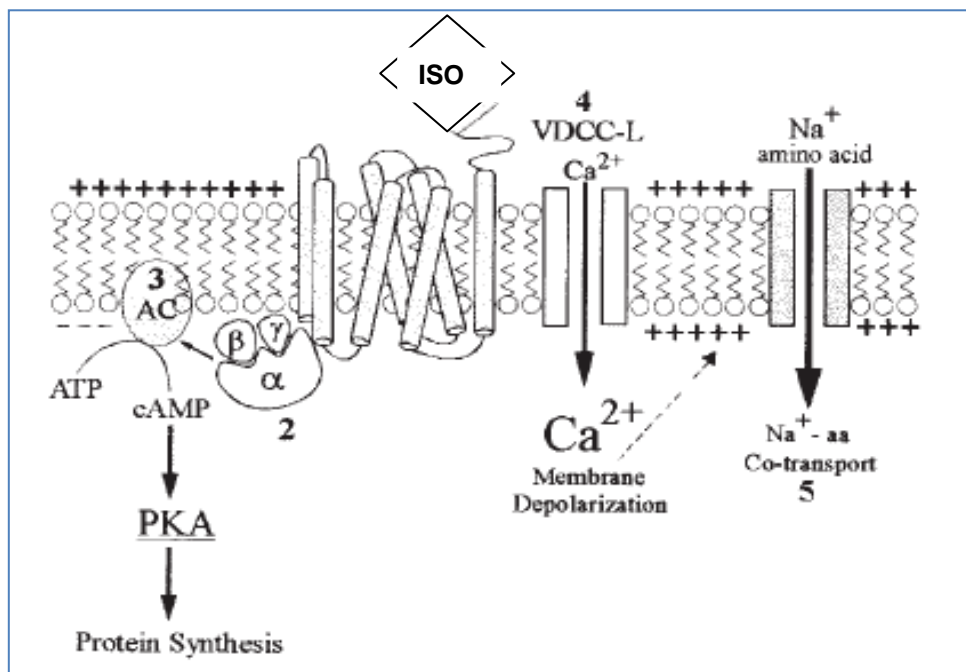


Figura 4: Figura esquemática da sinalização intracelular do isoproterenol. Adaptado de Jacobus *et al*, 2007.

Em estudo utilizando a técnica de registro intracelular, verificou-se, ao investigar o mecanismo pelo qual o isoproterenol ($2\mu M$) hiperpolariza a membrana da célula de Sertoli em túbulos seminíferos de ratos imaturos, que o isoproterenol, ao se ligar ao receptor adrenérgico, induz uma hiperpolarização

imediate e prolongada na membrana de células de Sertoli de ratos imaturos (JACOBUS *et al*, 2005). Esta ação é similar à da forskolina, um ativador da enzima adenilato ciclase, a qual atua aumentando AMPc a partir de ATP (JACOBUS *et al*, 2005).

Além do mais, o antagonista do receptor adrenérgico beta-2 (AR- β 2), butoxamina (1 μ M), anulou a ação do isoproterenol, enquanto o antagonista do receptor adrenérgico beta-1 (AR- β 1), metoprolol (1 μ M), teve efeito leve e não-significativo sobre a ação do isoproterenol; indicando, portanto, que isoproterenol age preferencialmente pelo receptor AR- β 2. O efeito hiperpolarizante do isoproterenol está relacionado com a ativação da via Gs-AC-AMPc-PKA que ativa o canal de K⁺_{ATP}. Este efeito é provavelmente resultante da queda de [ATP]_i a qual libera a inibição exercida pelo nucleotídeo sobre o canal de K⁺_{ATP}, como sugerido para a ação do agonista β -adrenérgico em músculo liso de safena de cães (NAKASHIMA & VANHOUTTE, 1995).

1.6 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G

Os receptores da membrana plasmática desempenham importante papel na transmissão de sinais extracelulares para o interior celular. Os receptores respondem a uma grande variedade de mensageiros químicos extracelulares. Consequentemente, eles tem fundamental importância em muitas funções fisiológicas e seu impacto sobre a ação de drogas é enorme. Mais de 40% dos medicamentos comercializados agem através de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (TACCHI, 2008).

A estimulação desses receptores por agonistas exógenos ou endógenos ativam um grupo de proteínas de acoplamento, chamadas proteínas G, porque se unem à guanosina trifosfato (GTP) e regulam uma variedade de enzimas e canais iônicos. O papel de enzimas e canais iônicos é o de efetores, porque as mudanças na atividade causada por alterações na composição iônica ou ao nível dos segundos mensageiros, como AMPc ou inositol fosfato, que em última análise levam à resposta celular (TACCHI, 2008).

As proteínas G são constituídas por três polipeptídeos: uma subunidade alfa que se liga e hidrolisa GTP, a subunidade beta e gama, as quais formam um dímero que dissocia somente quando ele é desnaturado e opera, nessas circunstâncias, como um monômero (subunidade beta-gama). Um grande número de proteínas G foram clonados, caracterizados e subdivididos em várias famílias. Quatro subfamílias de subunidades alfa da proteína G foram definidos e múltiplas subunidades da proteína G beta e gama foram identificados (SCHLATT *et al*, 1997; TACCHI, 2008).

Os GPCRs estão acoplados a três classes principais de proteínas de ligação: Gs, Gq, e Gi; e a transdução de sinais agonista ou antagonista é induzida em direção a efetores tais como enzimas e canais iônicos (SUGDEN&CLERK, 1998; FREY & OLSON, 2003; HYE-MIN HONG *et al*, 2011).

Os GPCR têm uma estrutura central homóloga, com sete α hélices transmembranas, contendo entre 20-28 aminoácidos hidrofóbicos. Estes domínios transmembrana (TM) estão orientados perpendicularmente à membrana (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Entretanto, os GPCR diferem quanto a

suas estruturas extra e intracelulares (SHARPE, 1994; SCHLATT *et al*, 1997). O terminal amino (NH₂) extracelular contém muitos locais de glicosilação, responsáveis pelo reconhecimento do ligante (APPLEBURY & HARGRAVE, 1986), enquanto que no terminal carboxila (COOH) intracelular estão presentes vários locais de fosforilação vinculados à regulação da dessensibilização e internalização do GCPR. Este terminal intracelular está associado às subunidades da proteína G (PIKETTY *et al*, 2006; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007). Três alças intracelulares e três alças extracelulares estão ligadas ao domínio transmembrana (KARNIK & KHORANA, 1990).

Quando o receptor associa-se ao seu ligante, no terminal extracelular, ocorre ativação do mesmo através de modificações conformacionais, que levam à ligação das alças intracelulares e do terminal COOH com a proteína G heterotrimérica, ativando-a. Apesar da diversidade entre os GPCR, este primeiro estágio parece ser uniforme entre as diversas classes do receptor. A ativação do receptor catalisa a conversão de GDP por GTP na subunidade G α , no momento que ocorre a dissociação da proteína G do receptor. Tal conversão altera a afinidade das subunidades G α -GTP e G $\beta\gamma$, que quando separadas, ampliam a resposta intracelular, cada qual ativando ou inibindo uma variedade de moléculas efetoras, tais como enzimas, canais iônicos, entre outros (FORD *et al.*, 1993; TACCHI, 2008; PEREZ E KARNIK, 2005; JOHNSTON & SIDEROVSKI, 2007).

1.6.1 RECEPTOR DE FSH (FSHR)

O receptor para FSH pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2008).

A ligação do FSH ou agonista ao FSHR desencadeia a ativação rápida de múltiplas cascatas de sinalização, principalmente a via de sinalização adenilil ciclase-AMPC- proteína quinase A (PKA), que desencadeiam diversos efeitos biológicos de FSH nas gônadas. Como em outros receptores acoplados à proteína G, os vários domínios do citoplasma do FSHR estão envolvidos na transdução de sinal e resolução do sinal de FSH (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007).

O domínio extracelular é um terminal amino (NH₂), responsável pela ligação ao hormônio; e o domínio intracelular é um terminal carboxílico (COOH) que faz o acoplamento com as subunidades da proteína G (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007), como já descrito para outros GPCR.

A ligação do FSH com seu receptor é rápida, específica e saturável, foi demonstrada que esta ligação também é temperatura dependente. (OONK E GROOTEGOED, 1988, SIMONI *et al*, 1997). Em machos, os locais de ligação para o FSH são encontrados somente o epitélio seminífero, estando presentes em diferentes espécies animais (GAYTAN *et al*, 1994).

Após o isolamento deste receptor, verificaram-se dois tipos de associação do FSH com seu receptor, uma com alta afinidade e baixa capacidade, e outra com baixa afinidade e alta capacidade (SIMONI *et al*, 1997).

É característica destes receptores, sofrerem dessensibilização após uma contínua exposição ao FSH, sendo este efeito rápido, dose e tempo dependentes. Este fenômeno é conhecido como *down regulation* (AMSTERDAM, 2002).

Após a ligação com seu receptor, FSH estimula várias vias de sinalização intracelulares através da dissociação da subunidade α das subunidades $\beta\gamma$, sendo que cada subunidade pode deflagrar vias independentes. Os mecanismos adjacentes já demonstrados pela literatura para este hormônio serão discutidos posteriormente (JACOBUS *et al*, 2010).

1.6.2 RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS (β AR)

Quando as catecolaminas se ligam aos seus receptores adrenérgicos, que são do tipo GPCR, interage mais especificamente a proteína G desses receptores, a qual é convertida de um estado inativo para um estado ativado (SCHULTE & LEVY, 2007; TACCHI, 2008; ZHU *et al*, 2005).

A porção N-terminal do receptor, localizada extracelularmente, é responsável pelo reconhecimento do ligante, enquanto a porção C-terminal é responsável pela transdução do sinal, que ativa a proteína G. Os GPCRs não tem atividade catalítica, mas a interação do receptor com um agonista promove a dissociação da proteína G, subunidades G-alfa e G-beta e G-gama. Estas subunidades da proteína G, em seguida, amplificam e propagam sinais dentro da célula, modulando a atividade de uma ou mais moléculas efetoras, incluindo a adenilato ciclase, fosfatases e canais iônicos. Ao mesmo tempo, a

atividade dessas moléculas efetoras regular a produção de segundos mensageiros, levando a respostas celulares que ativam diferentes vias de sinalização.

Exemplos de segundos mensageiros são adenosina monofosfato cíclico (AMPc), produzida por estimulação de receptores beta-adrenérgicos e inositol-1-4-5-trifosfatase (IP3) e diacilglicerol (DAG).

A proteína G α s, que é estimulante, é ativada como consequência da ativação de receptores adrenérgicos, ao passo que após a estimulação da proteína G α i, que é inibitória. Se faz necessário, comentar que os GPCRs desenvolveram ao longo da evolução, um mecanismo altamente regulado por sinais de paragem. O rápido declínio da sensibilidade (segundos ou minutos), depende da fosforilação do receptor, que produz o desacoplamento de receptores de transdução de sinal, a proteína-G. A fosforilação pode ser mediada por segundos mensageiros, como a proteína quinase A ou a proteína quinase C, ou por uma família especializada de receptores acoplados a proteína quinase G (GRK) (SCHULTE & LEVY, 2007; SETCHELL, 1994; TACCHI, 2008).

1.7 CANAIS IÔNICOS PRESENTES NA CÉLULA DE SERTOLI

Estudos sobre a natureza e o papel dos canais iônicos envolvidos na regulação de íons presentes nas células de Sertoli são escassos e por vezes inconclusivos; não obstante, diversos relatos demonstram que as células de

Sertoli expressam vários tipos de canais transportadores de íons na superfície de sua membrana plasmática, incluindo transportadores para água, as chamadas aquaporinas (AQPs) (RATO *et al*, 2010).

1.7.1 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K^+_{ATP})

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) são canais de ligação importantes na excitabilidade da membrana da célula, para seu estado celular bioenergético.

A atividade elétrica sem modulação seria como um carro com uma velocidade, sem direção e sem freios. Dessa forma, além dos canais que exercem papel principal, também há os que exercem função menos crucial, que fornecem as engrenagens essenciais, direção e freios. Estes incluem uma família de K^+ , os chamados canais retificadores internos ou canais retificadores de corrente interna (Kir). Através da estabilização do potencial de membrana em repouso, os canais Kir agem como um freio sobre a excitabilidade da membrana. O canal K^+_{ATP} é membro dessa família de canais (COLIN, 2006).

O canal K^+_{ATP} modula a atividade elétrica em diversos tecidos. Em uma complexa interação de mecanismos, o K^+_{ATP} é inibido pela ligação não-hidrolítica do ATP, mas ativado pela interação magnésio-nucleotídeos (Mg^{2+} -nucleotídeos) em locais separados. O efeito inibitório domina, e o canal permanece fechado, quando o potencial de fosforilação celular está alto, mas com a diminuição do metabolismo celular, o efeito excitatório vence e o canal abre. Dessa forma, o canal oferece um transdutor elétrico do estado metabólico

da célula. Porquanto, vale interrogar quanto a que mecanismos permitem a regulação desse canal de transdução. Muitas questões ainda estão por resolver relativamente a este assunto, mas a clonagem de subunidades constituintes de canais K^+_{ATP} e a cristalização de proteínas estruturais relacionadas estão fornecendo material para que se obtenha a compreensão detalhada de como os nucleotídeos interagem com o canal K^+_{ATP} e uma explicação sobre a base molecular da atividade do canal (COLIN, 2006).

Assim, o canal de potássio sensível ao ATP é assim chamado por normalmente ser inibido pelo aumento da concentração de ATP intracelular e aberto durante períodos de depleção de energia (BABENKO *et al*, 1998).

Os canais K^+_{ATP} são compostos por subunidades formadoras de poros e subunidades reguladoras (ZHOU *et al*, 2011).

São compostos pela combinação única de duas proteínas diferentes (Fig. 1.5). Uma, Kir6, é um membro da família canal Kir; a outra, SUR (para receptor de sulfonilureia), é membro da família de proteínas cassete ligadas ao ATP, que inclui o canal CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator ou regulador da condutância transmembrana da Fibrose Cística) (COLIN, 2006).

A inibição do ATP resulta da interação com as subunidades Kir6 enquanto a ativação nucleotídeos Mg^{2+} reflete a interação com as subunidades SUR (COLIN, 2006).

Em estudo no qual teve por objetivo investigar a expressão celular e a localização dessas subunidades nos testículos de ratos, mostrou que o testículo de rato contem cinco subunidades compondo o canal K^+_{ATP} : Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR 2A, SUR 2B (ZHOU *et al*, 2011).

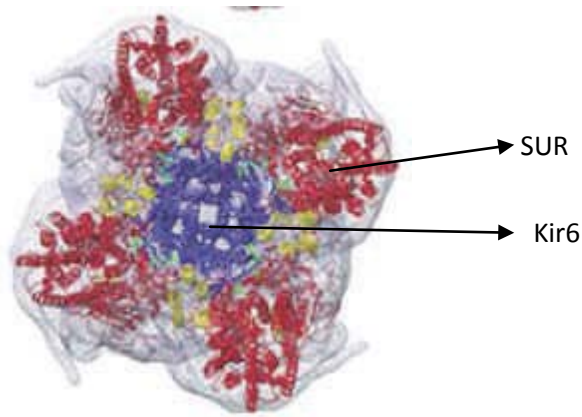


Figura 5 – Estrutura do canal de K^+_{ATP} com as subunidades SUR e Kir. Adaptado de Colin, 2006.

Canais de potássio foram identificados em diversos tecidos, inclusive nas gônadas masculinas, mais especificamente na membrana plasmática da célula de Sertoli (COLIN, 2006; VON LEDEBUR *et al*, 2002).

Porquanto hajamdiferentes localizações das subunidades dos canais de K^+_{ATP} na membrana celular e na membrana de organelas de células espermatogênicas e de Sertoli, indicam funções complexas e múltiplas dos canais de K^+_{ATP} nos testículos de ratos (ZHOU *et al*, 2011).

Empregando a técnica de registro intracelular com microeletrodo eusandode inibidores específicos para esses canais, demonstrou-se a ação de dos hormônios sexuais no potencial de membrana de células de Sertoli de túbulos seminíferos oriundos de ratos Wistarimaturros (LOSS *et al*, 2004; VON LEDEBUR *et al*. 2002; WASSERMANN & LOSS, 2004).

O canal de potássio sensível ao ATP é assim chamado por normalmente ser inibido pelo aumento da concentração de ATP intracelular e aberto durante períodos de depleção de energia (BABENKO *et al*, 1998).

Conforme Wassermann *et al* (2004) e Dunne e Petersen (1991), em células endócrinas, tais canais exercem papel de participação na sinalização de hormônios através de despolarização da membrana e influxo de cálcio.

Em células de Sertoli, a ação rápida da testosterona parece estar associada ao fechamento desses canais e com resultante despolarização da membrana plasmática (JACOBUS *et al*, 2005; LOSS *et al*, 2004; VON LEDEBUR *et al*, 2002).

Assim como quando utilizados um agonista de receptores alfa e beta-adrenérgicos, isoproterenol, há abertura de tais canais e consequente hiperpolarização da membrana plasmática da célula de Sertoli (JACOBUS *et al*, 2005).

1.7.2 AÇÃO DO FSH SOBRE OS CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (CCDV) EM CÉLULAS DE SERTOLI

Como foi descrito anteriormente, a célula de Sertoli é regulada predominantemente pelo FSH atuando sobre seu receptor ligado à proteína G na superfície da membrana celular.

Por muito tempo acreditou-se que o aumento intracelular de AMPc era senão o único, o principal sistema de transdução de sinal do FSH nas células de Sertoli (MEANS *et al*, 1980; GORCZYNSKA-FJÄLLING, 2004).

Embora outros sinais de transdução, incluindo cálcio intracelular também possam estar envolvidos.

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) pertencem à superfamília de canais iônicos protéicos transmembrana, na qual estão incluídos os canais de potássio e sódio dependentes de voltagem (YU & CATERALL, 2004). Os CCDV estão presentes em diversos processos fisiológicos e patológicos, em muitos tipos celulares. Estes canais são estruturas que medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica nas mais diferentes células (CATERALL *et al*, 2005). A atividade dos CCDV é essencial para acoplar sinalização elétrica com eventos fisiológicos celulares.

A principal subunidade dos CCDV é chamada de subunidade $\alpha 1$, e as subunidades auxiliares são conhecidas como β , $\alpha 2$, δ e γ (HOFFMANN *et al*, 1999).

A subunidade $\alpha 1$ é a maior delas, e nela estão incluídos os sensores de voltagem, o poro de condução iônica e o componente de portão do canal. Além dos locais de regulação do canal, por drogas e toxinas. As subunidades auxiliares modulam as propriedades do complexo canal, gerando a diversidade eletrofisiológica e farmacológica, em associação com a subunidade $\alpha 1$ (HOFMANN *et al*, 1999).

O FSH, que é o principal hormônio trófico para as células de Sertoli, estimula um aumento imediato no cálcio citosólico, do nível basal de aproximadamente 90nM- 100nM (valor encontrado na maioria das células eucarióticas) a 190nM (GORCZYNSKA & HANDELSMAN, 1991).

O aumento de cálcio induzido por FSH, em células de Sertoli isoladas frescas, é altamente específico, como indicado pelo fracasso pelos outros hormônio hipofisários, tais como o hormônio do crescimento, prolactina, hormônio adrenocorticotrófico e gonadotrofina coriônica humana, em modificar a concentração de cálcio citosólico em células de Sertoli.

Além disso, como demonstrado em estudos eletrofisiológicos feitos por Roche e Joffre (1988), o FSH induz a uma hiperpolarização e, portanto, uma alteração no limiar de ativação da célula e regula o complexo juncional entre as células de Sertoli. Por sua vez, o complexo juncional dessas células é regulado pelo cálcio.

Em experimento realizado com células de Sertoli frescas isoladas, em que realizou-se estimulação com FSH, houve aumento imediato de cálcio citosólico, que é reproduzido pelo AMPc. A resposta do cálcio citosólico ao FSH em células de Sertoli é mormente atribuível à sinalização que ocorre após a geração endógena de AMPc (GORCZYNSKA-FJÄLLING, 2004).

Os mecanismos de atenuação de corrente permanecem obscuros, mas podem implicar uma redução da probabilidade de abertura e/ou fechamento dos canais individuais. Acumulam-se consideráveis evidências de que proteínas de canais dependentes de voltagem são fosforiladas pelo sistema de quinases dependente de AMPc, sugerindo que tal fosforilação pode regular a função da proteína de canal. Esses dados refletem uma resposta ao início agudo da ação do FSH. Todavia, a longo prazo, como demonstrado por Grasso e Reichert, a exposição ao FSH induz um aumento de duas vezes na concentração de cálcio intracelular, nas células de Sertoli, conforme medida da captação de cálcio com exposição de 24h ao hormônio. Outros mecanismos

que não os associados à abertura imediata do canal podem ser induzidos por FSH mais tardiamente, e, assim, requerendo exposição prolongada ao hormônio (GRASSO & REICHERT, 1989).

2. OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Analisar o componente hiperpolarizante da resposta do FSH e do isoproterenol sobre a membrana de células de Sertoli de testículos de ratos imaturos e observar a relação deste efeito com o controle da abertura dos canais de K^+_{ATP} .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Verificar o envolvimento da adenilato ciclase sobre a resposta eletrofisiológica do FSH e do isoproterenol sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$;

✓ Avaliar o efeito de agonistas e antagonistas das subunidades Gs e Gi na ação do FSH sobre o potencial de membrana e sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$.

✓ Relacionar o componente hiperpolarizante da ação do FSH com a ação do agonista β -adrenérgico, isoproterenol;

✓ Verificar o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} na resposta eletrofisiológica ao isoproterenol e ao FSH com a utilização de bloqueadores e agonistas específicos para este canal.

✓ Verificar se a ação eletrofisiológica do isoproterenol sobre a captação de $^{45}Ca^{2+}$ envolve a via de sinalização da proteína Gi.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos com idade entre 10-15 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Os ratos ficavam com as mães até o momento do experimento. As mães eram mantidas em gaiolas individuais onde recebiam ração Purina, Nutripal (Porto Alegre -RS) e água “*ad libitum*”, com iluminação controlada em ciclos de 12 horas e a temperatura controlada a aproximadamente 24°C.

Sobre o cálculo amostral, para a técnica eletrofisiológica de registro intracelular foram utilizados mensalmente um total de 12 animais (3 por semana), divididos conforme os diferentes tratamentos, para a obtenção de um n=5 animais por grupo. Para a técnica de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ utilizou-se ratos de 10 a 12 dias de idade, foram realizados experimentos com 5 animais por experimento. Tais valores foram obtidos através do programa Epi Info versão 3.2.2, considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), poder da amostra de 80%).

Esta dissertação é parte do projeto “Diversidade das vias de sinalização do FSH e da Testosterona em células de Sertoli”, o qual obteve aprovação no Comitê de Ética da UFRGS sob o número 2007861. Os ratos foram mortos por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos do animal por incisão abdominal, limpos e decapsulados.

3.2 TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRb)

Foi utilizada uma solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) como meio de incubação, em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza 'pró-análise' (P.A) da *E. Merck* (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções estoques conforme tabela 3.1.

TABELA1: Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final na Solução KRb (mM)
	(g/L)	(M)	
NaCl CLORETO DE SÓDIO	180,00	3,08	146
KCl CLORETO DE POTÁSSIO	9,20	0,123	4,7
KH₂PO₄ FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO	4,22	0,031	1,2
NaHCO₃ BICARBONATO DE SÓDIO	54,60	0,65	25

MgSO₄.7H₂O	7,64	0,031	1,2
SULFATO DE MAGNÉSIO			
CaCl₂.2H₂O	9,60	0,065	2,5
CLORETO DE CÁLCIO			
C₆H₁₂O₆	25,00	0,14	5,5
<i>Glicose</i>			

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obterem-se as concentrações finais descritas na tabela 3.1. A solução era gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em pHmetro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS:

a) Isótopo radioativo de Cálcio [⁴⁵Ca²⁺]- atividade específica 1mCi/mg, adquirido da Du Pont – NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2μCi/mL. A meia vida é de 163 dias, e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela Du Pont-NEN Research Products, em função da data de fabricação.

b) Líquido de Cintilação: Optiphase Hisafe III (Wallac, Finlândia). Foi utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

c) Hormônio Folículo Estimulante (FSH): (FSH Porcini- Sigma-Aldrich, Inc-USA): FSGH retirado de hipófise ovina. Contendo 50 unidades por vial, mensurados através de ensaio Steelman-Pohley tendo como referência padrão NIH-FSH-S1 (ovine sigma). O FSH foi utilizado em uma concentração de 4mU/mL para cada tubo dos experimentos de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e transporte de [^{14}C]-MeAIB, e para os experimentos de eletrofisiologia foi calculado para ter uma concentração final de 4mU/aplicação. O FSH foi pesado em balança analítica e diluído em solução de Krebs-Ringer bicarbonato até a concentração desejada.

d) Isoproterenol (ISO, Sigma- USA): Catecolamina sintética/ agonista beta-adrenérgico que atua tanto em receptores beta-adrenérgico-1 (β -1) como betaadrenérgico-2 (β -2).

ISO foi pesado em balança analítica e diluído em solução de Krebs-Ringer bicarbonato até a concentração desejada.

e) Toxina Pertussis de *Bordetella pertussis* (Pertussis Toxin, PTX, Sigma-Aldrich, Inc-USA). A toxina pertussis foi diluída com 500 μL de água estéril, em capela de fluxo laminar. Desta solução-mãe, alíquotas foram retiradas, as quais foram diluídas em solução de Krebs Ringer, para os experimentos. Foram utilizadas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250ng/mL.

f) Toxina Colérica (Cholera Toxin, Sigma-Aldrich): ativador da proteína G_s (subunidade estimulatória da proteína G). A toxina colérica (100 μg) foi diluída em 1000 μL de água destilada. Alíquotas de 1 μL foram retiradas da

solução inicial para, posteriormente, realizar diluição em solução de Krebs Ringer (100 μ L). Utilizou-se a concentração de 10 ng/mL para as aplicações tópicas realizadas em experimentos.

g) Tolbutamida (Tolbutamide, RBI): sulfoniluréia com ação bloqueadora do canal de K⁺ATP. Esta substância foi pesada em balança analítica e diluída em solução de Krebs-Ringer bicarbonato até a concentração desejada.

h) Glibenclamida(RBI): sulfoniluréia com ação bloqueadora do canal de K⁺ATP. Esta sulfonilureia foi pesada em balança analítica e diluída em solução de Krebs-Ringer bicarbonato até a concentração desejada.

i) Diazoxida (RBI): sulfoniluréia com ação agonista sobre o canal de K⁺ATP. Foi pesada em balança analítica e diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) até a concentração desejada.

j) Testosterona (Sigma- USA): hormônio esteróide com ação andrógena. Foi pesado em balança analítica e diluído em Krb produzindo uma solução com 1 μ M de concentração final no experimento. Utilizou-se etanol para diluição numa dose que não produz efeito no resultado para a solução-mãe. Então, retirou-se alíquotas as quais foram diluídas em Krb.

l) SQ 22,536(9-(Tetrahydro-2-furanil)-9H-purin-6-amina, Sigma-Aldrich, Inc-USA). Inibidor de Adenilil ciclase. PM: 205.22. SQ 22536 foi pesado em balança analítica em diluído em Krb produzindo uma solução com 100 μ M de concentração final no experimento.

3.4 ELETROFISIOLOGIA

3.4.1 PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e decapsulados. Um dos testículos, escolhido aleatoriamente, era estendido com duas pinças de maneira a isolar de 4 a 8 túbulos seminíferos, sendo estes presos ao fundo da câmara de perfusão com auxílio de uma grade feita de fio ortodôntico. A câmara, cujo volume era de 1 mL, estava preenchida com KRb glicosado (FIG 6).

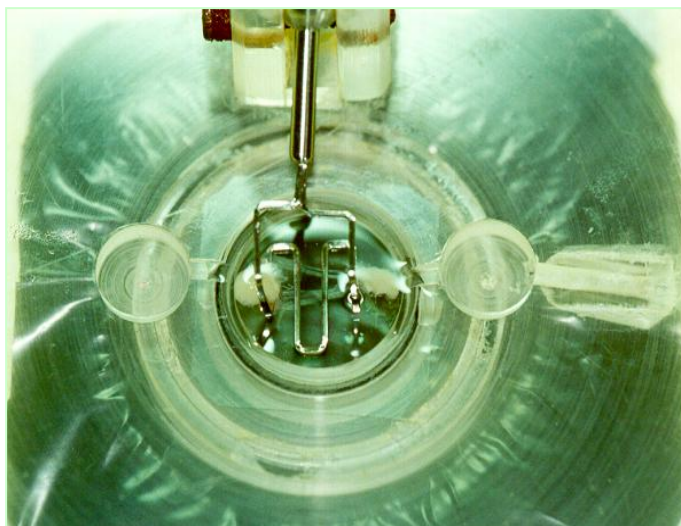


FIGURA 6: Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.

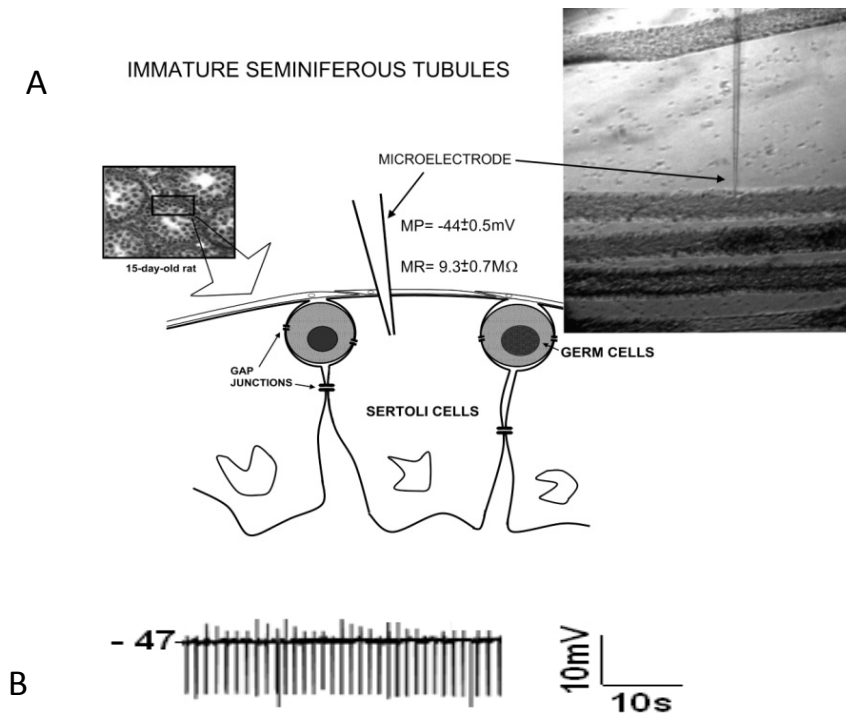


Figura 7: (A) Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana (MP) e resistência da membrana (MR). (B) Representação de um registro de controle de uma célula de Sertoli com potencial de membrana de -47 mV . Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de $0,5 \text{ nA}$.

Todo o KRb utilizado nos experimentos de eletrofisiologia foi glicosado e filtrado em papel filtro antes da sua utilização. A preparação foi então levada ao microscópio invertido (*Nikon- Inverted Microscope Diaphot – TMD*) e conectada ao sistema de perfusão do KRb. O KRb foi mantido num banho a 38°C e chegava na câmara de perfusão em 36°C . O pH foi mantido em 7.4 com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5; v/v) durante todo o experimento. O fluxo foi mantido a 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (*Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1*). A preparação ficava 30 minutos estabilizando-se antes do início dos registros. Após este período, uma célula de Sertoli era empalada com uma microeletrodo de vidro, sob controle visual.

3.4.2 PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO

Para o registro intracelular foram utilizados microeletrodos, feitos a partir de uma micropipeta de vidro de borossilicato (*World Precision Instruments, Inc., USA*) com diâmetro externo de 1,2mm, com filamento interno, que facilita seu posterior preenchimento. As pontas das micropipetas foram estiradas para possibilitar o empalamento, num estirador de pipetas vertical (*David Kopf Instruments, Tujunga, Califórnia - Vertical Pipette Puller – modelo 700C*). A intensidade do calor e a força do estiramento foram reguladas independentemente, até serem alcançados os parâmetros ideais para viabilizar o empalamento das células de Sertoli. A resistência ideal do microeletrodo para o empalamento de células de Sertoli é de 15 a 25 megaohms ($M\Omega$) (Von Lebeduret *al.*, 2002). A fim de obterem-se resultados reprodutíveis na confecção dos microeletrodos, as correntes de ar eram excluídas e a temperatura ambiente era mantida estável em 21 - 22°C.

Uma vez confeccionados, os microeletrodos foram preenchidos com solução KCl 3M e conectados a um “*holder*” (eletrodo de prata) acoplado a um dispositivo ligado ao eletrômetro, que também foi preenchido com a mesma solução de KCl 3M, e fazendo contato elétrico com o eletrodo. O KCl utilizado era filtrado em papel filtro diariamente. O conjunto era então conectado ao eletrômetro. A movimentação mecânica do eletrodo para aproximação das células e empalamento era feita por um micromanipulador mecânico Kite-R (*World Precision Instruments, Inc., USA*) capaz de movimentos macros e micros nos três eixos.

O eletrodo de referência era mergulhado na câmara de perfusão e conectado através de um fio ao terminal “terra” do eletrômetro. Este eletrodo consiste em um fio de prata cloretado (Ag/AgCl). A cloretagem era feita diariamente antes do início do experimento, limpando-se o fio de prata com esponja de aço e o mergulhando em solução de hipoclorito de sódio comercial (hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e água) por no mínimo 30min. Antes de mergulhá-lo na câmara de perfusão, o fio era enxaguado com água destilada.

O potencial de membrana da célula é apenas um dos muitos fatores que contribuem para a diferença de potencial medida entre o eletrodo de registro intracelular e o eletrodo de referência. Diferenças de potenciais que ocorrem mesmo com ambos os eletrodos mergulhados no líquido extracelular são devidos a diferenças no comportamento elétrico que ocorre nas interfaces entre soluções e o metal, ou entre soluções de composições diferentes. Essas diferenças são anuladas através de dispositivos específicos no eletrômetro, para que possamos visualizar somente o potencial de membrana, eliminando desta forma qualquer interferência no registro.

3.4.3 EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO

Os dois eletrodos, de registro e de referência, eram conectados a um pré-amplificador de alta impedância, Eletrômetro Intra 767 (*World Precision Instruments, Inc., USA*), e o sinal era monitorado neste aparelho e em um osciloscópio (*Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210*). Os traçados

observados no osciloscópio eram adquiridos e armazenados em computador através de uma placa e um programa de interface (*Wavestar Lite Version 1.0.10*)

Além dos elementos de interesse biológico, o sistema de registro eletrofisiológico possui resistência e capacitância próprias. Esses elementos conferem “ruído” ao sistema e devem ser neutralizados antes do início do experimento através de dispositivos no eletrômetro. Desta forma, quando ambos os eletrodos estavam em líquido extracelular, ajustava-se a leitura próxima à zero no eletrômetro e no osciloscópio, nenhuma diferença de potencial era registrada. No momento em que o eletrodo de registro penetrava uma célula, um salto abrupto na direção negativa era visualizado no eletrômetro e no osciloscópio, e registrado no computador. A intensidade desta queda fornece o potencial de membrana da célula empalada.

Ao mesmo tempo em que se media o potencial de repouso da membrana, o eletrômetro passava pulsos de corrente de 0,5 nA na célula (Figura 7A). Esta corrente era originada em um estimulador capaz de gerar pulsos retangulares de corrente contínua, (*S48 Stimulator - Grass Instrument Division, W. Warwick, RI, USA*). Este estimulador regulava a frequência (0,5Hz) e a duração (250ms) desses pulsos. O dispositivo acoplado ao eletrômetro, que faz a interface com o “holder”, apresenta uma resistência de 20×10^6 ohms, que reduz a corrente destes pulsos que chega às células em níveis compatíveis.

Quando uma célula era empalada, aguardava-se a estabilização de seu potencial de membrana e de sua resistência de membrana até que permanecessem estáveis, por no mínimo 2 minutos, e só então os agentes a serem investigados eram aplicados. O potencial de repouso foi considerado

como controle, nestes experimentos. Para evitar trabalhar com células germinativas, utilizou-se apenas células cujos potenciais de membrana eram mais negativos que -35mV , já que esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli de túbulos seminíferos normais (Eusebi *et al.*, 1983), e em túbulos seminíferos enriquecidos com células de Sertoli (SCE), através de irradiação *in útero* durante a gestação. Procedimento adotado para eliminar as células germinativas do tecido, restando apenas células de Sertoli (Wasserman *et al.*, 1992).

O FSH foi aplicado topicamente no banho com pipeta automática, após a estabilização do potencial de membrana por aproximadamente 2 minutos ou associado ao tratamento com outras drogas. Soluções de ação bloqueadora sobre os canais sensíveis ao ATP, como a sulfonilureia tolbutamida, as quais foram perfundidas nas células por 3 minutos antes da aplicação tópica do hormônio. Um inibidor da enzima adenilato ciclase foi perfundido anteriormente à aplicação do FSH. O isoproterenol foi aplicado topicamente no banho com pipeta automática, após a estabilização do potencial de membrana por aproximadamente 2 minutos ou associado ao tratamento com outras drogas. Soluções de ação bloqueadora sobre os canais sensíveis ao ATP, entre elas as sulfonilureias tolbutamida e glibenclamida, a testosterona, foram perfundidas nas células por 3 minutos antes da aplicação tópica do hormônio. Também utilizou-se uma substância bloqueadora da proteína G_i , a toxina pertussis (PTX), experimento no qual os testículos foram pré-incubados por 1 hora antes do estiramento dos túbulos e procedimento eletrofisiológico, com aplicação tópica do FSH. Fez-se uso, ainda de um agonista da subunidade G_s da

proteína G, a toxina colérica, nas técnicas de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e eletrofisiológica.

3.4.4 CÁLCULO DA INTENSIDADE DO PULSO APLICADO

Para aplicar pulsos de corrente de 0,5nA, utilizou-se a lei de Ohm, como segue, para calcular a voltagem a ser aplicada pelo estimulador. Essa voltagem passava antes pelo eletrômetro, cuja resistência era de $20 \times 10^6 \Omega$.

corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I = V/R \Rightarrow V = I \times R$$

$$V = (0,5 \times 10^{-9} \text{ A}) \times (20 \times 10^6 \Omega)$$

$$V = 10 \times 10^{-3} \text{ V}$$

$$V = 10 \text{ mV}$$

Assim, o estimulador era regulado para aplicar uma voltagem de 10mV, que resultava numa corrente de 0,5nA na ponta do eletrodo de vidro.

3.4.5 CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA

A resistência da membrana (R) foi calculada utilizando-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I=V/R \Rightarrow R=V/I$$

Resistência da membrana = Voltagem registrada no osciloscópio / pulso de Corrente aplicado.

A voltagem registrada no osciloscópio relacionado ao valor de resistência corresponde ao traçado vertical, obtido no registro do potencial de membrana da célula, em decorrência do pulso de corrente aplicado. O pulso de corrente aplicado era de 0,5nA.

3.5 EXPERIMENTOS DE CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Os testículos foram limpos, pesados e decapsulados. As gônadas foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1mL de KRb (Krebs Ringer bicarbonato) resultando em um

número de 5 testículos para cada grupo experimental. As gônadas foram incubadas em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C em ambiente gaseificado com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), para a manutenção do pH. O período de pré-incubação era de 60 minutos em 800µL de KRb com ⁴⁵Ca²⁺ (4,44 KBq/20ng ou 0,2µCi) para alcançar o equilíbrio intra e extracelular de ⁴⁵Ca²⁺.

O período de incubação foi de 2 minutos a partir da aplicação de KRb com ⁴⁵Ca²⁺ com ou sem FSH, isoproterenol. Quando aplicados inibidores de eventos pós-receptor, estes eram adicionados 10 minutos antes da incubação, com exceção de PTX, que foi aplicada a partir do início do período de pré-incubação. Para finalizar a incubação foi adicionado à cada tubo, 1 ml de cloreto de lantânio (LaCl₃) (10 mM) à 0°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA & SJOGREN, 1983). O sobrenadante foi preservado, e os testículos foram removidos para tubos com 1 ml de água destilada. O tecido foi congelado e posteriormente fervido para que houvesse extravasamento do meio interno para a água destilada. Alíquotas de 0,1ml foram retiradas de cada tubo (sobrenadante e meio interno) para medida da radioatividade em líquido de Aquasol 2 Optiphase, procedendo-se a leitura em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia). A eficiência de contagem é de 85-90%. Os resultados foram expressos pela razão pmoles ⁴⁵Ca²⁺/ g de tecido.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos de registro intracelular os tratamentos eram repetidos pelo menos 5 vezes. O potencial de repouso era considerado como controle, sendo que a análise era pareada, neste caso. O número de amostras por grupo experimental era de no mínimo 5 nos experimentos de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, cálculo amostral realizado com software *winpepi versão 9*, utilizando um poder amostral de 80% e um intervalo de confiança de 95%. Para a análise estatística foram utilizados o Teste-t de Student para comparação entre dois grupos ou ANOVA de uma ou duas vias, conforme o experimento, seguido do pós-teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa *InStat*, versão 3.01,32 bit para Windows 95/NT, da (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 ENVOLVIMENTO DA ADENILATO CICLASE NA CAPTAÇÃO DE CÁLCIO ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) E NA AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO FSH SOBRE A CÉLULA DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS

O SQ 22536 (100 μM), um inibidor da enzima adenilato ciclase quando perfundido, bloqueou a fase de hiperpolarização causada pelo FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos.

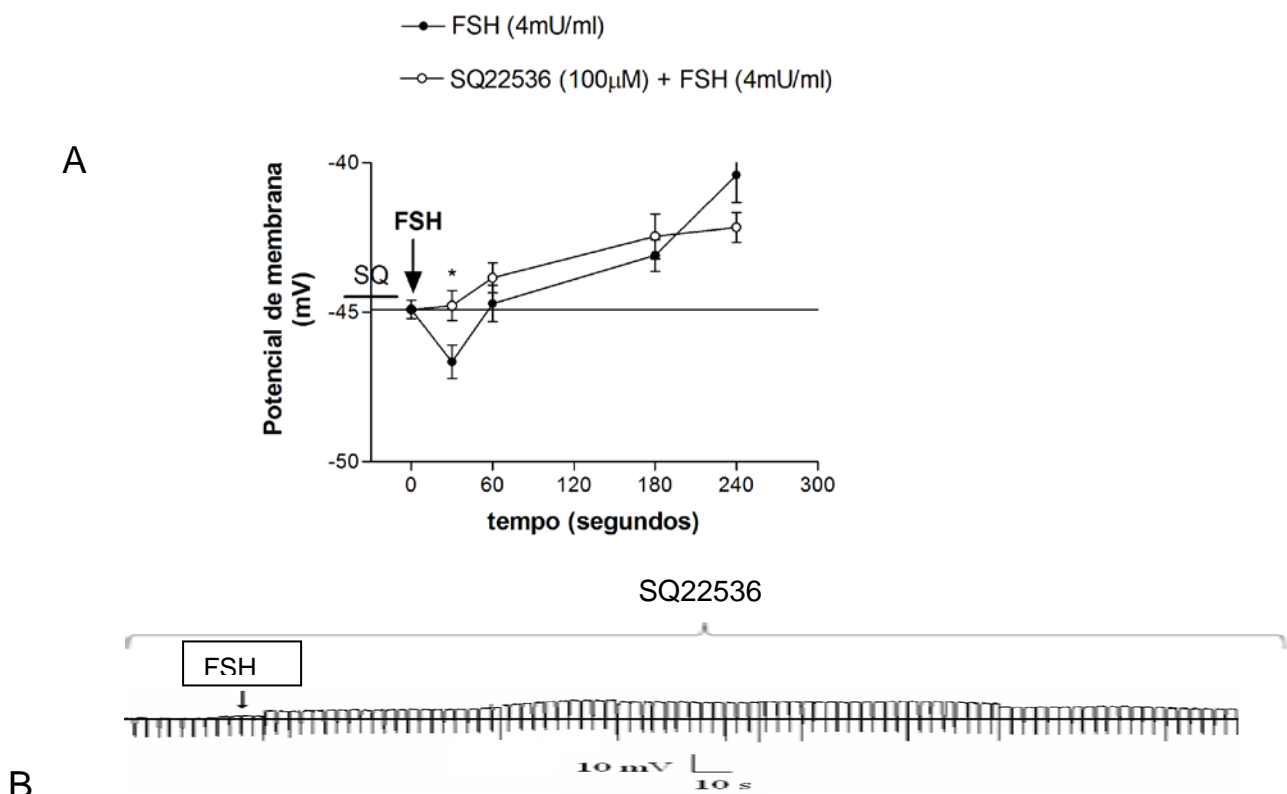


Figura 8: (A) Efeito de SQ22536 sobre a ação eletrofisiológica do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Registro eletrofisiológico do efeito de SQ22536 sobre a ação eletrofisiológica do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos. (n=6) (*p < 0,05 se comparado com FSH).

4.2 ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA G NA AÇÃO DO FSH E NO POTENCIAL DE MEMBRANA E NA CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ PELAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS

A toxina colérica, que estimula proteína Gs, não estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli de ratos imaturos. Este dado nos permite inferir que a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ observada nas células de Sertoli não ocorre através da via de estimulação da proteína Gs (Figura9).

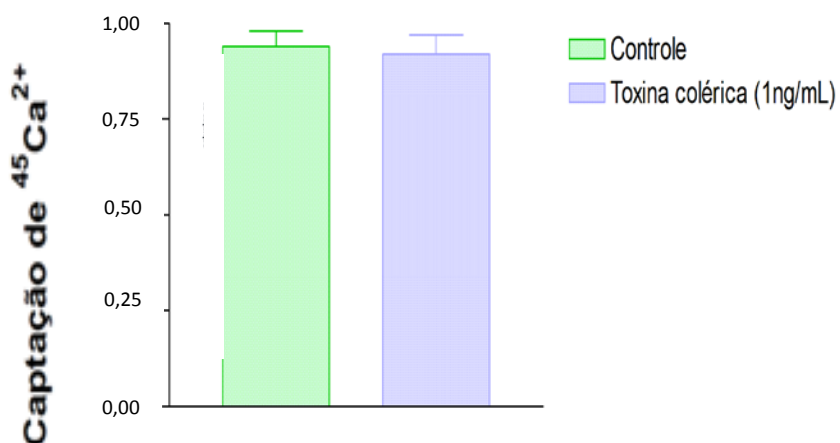


FIGURA9: Ação da toxina colérica (1ng/mL) com 2 minutos de incubação sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli de ratos imaturos (n=5).

4.3 EFEITO DE SULFONILUREIAS SOBRE A RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DO ISOPROTERENOL E DO FSH NAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS WISTAR IMATUROS

O isoproterenol ($2\mu\text{M}$), agonista beta-adrenérgico, produz uma hiperpolarização sobre o potencial de membrana da célula de Sertoli (Figura10A e 10B).

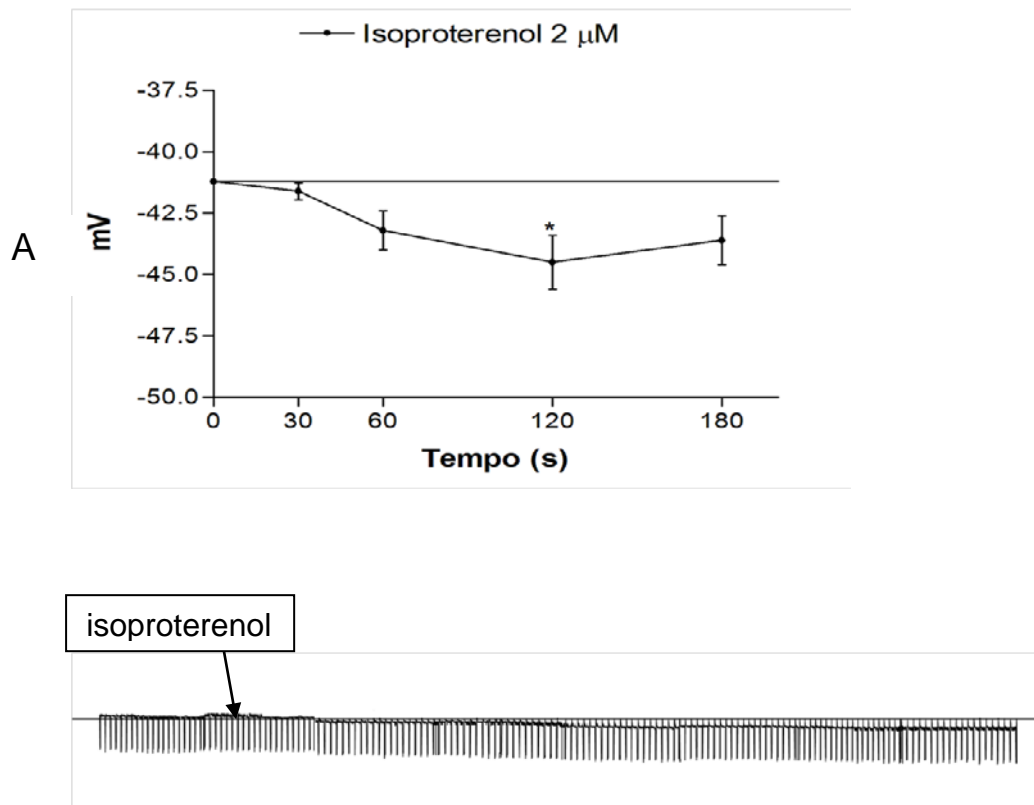


Figura 10: (A) Perfil da ação de isoproterenol (2 μ M) no potencial de membrana das células de Sertoli (n=5; *p<0,05 quando comparado com basal). (B) Célula típica de -40 mV, com aplicação tópica de isoproterenol (2 μ M).

A tolbutamida (10 μ M), uma sulfonilureia de ação bloqueadora sobre o canal de K⁺_{ATP}, quando aplicada topicamente, impediu a hiperpolarização característica causada pelo isoproterenol (2 μ M), causando despolarização do potencial de membrana.(Figura 11A e 11B).

A perfusão com tolbutamida (10 μ M) foi mais eficaz no bloqueio da resposta beta-adrenérgica do isoproterenol (2 μ M), causando despolarização do potencial de membrana da célula de Sertoli (Figura 12A e 12B).

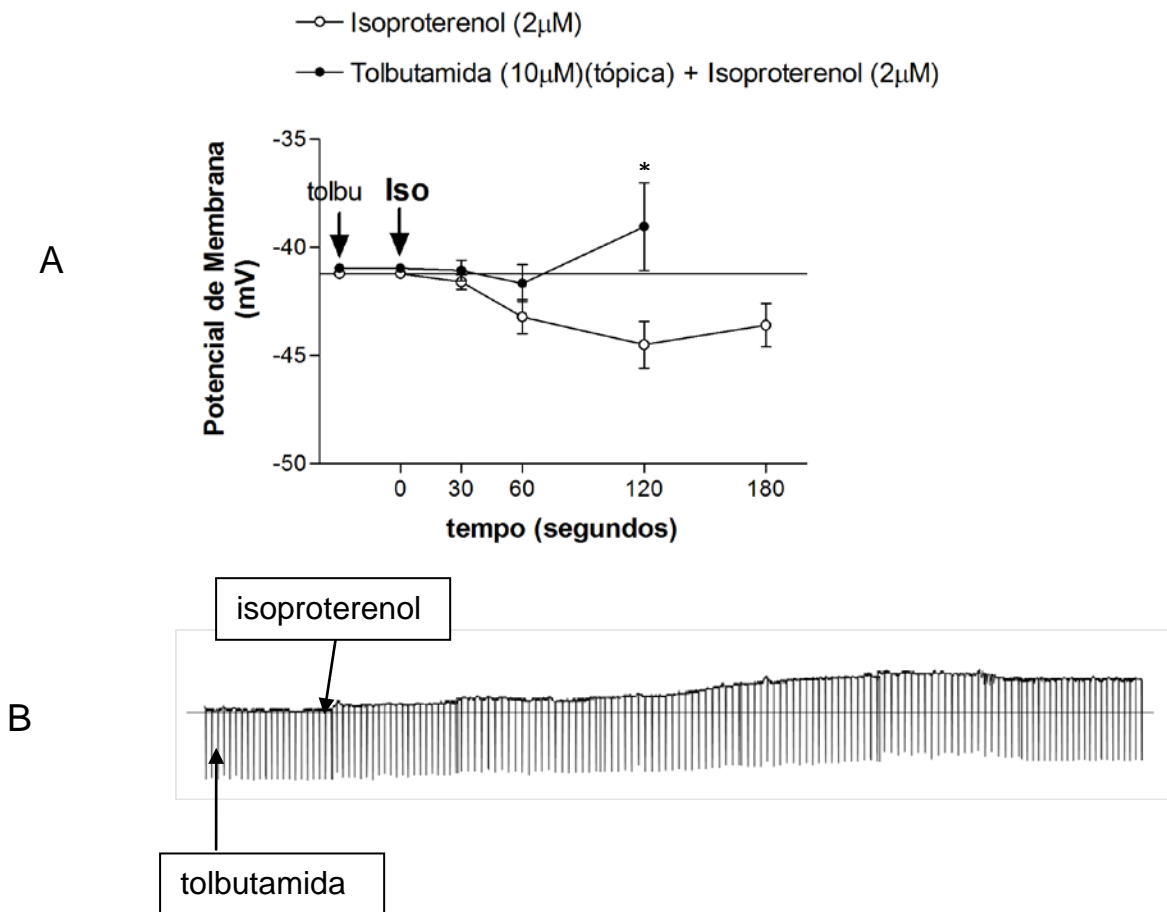
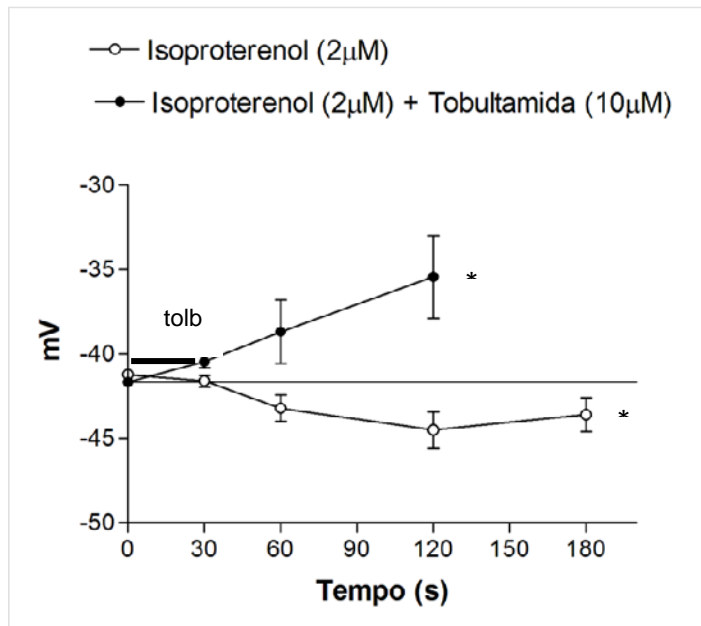


FIGURA11: (A) Efeito da aplicação tópica de tolbutamida (10µM) sobre a ação do isoproterenol (2µM) no potencial de membrana das células de Sertoli (n=6; *p<0,05 se comparado com isoproterenol). (B) Célula de -45 mV, com aplicação tópica de tolbutamida (10µM) e isoproterenol (2µM).

A



B

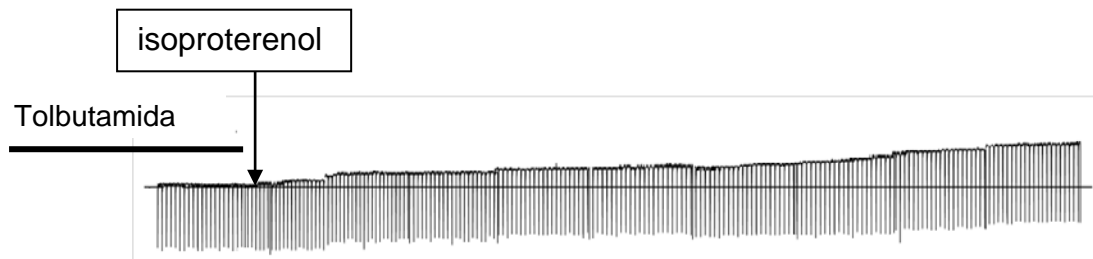


FIGURA12: (A) Efeito da perfusão de tolbutamida ($10\mu\text{M}$) sobre a ação do isoproterenol ($2\mu\text{M}$) no potencial de membrana das células de Sertoli ($n=9$; $*p<0,05$ se comparado com isoproterenol) (B) Célula de -42 mV , com perfusão de tolbutamida ($10\mu\text{M}$) e aplicação tópica de isoproterenol ($2\mu\text{M}$).

A aplicação tópica de glibenclamida ($10\mu\text{M}$), a qual também é uma sulfonilureia de efeito inibidor sobre o canal de K^+_{ATP} , bloqueou a ação do isoproterenol ($2\mu\text{M}$), causando despolarização, demonstrando que a ação hiperpolarizante do isoproterenol está relacionada com a abertura desses canais (Figura 13A e 13B).

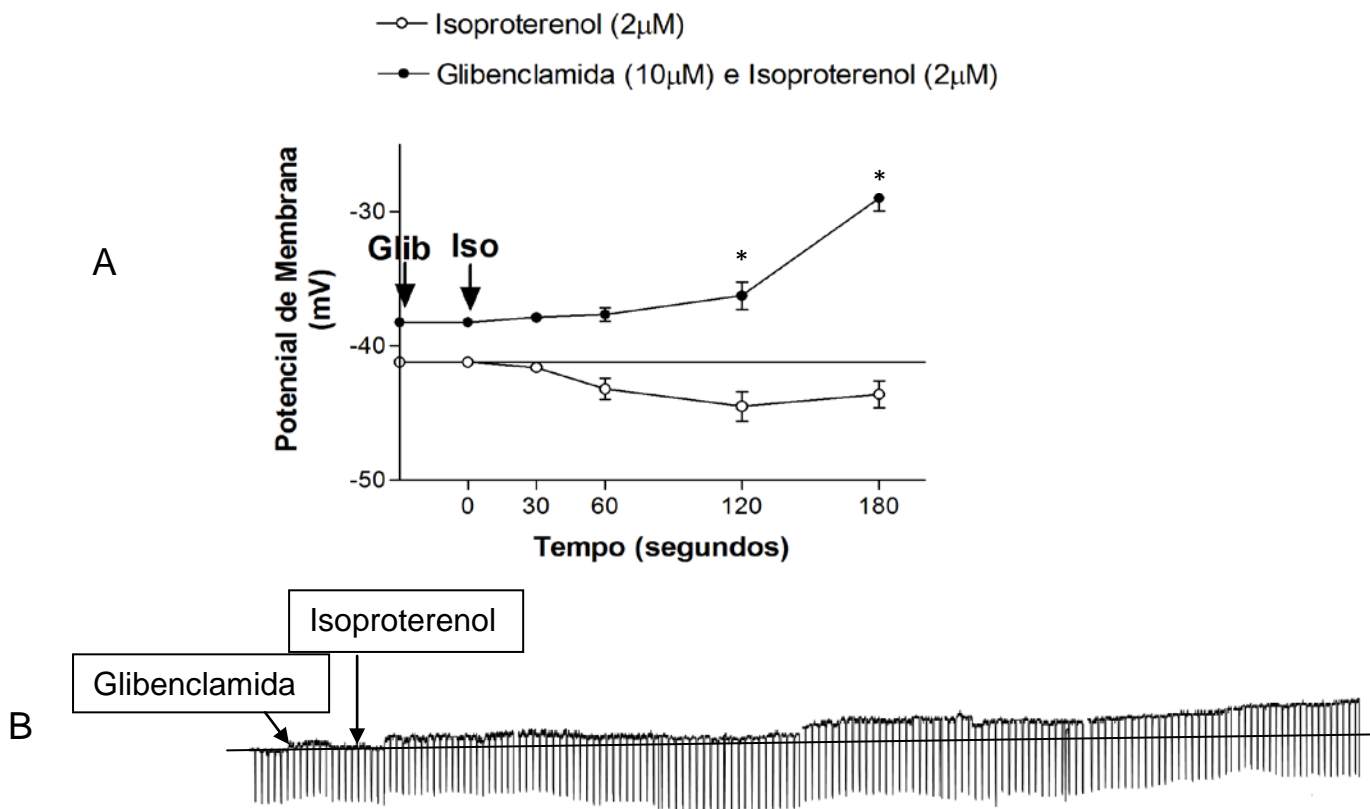


FIGURA13.(A) Efeito da aplicação tópica da glibenclamida (10µM) sobre a ação do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos(B) Registro eletrofisiológico da aplicação tópica da glibenclamida (10µM) sobre a ação do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos(n=9) (*p<0,05 se comparado com isoproterenol).

A tolbutamida (10µM), quando aplicada topicamente, impediu a fase de hiperpolarização característica causada pelo FSH (4mU/mL), causando despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos (Figura 14).

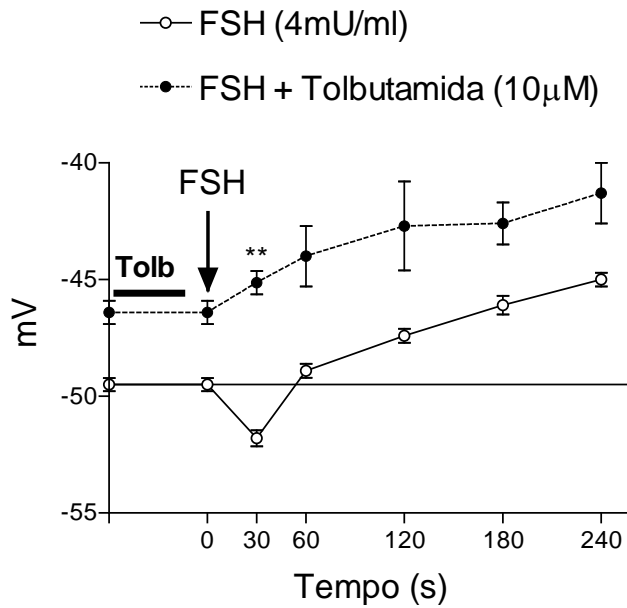


Figura 14: Efeito da aplicação tópica da tolbutamida (10µM) sobre a ação do FSH (4mU/mL) nas células de Sertoli de ratos imaturos (n=5; **p<0,01).

4.4 AÇÃO DE PTX SOBRE O EFEITO ELETROFISIOLÓGICO DO ISOPROTERENOL SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

A toxina pertussis (PTX) quando foi aplicada topicamente e anteriormente à aplicação de isoproterenol não impediu a hiperpolarização característica causada por isoproterenol. Este dado confirma que a ação hiperpolarizante de isoproterenol independe de proteína Gi e que isoproterenol age através da via Gs-AC-AMPC-PKA (Figura 15A e 15B).

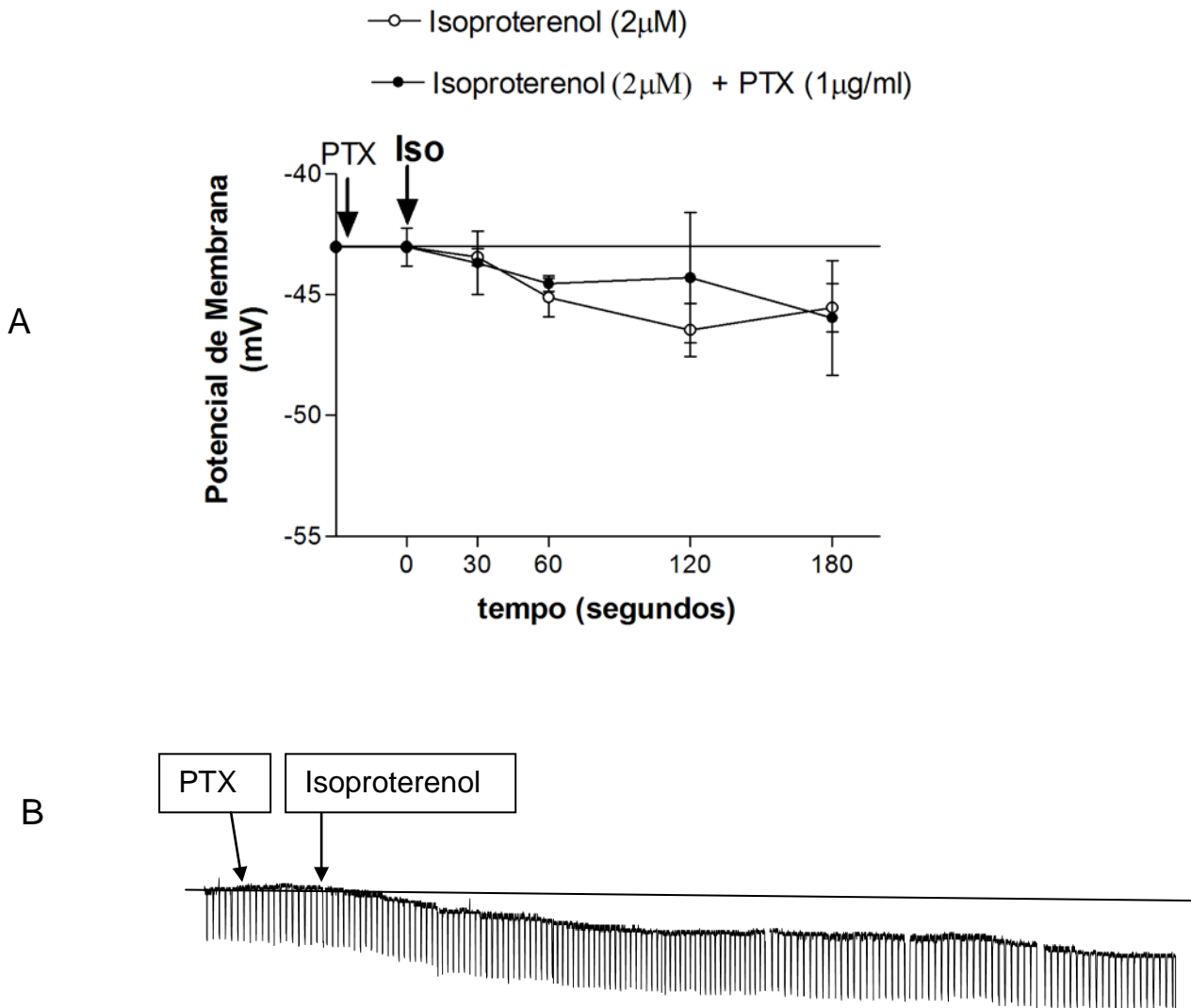


Figura 15: (A) Efeito da PTX (1µg/mL) sobre a ação eletrofisiológica do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Registro eletrofisiológico da PTX (1µg/mL) sobre a ação eletrofisiológica do isoproterenol (2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos (n=10).

Além disso, PTX não impediu a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo isoproterenol. Como a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ não bloqueou a ação do isoproterenol, podemos inferir que este β - adrenérgico não atua via proteína Gas (Figura 16).

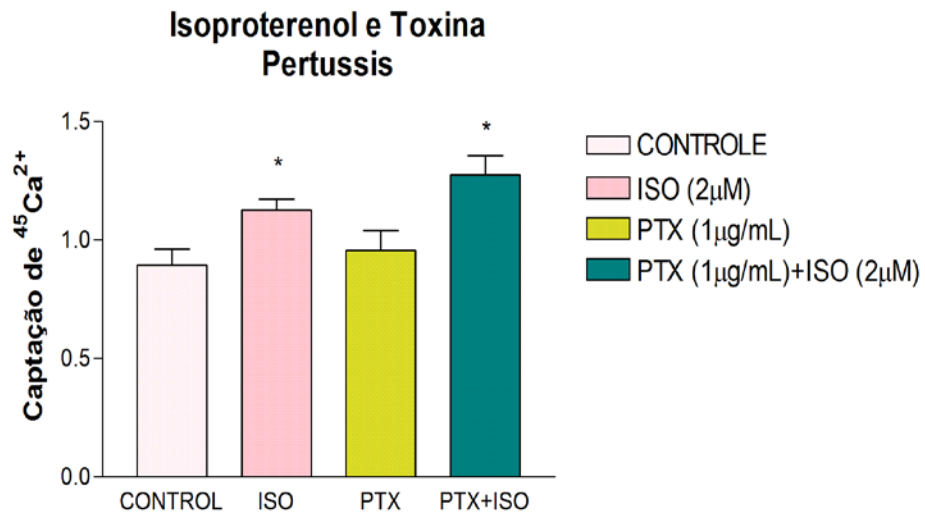


FIGURA 16: Efeito da PTX (1µg/mL) sobre a ação de isoproterenol(2µM) nas células de Sertoli de ratos imaturos (n=5; *p<0,05).

5 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

FSH e testosterona são hormônios necessários para a ocorrência do potencial reprodutivo completo (WALKER & CHENG, 2005). FSH e a testosterona exercem diferentes efeitos reguladores no epitélio seminífero; atuam através de múltiplas e complexas vias de sinalização para orientar o desenvolvimento das células germinativas até estas se tornarem espermatozóides maduros (LOSS *et al*, 2007).

No presente estudo buscou-se compreender melhor a ação eletrofisiológica do FSH e a via de sinalização do FSH na célula de Sertoli de ratos Wistar na fase pré-pubere.

Recentes avanços na identificação de novas vias de sinalização que são reguladas por FSH e testosterona tem permitido o refinamento da compreensão das ações independentes, sobrepostas e sinérgicas desses hormônios (WALKER & CHENG, 2005).

Resultados encontrados pelo nosso laboratório indicam que há vias rápidas em células de Sertoli de ratos imaturos as quais são reguladas por FSH e testosterona.

O FSH produz efeitos rápidos e não-rápidos na membrana das células de Sertoli. Dentre os efeitos rápidos do FSH estão a despolarização do potencial de membrana e o estímulo sobre a captação de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) tipo L, em células de Sertoli de ratos imaturos; ambos ocorrem num período de segundos a minutos

(GRASSO & REICHERT,1989; GORCZYNSKA & HANDELSMAN, 1991;JACOBUS et al, 2010).

Nas células de Sertoli, o FSH conduz a um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} através de um processo cinético bifásico (GRASSO & REICHERT, 1990). A primeira fase, muito rápida (segundos) também é chamada de “fase de impulso”; associada com uma corrente através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L (WASSERMANN *et al*, 1992a;WASSERMANN *et al*, 1992b) . A segunda fase é mais lenta (minutos a horas), denominada “fase sustentada”, compreende a mobilização de Ca^{2+} intracelular via AMPc (GRASSO & REICHERT, 1990; SILVA *et al*, 1994; GORKZYNSKA *et al*, 1994).

Em estudos prévios, utilizando técnica de registro intracelular em células de Sertoli observou-se que a ação eletrofisiológica característica do FSH(4mU/ml) provoca uma rápida hiperpolarização (menos de 5 segundos), seguida de uma despolarização prolongada (até 6 minutos) (Figura 17) (WASSERMANN *et al* 1992b; JACOBUS *et al*, 2010).



FIGURA 17: Perfil da ação do FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli (n= 10) (*p<0,05 (n=5) (*p<0,05) (JACOBUS *et al*, 2007).

A fase despolarizante da ação do FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de túbulos seminíferos de ratos imaturos, parece estar relacionada com a entrada rápida de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nessas células estimulada pelo hormônio (LOSS *et al*, 2007; JACOBUS *et al*, 2010).

Em conformidade com o resultado supracitado, o aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ produzido por FSH nas células de Sertoli, foi bloqueado por verapamil, um bloqueador de canal de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo L (Figura 17) (WASSERMANN *et al*, 1992b; JACOBUS *et al*, 2005; JACOBUS *et al*, 2010). Esse dado confirma que o influxo de cálcio estimulado por FSH nas células de Sertoli, ocorre pelo canal de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo L.

Experimentos com células de Sertoli relatam que o aumento de Ca^{2+} nessas células pode ocorrer de forma dependente ou independente de AMPc (ULLO-AGUIRRE *et al*, 2007).

O aumento do influxo de Ca^{2+} nas células de Sertoli, desencadeado em resposta à ação de FSH, também foi relatado por Brucatto, Bocquet e Villers (2002). Mostrado ainda, nos experimentos realizados por Grasso & Reichert (1989), Gorczynska & Handelsman (1991).

Já está bem estabelecido que o FSH, ao se ligar ao seu receptor FSH-R, produz a ativação da enzima adenilato ciclase para, posteriormente produzir o aumento do AMPc em células de Sertoli (MEANS *et al*, 1980; BRUCATTO *et al*, 2002). Estudo realizado por Brucatto e pesquisadores (2002), em células de Sertoli de ratos imaturos, relata que a transdução desencadeada por FSH envolve tanto aumento como síntese de AMPc intracelular, além de promover influxo de cálcio.

Utilizando a forskolina, um ativador da enzima adenilato ciclase, foi observado um efeito hiperpolarizante no potencial de membrana das células de Sertoli. Esta hiperpolarização é de maior intensidade e mais prolongada se comparada com o efeito do FSH (Figura 18)(JACOBUS *et al*, 2005; JACOBUS *et al*, 2010).

A forskolina, na dose de 100nM não provocou alteração sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Dessa forma, verificou-se que a ação estimulatória do FSH sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ independe do envolvimento da adenilato ciclase (Figura 18).

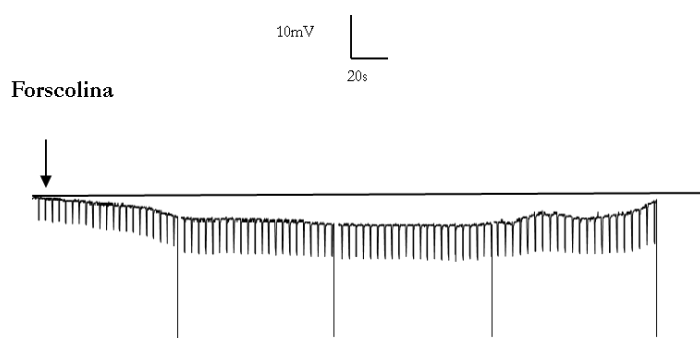


FIGURA 18: Efeito da forskolina (100nM) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli (n=10, *p<0,05) (JACOBUS *et al*, 2010).

Ademais, estudos feitos com forskolina tornaram clara a noção de que a ação despolarizante do FSH é independente da via de sinalização dependente de AMPc, uma vez que a forskolina não estimulou a captação de Ca^{2+} (SHARMA *et al*, 1994).

Com relação à captação de Ca^{2+} , via canal de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo L, autores afirmam que essa ocorre através da ação do GPCR via PI3K γ e não via AMPc (MACREZ *et al*, 2001, QUIGNARD *et al*, 2001). Além disso, autores relatam que, na forma independente de AMPc, diferentes

proteínas G ou subunidades $\beta\gamma$ podem estar envolvidos (NAKASHIMA & VANHOUTTE, 1995).

Deste modo, o FSH age estimulando a subunidade $G\beta\gamma$ da proteína G do receptor FSHR, que desencadeia a ativação da enzima PI3K γ , que fosforila PIP2 à PIP3, via de sinalização esta que potencializa a abertura de canais de Ca^{2+} do tipo L, aumentando a entrada de Ca^{2+} , via proteína G_i ($G\beta\gamma$). A fase de despolarização causada por FSH nas células de Sertoli, portanto, está relacionada com a entrada de Ca^{2+} para o compartimento intracelular dessas células, mediada pela ativação da proteína G_i (JACOBUS *et al*, 2010).

Objetivando avaliar o efeito de PTX na fase despolarizante da ação eletrofisiológica estimulatória de FSH em células de Sertoli de ratos com idade entre 10 e 14 dias, utilizou-se, em nosso trabalho, a técnica de captação de $^{45}Ca^{2+}$. Realizou-se pré-incubação de testículos de ratos imaturos com PTX, por um período de 60 minutos. Observou-se que a PTX bloqueou o efeito estimulatório do FSH sobre o aumento da captação de $^{45}Ca^{2+}$ (Figura 19), evidenciando que a fase despolarizante da ação do FSH é mediada pela ativação da subunidade G_i do FSHR e que as fases de hiperpolarização e despolarização causadas pela ação de FSH nas células de Sertoli são decorrentes da ativação de diferentes efetores intracelulares.

Para alguns autores, os papéis das proteínas G_s e G_i na transdução de sinal de FSH nas células de Sertoli não estão bem definidos (GORKZYNSKA *et al*, 1994).

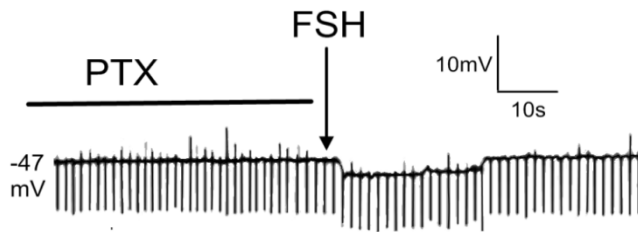


FIGURA 19: Efeito de PTX (1 μ g/mL) sobre a ação do FSH (4mU/mL) no potencial de membrana das células de Sertoli. Pré-incubação de 3 horas antes da aplicação tópica do FSH (n=9, **p<0,001 se comparado com FSH+PTX) (n=8; *p<0,05) (JACOBUS *et al*, 2010).

Em conformidade com nossos resultados, estudiosos observaram que o aumento rápido (60-240 segundos) de Ca²⁺ produzido por FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos foi significativamente bloqueado pela pré-incubação das células com PTX (1mg/L) por um período de 90 min. Tais autores argumentam que esse resultado indica que o FSH também pode estar ligado à Gi (GORKZYNSKA *et al*, 1994).

Ademais, Jacobus e colaboradores (2010) e LOSS *et al* (2011), notaram que as ações rápidas do FSH, que ocorrem de segundos a minutos, incluindo despolarização da membrana, estimulação da entrada de ⁴⁵Ca²⁺ e transporte de aminoácidos dependente de cálcio foram suprimidas por PTX e, concordando, portanto, com os achados do presente trabalho de que tais efeitos estariam sendo mediados pela subunidade Gi do FSHR.

No entanto, o componente hiperpolarizante da ação do FSH sobre as células de Sertoli de ratos imaturos ainda permanece a ser investigado, está associado à via Gs (LOSS *et al*, 2007; JACOBUS *et al*, 2010; LOSS *et al*, 2011).

A hiperpolarização causada pelo FSH pode estar relacionada com a ativação da adenilil ciclase levando a conversão de ATP em AMPc, através da

ligação a via Gs acoplada ao receptor de FSH. Este efeito foi descrito para receptores adrenérgicos, onde a redução de [ATP]_i causa uma diminuição de sua ação sobre a inibição dos canais de K⁺_{ATP}, aumentando a probabilidade de abertura deste canal, o que causa um efluxo de K⁺, e consequente hiperpolarização do potencial de membrana (NAKASHIMA & VANHOUTTE, 1995).

A fase de hiperpolarização do FSH, nas células de Sertoli, foi bloqueada por tolbutamida (inibidor de canal K⁺_{ATP}) (Figura 14), indicando que a hiperpolarização possui envolvimento com os canais de K⁺_{ATP}.

Ao avaliar a fase hiperpolarizante da ação do FSH, utilizou-se o SQ22536 (100µM), um inibidor da enzima adenilato ciclase. Quando aplicado topicamente, SQ22536 (100µM) bloqueou de forma significativa a fase de hiperpolarização causada pelo FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos (Figura 8A e 8B). Este resultado corrobora com a ideia de que a fase de hiperpolarização causada pelo FSH é dependente da participação da adenilato ciclase na via Gs-AC-AMPC-PKA.

Como mencionado anteriormente, as gônadas masculinas estão sob controle de uma inervação adrenérgica e as catecolaminas estão presentes em concentrações relativamente altas nos testículos; suficientes para ativar seus receptores nos diversos tipos celulares presentes no interstício e nos túbulos seminíferos (MAYERHOFER, 1999).

Foram examinados os efeitos diretos do agonista beta-adrenérgico isoproterenol e das catecolaminas noradrenalina e adrenalina sobre a produção testicular de testosterona, em hamsters com regressão gonadal induzida. Seus

resultados sugerem que as catecolaminas podem estar envolvidas na regulação dos receptores adrenérgicos nos testículos.

Buscando estudar o componente hiperpolarizante da ação eletrofisiológica do FSH, fez-se uso do isoproterenol, o qual age pela via Gs-AC-AMPC-PKA no receptor beta-adrenérgico por ser este um agonista deste receptor.

Utilizou-se o isoproterenol no intuito de investigar o componente hiperpolarizante do FSH, porquanto, sabidamente, o isoproterenol, assim como a fase hiperpolarizante da ação do FSH, atua através da via Gs-Ac-AMPC-PKA (JACOBUS *et al*, 2005). Além disso, foi observado que o isoproterenol produz aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli imaturas (JACOBUS *et al*, 2005) e estimula o transporte de aminoácido neutro nestas células (WASSWEMANN *et al*, 1996).

Outros autores também relatam que a ativação dos $\beta 2$ -AR resulta em compartimentalização da sinalização Gs/AMPC, afetando seletivamente efetores da membrana plasmática, como canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L (XIAO, 2001; LEBLAIS *et al*, 2004; JACOBUS *et al*, 2010).

Em trabalhos prévios de nosso laboratório, demonstrou-se que o isoproterenol hiperpolariza a membrana, sendo que o maior efeito foi obtido com a menor dose testada ($2\mu\text{M}$) e que a intensidade da resposta diminuía à medida que a dose aumentava (JACOBUS *et al*, 2005). Com base nesse resultado, utilizou-se, nesse trabalho, a concentração de $2\mu\text{M}$ para as aplicações tópicas realizadas com isoproterenol.

Na busca de avaliar melhor a ação eletrofisiológica do isoproterenol e, portanto, sua resposta beta-adrenérgica, na membrana das células de Sertoli, foram utilizadas sulfonilureias cujas quais agem na subunidade SUR do canal K^+_{ATP} sobre a resposta eletrofisiológica de isoproterenol na célula de Sertoli.

A tolbutamida (10 μ M), uma sulfonilureia de ação bloqueadora sobre o canal de K^+_{ATP} , quando aplicada topicamente, impediu a hiperpolarização característica causada pelo isoproterenol (2 μ M), causando despolarização do potencial de membrana. (Figura 11A e 11B).

A perfusão com tolbutamida (10 μ M) foi mais eficaz no bloqueio da resposta beta-adrenérgica do isoproterenol (2 μ M), causando despolarização do potencial de membrana da célula de Sertoli (Figura 12A e 12B).

A aplicação tópica de glibenclamida (10 μ M), a qual também é uma sulfonilureia de efeito inibidor sobre o canal de K^+_{ATP} , bloqueou a ação do isoproterenol (2 μ M), causando despolarização, demonstrando que a ação hiperpolarizante do isoproterenol está relacionada com a abertura desses canais (Figura 13A e 13B).

A inibição dos canais K^+_{ATP} com a utilização da sulfoniluréia glibenclamida, a qual atua na subunidade SUR dos canais K^+_{ATP} (BAUKROWITZ & FAKLER, 2000), atenuou a hiperpolarização evocada por isoproterenol, em células de Sertoli, evidenciando que este agonista β -adrenérgico poderia atuar através da abertura destes canais. Foi postulado por Nakashima e Vanhoutte (1995), em musculatura lisa vascular, da veia safena de cães, que a hiperpolarização produzida pelo isoproterenol ocorria através da

abertura de canais de K^+_{ATP} , onde também foi observado uma redução do efeito do isoproterenol com a aplicação da glibenclamida.

A fase de hiperpolarização produzida pelo FSH foi também bloqueada por tolbutamida (inibidor de canal de K^+_{ATP}) (Figura 14), indicando que a hiperpolarização possa estar envolvida com os canais de K^+_{ATP} .

A testosterona, provoca uma despolarização imediata da membrana da célula de Sertoli, por produzir o fechamento dos canais K^+_{ATP} , através da via PLC-PIP₂ (LOSS *et al*, 2004). A testosterona reduz a hiperpolarização produzida pelo isoproterenol (JACOBUS *et al*, 2005).

De acordo com Baukowitz & Fakler (2000) e revisão realizada por Wassermann e Loss (2004), a sensibilidade dos canais K^+_{ATP} ao nucleotídeo ATP não constitui um parâmetro fisiológico fixo, mas um parâmetro controlado por fosfatidil inositol fosfato (PIP), na membrana celular.

Apesar dos β 2-AR estimularem uma sinalização dual, que inclui Gs e Gi, no presente estudo, utilizamos a PTX, que bloqueia a subunidade Gi dos β 2-AR presentes nas células de Sertoli, para testar seu efeito sobre a ação eletrofisiológica do isoproterenol.

Nesse sentido, a toxina pertussis (PTX) quando foi aplicada topicamente e anteriormente à aplicação de isoproterenol não impediu a hiperpolarização característica causada por isoproterenol. Este dado confirma que a ação hiperpolarizante de isoproterenol independe de proteína Gi e que isoproterenol age através da via Gs-AC-AMPC-PKA (Figura 15A e 15B).

Estudo realizado no qual se fez uso de análise imuno-histoquímica em cortes isolados de células testiculares demonstrou a expressão de proteínas G. A proteína Gi, sensível à PTX, teve sua expressão em células de Sertoli mais acentuada em ratos mais jovens, mas tornou-se mais evidente no citoplasma de células germinativas com o aumento da idade dos ratos (LAMSAM-CASALOTTI *et al*, 1993). Este dado nos certifica da presença da proteína Gi nas células de Sertoli de ratos imaturos, que compreende a idade dos ratos utilizados neste estudo.

Em consonância com o resultado deste trabalho, referente ao efeito de PTX na ação do isoproterenol, resultados utilizando um poderoso ativador da proteína Gi, toxina *Pasteurella multocida* (PMT), mostraram que PMT diminui o acúmulo de AMPc estimulado por isoproterenol e forskolina, em fibroblastos embriônicos intactos de ratos, além de inibir a atividade da adenilato ciclase na membrana celular. Contudo, quando PMT foi testada juntamente com PTX, PMT bloqueou a ribosilação de ADP catalizada pela PTX, na proteína Gi, mecanismo esse que causa bloqueio na proteína Gi, e dessa forma, desencadeando um estado insensível à PTX (ORTH, 2008).

Xiao e colaboradores (2003) mostraram recentemente, com a utilização de cultura de cardiomiócitos de ratos, que a resposta contrátil (que envolve Ca^{2+}) a diversos agonistas β_2 -adrenérgicos, foi realçada quando os cardiomiócitos foram pré-tratados com PTX, e, portanto, com inativação da proteína Gi.

Ademais, neste estudo, PTX não afetou a captação de $^{45}Ca^{2+}$ estimulada por isoproterenol. Como PTX não bloqueou a ação estimulatória do

isoproterenol sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, podemos inferir, com esse dado, que a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo isoproterenol é independente da via de sinalização envolvendo proteína Gi.(Figura 16).

Justo que a o aumento no influxo de cálcio causado pelo isoproterenol não está envolvido com a proteína Gi, tornou-se necessário estudar a estimulação beta-adrenérgica do isoproterenol sobre a proteína Gs. Assim, fez-se uso da toxina colérica, que estimula proteína Gs; a qual, surpreendentemente, não estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli de ratos imaturos(Figura 9).

Conforme estudos realizados por Fritz e colaboradores (1978) e Conti e pesquisadores (1995), em que o envolvimento da via de AMPc estimulada por FSH foi avaliado, em cultura de células de Sertoli de ratos, utilizando-se dibutilil AMPc, um análogo estrutural do AMPc, toxina colérica, ativador da proteína Gs, e RO-20, inibidor da fosfodiesterase específica do AMPc, todos induziram à elevação dos níveis de AMPc intracelular.

Porém, evidências bioquímicas e biofísicas indicam que a sinalização de AMPc iniciada por $\beta 1$ -AR pode ser transmitida por toda a célula; entretanto, a sinalização de AMPc iniciada por $\beta 2$ -AR é confinada a subdomínios sarcolemais, envolvendo efetores que direcionam essa sinalização compartimentalizada (XIAO *et al*, 1999; XIAO, 2001).

Além disso, relativamente à expressão de proteínas G durante o desenvolvimento dos testículos de ratos, a subunidade estimulatória da proteína G (Gs), sensível à toxina colérica, foi detectada em ratos de 7 dias de idade, atingindo seu máximo aos 23 dias e, em seguida, diminui para valores

muito baixos ou indetectáveis em testículos de 45 dias e de ratos adultos (60 a 90 dias) (LAMSAM-CASALOTTI *et al*, 1993).

No entanto, resultados com PTX, sugerem que proteínas Gi de β 2-AR, sensíveis à PTX, inibem parcialmente a resposta contrátil, com aumento do influxo de Ca^{2+} , mediada por Gs, nos cardiomiócitos de ratos e camundongos (XIAO&LAKATTA,1995; XIAO *et al*, 1999).

De acordo com o que foi acima exposto acerca da sinalização intracelular do isoproterenol, parece haver algum efector que é ativado na sinalização intracelular do isoproterenol, na sequência ou simultaneamente à via β 2-AR/Gs/AC/AMPC/PKA de modo a estimular a captação de Ca^{2+} nas células de Sertoli de ratos imaturos.

Alguns autores sugerem que a sinalização beta-adrenérgica cardíaca é mediada, ao menos em parte, por uma interação direta entre Gs e canais de Ca^{2+} tipo L (YATANI *et al*, 1988; YATANI *et al*, 1989).

Estudos em cardiomiócitos de sapos também demonstram que a estimulação com isoproterenol tem efeito estimulatório sobre os canais dependentes de voltagem tipo L (JUREVICIUS & FISCHMEISTER, 1996).

Entretanto, em outros estudos, em cardiomiócitos de ratos, inibidores de PKA, não apenas bloquearam os efeitos da estimulação β 1-adrenérgica, mas também inibiram completamente os efeitos da estimulação de β 2-AR (KUSCHEL *et al*, 1999; XIAO *et al*, 2000; ZHOU *et al*, 1997; CHEN-IZU *et al*, 2000).

Resultados obtidos através do bloqueio de PKA corroboram a ideia de que o efeito da estimulação beta-adrenérgica do isoproterenol nos canais de cálcio cardíacos é mediada exclusivamente pela via AMPc-dependente. (HATZELL *et al*, 1991).

No entanto, quando utilizada a forskolina (resultado discutido anteriormente) (Figura18), em células de Sertoli de ratos imaturos, que provoca um aumento na atividade da adenilato ciclase, com conseqüente aumento de AMPc; não foi observado aumento do influxo de cálcio nessas células. Além disso, a aplicação da toxina colérica, que aumenta a atividade de Gs, estimulando a adenilato ciclase, também não altera a captação de cálcio. Estes resultados mostram que o efeito de aumento na captação de cálcio estimulado pelo isoproterenol não está vinculado apenas e exclusivamente à via dependente de AMPc.

A modulação do influxo de cálcio por β 2-AR requer a ativação de AMPc, mas essa estimulação β 2-AR/AC/AMPc/PKA parece estar localizada na superfície da membrana celular, nas vizinhanças dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L e não podendo ser transmitida a proteínas sarcolemas, no caso dos cardiomiócitos (XIAO, 2001).

Além disso, o inibidor da PKA, PKI, aboliu o influxo de cálcio estimulado por isoproterenol (HATZELL *et al*, 1991). Então, parece que a PKA está envolvida como um ponto crucial na ativação beta-adrenérgica dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L, em cardiomiócitos de ratos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O componente despolarizante da ação do FSH na membrana é bloqueado pela ação inibitória de PTX sobre Gi.
- O componente hiperpolarizante da ação do FSH na membrana é inibido pela ação de sulfonilureias, as quais são bloqueadores de canais de K⁺ATP.
- O aumento da atividade da adenilato ciclase pela ação da toxina colérica não estimulou a captação de ⁴⁵Ca²⁺ nessas células.
- O isoproterenol desencadeia uma hiperpolarização sobre o potencial de membrana da célula de Sertoli.
- A tolbutamida e a glibenclamida, sulfoniluréias antagonistas dos canais K⁺_{ATP}, provocam despolarização na membrana das células de Sertoli. Após aplicação tópica destas sulfonilureias, seguida de aplicação de Isoproterenol, a ação hiperpolarizante do Isoproterenol foi inibida.
- Quando as células de Sertoli foram perfundidas previamente com tolbutamida, a ação hiperpolarizante do isoproterenol foi inibida. Demonstrando que a ativação do receptor β-adrenérgico por isoproterenol envolve a abertura de canais K⁺_{ATP} em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos.
- O isoproterenol aumenta a captação de ⁴⁵Ca²⁺.
- Esta captação não foi inibida na presença de PTX, parecendo não envolver a via de sinalização da proteína Gi neste efeito.

- PTX quando aplicada topicamente e anteriormente à aplicação de isoproterenol não impediu a hiperpolarização característica causada por isoproterenol.
- A ação hiperpolarizante de isoproterenol independe de proteína Gi
- PTX não impede a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo isoproterenol.
- O aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado pelo isoproterenol nas células de Sertoli não ocorre através da via de estimulação da proteína Gs.
- Uma vez que a via adrenérgica constitui uma via complementar à ação do FSH na função das células de Sertoli, o estudo da ação do isoproterenol pode ser considerado relevante.

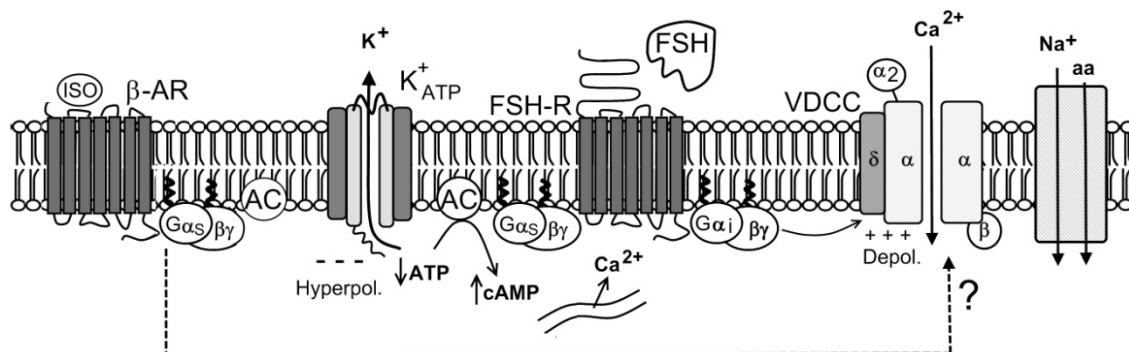


Figura 20. Esquema hipotético da ação do FSH e do isoproterenol na membrana das células de Sertoli. FSH produz primeiro uma hiperpolarização, relacionada com a abertura de canais de K^+_{ATP} envolvendo a via Gs/AC/cAMP, assim como o isoproterenol ao se ligar ao seu receptor β -AR. A despolarização está relacionada com a ativação da via Gi; VDCC: canal de cálcio dependente de voltagem; AC: adenilato ciclase; ISO: isoproterenol; aa: aminoácido; FSH -R: receptor do FSH; β -AR: receptor adrenérgico; K^+_{ATP} : canal de potássio sensível ao ATP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-ISSA, H, REICHERT, JR LE. Properties of the follitropin-receptor interaction: characterization of the interaction of follitropin with receptors in purified membranes isolated from mature rat testes tubules. **Journal of Biology and Chemistry**; 1976; 251:3326-3337.
2. AMANN RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans:A Need to Revisit? **Journal of Andrology**, 2008; 29 (5); 469–487.
3. AMSTERDAM A, HANOCH T, DANTES A, TAJIMA K, STRAUSS JF, SEGER R. Mechanisms of gonadotropin desensitization.**Molecular and Cellular Endocrinology**. 2002;22;187(1-2):69-74.
4. APPLEBURY ML AND HARGRAVE PA Molecular biology of the visual pigments. **Vision Research**. b198626:1881–1895.
5. AREY BJ, STEVIS PE, DEECHER DC, SHEN ES, FRAIL DE, NEGRO-VILAR A, LOPEZ FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms.**Molecular Endocrinology**. 11(5):517-26.
6. BABU, P.S., DANILOVICH, N., SAIRAM, M.R. Hormone-induced receptor gene splicing: enhanced expression of the growth factor type I follicle-stimulating hormone receptor motif in the developing mouse ovary as a new paradigm in growth regulation. **Endocrinology**. 2001. 142:381-389.

7. BABU, P.S., KRISHNAMURTHY, H., CHEDRESE, P.J., SAIRAM, M.R.
Activation of extracellular-regulated kinase pathways in ovarian granulosa cells by the novel growth factor type-1 follicle-stimulating hormone receptor. Role in hormone signaling and cell proliferation. **Journal of Biology and Chemistry**. 2000. 275:27615-27626.
8. BAKER, P.J., SHA, J.A., MCBRIDE, M.W., PENG, L., PAYNE, A.H., O'SHAUGHNESSY, P.J. (1999) Expression of 3-hydroxysteroid dehydrogenase type I and VI isoforms in the mouse testis during development. **European Journal of Biochemistry**. 260:911–916.
9. BORSOTTO, M., BARHANIN, J., FOSSET, M., LAZDUNSKI, M. : The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca²⁺ channel. Purification and subunit composition. **Journal of Biology and Chemistry**. 1985. 260, 14255-14263.
10. BRUCATO, S., BOCQUET, J., VILLERS, C. Regulation of glypican-1, syndecan-1 and syndecan-4 mRNAs expression by follicle-stimulating hormone, cAMP increase and calcium influx during rat Sertoli cell development. **European Journal of Biochemistry**. 2002. 269 (14): 3461-3469.
11. CATTERALL, W.A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T.P., STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacology Reviews**. 2005. 57 (4):411-25.
12. CHAKIR, K., ZHU, W., TSANG, S., WOO, A.Y., YANG, D., WANG, X., ZENG, X., RHEE, M.H., MENDE, U., KOITABASHI, N., TAKIMOTO, E., BLUMER, K.J., LAKATTA, E.G., KASS, D.A., XIAO, R.P. RGS2 is a

- primary terminator of $\beta(2)$ -adrenergic receptor-mediated G(i) signaling.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology.2011
13. CHENG, Y.E., MRUK, D.D. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development **Physiology Reviews**. 2002. 82;825-874.
14. CHEN-IZU, Y., XIAO, R.P., IZU, L.T., CHENG, H., KUSCHEL, M., SPURGEON, H., LAKATTA, E.G. Gi-dependent localization of β 2-adrenergic receptor signaling to L-type Ca^{2+} channels. **Biophysical Journal**. 2000. 79: 2547-2556.
15. CHOI, S., YEUM, C.H., CHANG, I. Y., YOU, H.J., PARK, J. S., JEONG, H. S., SO, I., KIM, K. W., JUN, J. Y. Activating of ATP-dependent K⁺ channels comprised of Kir 6.2 and SUR 2B by PGE₂ through EP₂ receptor in cultured interstitial cells of Cajal from murine small intestine. **Cellular Physiology and Biochemistry**. 2006; 18: 187-198.
16. CONTI, M., NEMOZ, G., SETTE, C., VICINI, E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocrine Reviews**. 1995, 16 (3): 370-389.
17. CREPIEUX, P., MARION, S., MARTINAT, N., FAFEUR, V., VERN, Y.L., KERBOEUF, D., GUILLOU, F., REITER, E. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. **Oncogene**. 2001. 20(34):4696-4709.
18. CYR DG, HERMO L, EGENBERGER N, MERTINEIT C, TRASLER JM, LAIRD DW. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. **Endocrinology**. 1999. 140;3815-3825.

19. DA CRUZ CURTE A, WASSERMANN GF. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. **Journal of Endocrinology**. 1985. 106(3); 291-4.
20. DAHL KD, STONE MP. FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. **Journal of Andrology**. 1992. 13(1):11-22.
21. DE KRETZER DM, BUZZARD JJ, OKUMA Y, O'CONNOR AE, HAYASHI T, LIN SY, MORRISON JR, LOVELAND KL, HEDGER MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2004.
22. DYM M & FAWCETT DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. **Biol Reproduction**. 1970. 3; 308-326.
23. DYM M, RAJ HG. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. **Biol Reproduction**. 1977. 17 (5):676-96.
24. ESCRIBÁ PV, WEDEGAERTNER PB, GOÑI FM, VÖGLER O. Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2007. 1768 (4):836-52.
25. FARES F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. **Biochimica et Biophysica Acta** 2006; 1760(4):560-567.

26. FORD CE, SKIBA NP, BAE H, DAAKA Y, REUVENY E, SHEKTER LR, ROSAL R, WENG G, YANG CS, IYENGAR R, MILLER RJ, JAN LY, LEFKOWITZ RJ, HAMM HE. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. **Science**.1998. 280; 1271-1274.
27. FOX KM, DIAS JA, VAN ROEY P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. **Molecular Endocrinology**. 2001.15 (3):378-89.
28. FRITZ, I. B., GRISWOLD, M. D., LOUIS, B. G., DORRINGTON, J. H. Metabolic responses of Sertoli cells in culture to various concentrations of follicle-stimulating hormone and cholera toxin. **Canadian Journal of Biochemistry**. 1978, 56 (9): 875-879.
29. GAYTAN F, BELLIDO C, MORALES C, REYMUNDO C, AGUILAR E, VAN ROOIJEN N. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethane dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. **Journal of Andrology**. 1994.15 558-564.
30. GNESSI, L., FABBRI, A., SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: An Integrated System. **Endocrinology Reviews**. 1997. 18 (4):541-609.
31. GORCZYNSKA E, HANDELSMAN DJ. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. **Journal of Biology and Chemistry**. 1991. 15; 266 (35):23739-44.

32. GORCZYNSKA, E. & HANDELSMAN, D.J. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. **Journal of Biological Chemistry**. 1991. **266**, 23739–23744.
33. GORCZYNSKA, E., HANDELSMAN D.J. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. **Journal of Biological Chemistry**. 1991, 266. 23739-23744.
34. GRASSO P., REICHERT, L. E. Follicle-stimulating hormone receptor mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and culture rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage independent calcium channels. **Endocrinology** 1989; 125: 3029-3026.
35. GRASSO, P. & REICHERT JR, L.E. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. **Endocrinology**. 1989. 125, 3029–3036.
36. GRASSO, P., REICHERT, L.E. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by cultured rat Sertoli cells does not required activation of cholera toxin- or pertussis toxin-sensitive guanosine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. **Endocrinology** 1990. 127: 949-956.
37. GRASSO, P., REICHERT, L.E. JR Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. **Endocrinology**. 1989, 125 3029-3036.

38. GRISWOLD, M.D. Protein secretion by Sertoli cells: general considerations. In **The Sertoli Cell**. 1993. Russell LD, Griswold MD, (eds). pp 195-200.
39. GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in: spermatogenesis seminars In **Cell & Developmental Biology**. 1998. Vol 9,: Pp 411-416.
40. HATZELL, H.C., MERY, P.F., FISCHMEISTER, R., SZABO, G., Sympathetic regulation cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. **Nature**. 1991. 351: 573-576.
41. HOFMANN F., LACINOVÁ L., KLUGBAUER N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**. 1999; 139, 33-87.
42. HUCKINS C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. **Cell Tissue Kinet**. 1971. 4(4):335-49. IRUSTA O, WASSERMANN GF. Factors influencing the uptake of (alpha-14C)aminoisobutyric acid by rat testes. **Journal of Endocrinology**.. 1974. 60(3);463-71.
43. JACOBUS, A. P., LOSS, E.S., WASSERMANN, G.F. Pertussis toxin nullifies the depolarisation of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10-to-12 day-old-rat Sertoli cells. 2010.
44. JEGOU, B The Sertoli cell. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**. 1992. 6:273-311.

45. JIANG X, DREANO M, BUCKLER DR, CHENG S, YTHIER A, WU H, HENDRICKSON WA, EL TAYARN. Structural predictions for the ligandbinding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. **Structure**. 1995. 3;1341-1353.
46. JOFFRE, M., ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. **The Journal of Physiology**. 1988, 400: 481-499.
47. JUREVICIUS, J., FISCHMEISTER, R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca channels by β -adrenergic agonists. **Proc Natl Academy of Science**. 1996. 93: 295-299.
48. KLARLUND, J.K., GUILHERME, A., HOLIK, J.J., VIRBASCIUS, J.V., CHAWLA, A., CZECH, M.P., Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. **Science**. 1997. 275, 1927–1930.
49. KOPERA, I. A., BILINSKA, B., CHENG, C.Y., MRUK, D.D. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, **Biological Sciences**. 2010. 365(1546):1593-605. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data.
50. KOPERA, I.A., SU, L., BILINSKA, B., CHENG, C.Y., MRUK, D.D. An in vivo study on adjunin and blood-testis barrier dynamics. **Endocrinology**. 2009. 150(10) 4724-4733
51. KUSCHEL, M., ZHOU Y.Y., SPURGEON, H.A., BARTEL, S., KARCZEWSKI, P.Z.S., KRAUSE, E.G., LAKATTA, E.G., XIAO, R.P. β -adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation on

- cytoplasmatic proteins in canine heart. **Circulation**. 1999. 99: 2458-2465.
52. LAMSAM-CASALOTTI, S., ONODA, M., PAPADOPOULOS, V., DYM, M. Development expression of GTP-binding proteins in rat testes. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1993, 99, 487-495.
53. LAPTHORN, A.J., HARRIS, D.C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J.W., CANFIELD, R.E., MACHIN, K.J., MORGAN, F.J. ISAACS, N.W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature** 1994; 369:455–61.
54. LINDSEY JS, WILKINSON MF. *Pem*: a testosterone-regulated and LHregulated homeobox gene expressed in mouse sertoli cells and epididymis. **Dev Biol**. 1996. 179;471-48.
55. LOSS ES, JACOBSEN M, COSTA ZS, JACOBUS AP, BORELLI F, WASSERMANN GF. Testosterone modulates K⁽⁺⁾ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. **Hormone and Metabolic Research**. 2004. 36(8):519-25.
56. LOSS ES, JACOBUS AP, WASSERMANN GF. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. **Hormone and Metabolic Research**. 2007. 39(11):806-12.
57. LOSS, E.S., JACOBUS, A.P., WASSERMANN, G.F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Hormone and Metabolic Research**. 2007, 39(11):806-812.
58. MAYERHOFER A, FRUNGIERI MB, FRITZ S, BULLING A, JESSBERGER B, VOGT HJ. Evidence for catecholaminergic, neuronlike

- cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. **Journal of Andrology**. 1999. 20(3):341-7.
59. MAYERHOFER, A., AMADOR, A. G., STEGER, R. W., BARTKE, A. Testicular function after local injection of 6-hydroxydopamine or norepinephrine in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Andrology**. 1990. Vol 11, Issue 3 301-311.
60. MAYERHOFER, A., BARTKE, A., STEGER, R. W. Catecholamine effects on testicular testosterone production in the gonadally active and the gonadally regressed adult golden hamster. **Biology Reproduction**, 1989,40, 752-76
61. MEANS, A.R., DEDMAN, JR., TASH, J.S., TINDALL, D.J., SICKLE, M., WELSH, M.J. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. **Annual Review of Physiology**. 1980,42,59-70.
62. MICHAEL, S.D., KAPLAN, S.B., MACMILLAN, B.T. Peripheral plasma concentrations of LH, FSH, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice. **Journal Reproduction and Fertility**. 1980. 59:217-222.
63. MOYLE, W.R., CAMPBELL, R.K., RAO, S.N., AYAD, N.G., BERNARD, M.P., HAN, Y., WANG, Y. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. **Journal Biology and Chemistry**. 1995. 270; 20020-20031.
64. MRUK DD, CHENG CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous

- epithelium during spermatogenesis. **Endocrinology Reviews**. 2004. 25(5):747-806.
65. MRUK, D.D., CHENG, C.Y. **Tight junctions in the testis: new perspectives**. *Philosophical Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010. 365(1546):1621-35.
66. MRUK, D.D., SU, L., CHENG, C.Y. Emerging role of drug transporters at the blood-testis barrier. **Trends in Pharmacological Sciences**. 2011, 32(2): 99-106.
67. NAKASHIMA, M, VANHOUTTE, PM. Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**. 1995. 272; 379-384.
68. NEF S, SHIPMAN T, PARADA LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. **Dev Biol**. 2000. 224;354-361.
69. ORTH, J. H. C., FESTER, I., PREUSS, I., AGNOLETTO, L., WILSON, B. A., AKTORIES, K. Activation of Gai and subsequent uncoupling of receptor-Gai signaling by *Pasteurella multocida* Toxin. **The Journal of Biological Chemistry**. 2008. 283, NO. 34, pp. 23288–23294. DOI 10.1074/jbc.M803435200.
70. PHIFER, R.F., MIDGLEY, A.R., SPICER, S.S. Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 1973; 36:125–141.

71. PRINCE, F.P. Ultrastructural evidence of adrenergic, as well as cholinergic, nerve varicosities in relation to the lamina propria of the seminiferous tubules during childhood. **Tissue Cell**. 1996;28: 507-513.
72. QUIGNARD JF, MIRONNEAU J, CARRICABURU V, FOURNIER B, BABICH A, NURNBERG B, MIRONNEAU C, MACREZ N. Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. **Journal of Biology and Chemistry**. 2001; 276(35):32545-51.
73. ROCHE, A., JOFFRE, M. Effect of uncoupling treatment on FSH-induced hyperpolarization of immature rat Sertoli cells from Sertoli cell enriched cultures. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1989; 85(2): 343-354.
74. SCHULTE, G., LEVY, F.O. Novel aspects of G-protein-coupled receptor signaling- different ways to achieve specificity. **Acta Physiology**. 2007, 190:33-38.
75. SETCHELL BP, MADDOCKS S, BROOKS DE. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (Eds.), **The Physiology of Reproduction**. 2nded. Raven Press, New York, 1994; 1063-1175.
76. SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. **The Physiology of Reproduction**. 1994. 1363–1434.
77. SILVA, F.R.M.B., LEITE, L.D., WASSERMANN, G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**. 2002 ; 147 : 425 – 433

78. SU, L., MRUK, D.D., CHENG, C.Y. Drug transporters, the blood-testis barrier and spermatogenesis. **Journal of Endocrinology**. 2010, 208 (3): 207-223.
79. TACCHI, HÉCTOR H. Receptores beta adrenérgicos e insuficiencia cardíaca. **Insuficiencia cardíaca** versión On-line ISSN 1852-3862. 2008. v.3 n.2
80. TROISPOUX C, REITER E, COMBARNOUS Y, GUILLOU F. (1998) β_2 adrenergic receptors mediate cAMP, tissue-type plasminogen activator and transferrin production in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**; 142: 75-86.
81. WALKER, W.H., CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**. 2005, 130 (1): 15-28.
82. WASSERMANN, G.F., LOSS, E.S. Effect of calcium channel blocker, verapamil, on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes. **Medical Science Research**. 1989;17: 779-80.
83. WASSERMANN, G.F., LUDWIG, M.S., BARRETO, K.P. β -adrenergic stimulation of amino acid transport in Sertoli cell-enriched testes of rats independent of its action on protein synthesis. **Medical Science Research**. 1996. 24: 149-151.
84. WASSERMANN, G.F., MONTI BLOCH, L, MACCONNELL, L.L. , GRILLO, M.L. FSH-induced rapid hyperpolarization followed by a Ca^{2+} - channel mediated depolarization in rat Sertoli cell. **Medical Science Research**. 1990. 18:175 – 176.
85. WASSERMANN, G.F., MONTI BLOCH, L., GRILLO, M.L., SILVA, F.R.M.B., LOSS, E.S., MACCONNELL, L.L. Electrophysiological

- changes of Sertoli cells produced by acute administration of amino acid and FSH . **Hormone Metabolic Research**. 1992. 24 : 326 – 328
86. WEIZHONG, Z., XIAOKUN, Z., MING, Z., XIAO, R-U. The enigma of β 2-adrenergic receptor Gi signaling in the heart: The good, the bad, and the ugly. **Circulation Research**. 2005, 97: 507-509.
87. WELSH, M., SHARPE, R. M., MOFFAT, L., ATANASSOVA, N., SAUNDERS, P. T. K., KILTER, S., BERGH, A., SMITH, L. B. Androgen Action via Testicular Arteriole Smooth Muscle Cells is Important for Leydig Cell Function, Vasomotion and Testicular Fluid Dynamics. **PLoS One**. 2010; 5(10): e13632.
88. WEST., D. C., SATTAR, A., KUMAR, S. A simplified *in situ* solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. **Analytical Biochemistry**. 1985, 147 (2): 289-295.
89. XIAO, R.P. (2000) Cell logic for a dual coupling of a single class of receptors to Gs and Gi proteins. **Circulation Research**. 87, p 635-637.
90. XIAO, R.P., AVDONIN, P., ZHOU, Y.Y., CHENG, H., AKHTER, S.A., ESCHENHAGEN, T., LEFKOWITZ, R.J., KOCH, W.J., LAKATTA, E.G. Coupling of β 2-adrenoceptor to Gi protein and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. **Circulation Research**. 1999. 84: 43-52.
91. XIAO, R.P., CHENG, H., ZHOU, Y.Y., KUSCHEL, M., LAKATTA, E.G. Recent advances in cardiac β -adrenergic receptor subtype signal transduction. **Circulation Research**. 1999. 85: 1092-1100.

92. XIAO, R.P., JI, X., LAKATTA, E.G., Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Molecular Pharmacology**. 1995. 47: 322-329.
93. XIAO, R.P., LAKATTA, E. G., β_1 -adrenoceptor stimulation and β_2 -adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca^{2+} , and Ca^{2+} current in single rat ventricular cells. **Circulation Research**. 1993. 73, 286-300.
94. XIAO, R.-P., ZHANG, S.-J., CHAKIR, K., AVDONIN, P., ZHU, W., BOND, R.A., BALKE, C.W., LAKATTA, E.G. & CHENG, H. Enhanced G_i signaling selectively negates β_2 -adrenergic receptor (AR) – but not β_1 -AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. **Circulation**. 2003. 108, 1633–1639.
95. YATANI, A., BROWN, A.M. Rapid beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. **Science**. 1989. 245: 71-74.
96. YATANI, A., IMOTO, Y., CODINA, J., HAMILTON, S.L., BROWN, A.M., BIRNBAUMER, L. T The stimulatory G protein of adenyl cyclase, G_s , also stimulates dihydropyridine-sensitive- Ca^{2+} channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist. **Journal of Biology and Chemistry**. 1988. 263:9887-9895.
97. ZHOU, M., HE, H.J., TANAKA, O., SEKIGUCHI, M., KAWAHARA, K., ABE, H. Different Localization of ATP Sensitive $K(+) Channel$ Subunits in Rat Testis.

98. ZHOU, Y.Y., CHENG, H., BOGDANOV, K.Y., HOHL, C., ALTSCHULD, R., LAKATTA, E.G., XIAO, R.P. Localized cAMP-dependent signaling mediates β 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. **American Journal of Physiology**. 1997. 273: H1611-H1618.
99. ZONA, C., FARINI, I.D., PALMA, E., EUSEBI, F. Modulation of voltage-activated channels by calcitonin gene-related peptide in cultured rat neurones. **Journal of Physiology**. 1991; 433:631- 643.