

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Ação da testosterona sobre o potencial de
membrana das células de Sertoli.
Envolvimento da via PLC-PIP₂ sobre os
canais de K⁺_{ATP}.**

Zaquer Suzana Munhoz Costa

**Orientador
Prof^a. Dr^a. Eloísa da Silveira Loss**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, (RS), Junho de 2004

*Aos meus filhos
Fani e Egon, para os quais procuro ser.
Por todo o carinho e compreensão.
Eu amo vocês.*

*Agradecimento especial,
a minha orientadora, professora Eloísa,
Pela acolhida, incentivo e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À colega Ana Paula, pela colaboração, amizade, companheirismo, incentivo e enorme paciência, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Wassermann com quem muito aprendi durante esta jornada.

Aos colegas e do Laboratório, Marcelo, Adriana, Débora e Paola pela amizade e pelo apoio.

À técnica Elsa Pires pela atenção e carinho oferecido.

Aos mais próximos (parentes e amigos), por terem compreendido e respeitado o meu afastamento do convívio deles .

Ao curso de Fisiologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: **CNPq**, CAPES e FAPERGS.

SUMÁRIO

I. 1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	1
I. 1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	1
I. 1.1.2. REGULAÇÃO FUNCIONAL DO TESTÍCULO.....	5
I. 1.1.2.1. EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO.....	5
I. 1.2. TESTOSTERONA.....	7
I. 1.2.1. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELO LH.....	8
I. 1.2.2. DISTRIBUIÇÃO DOS ANDRÓGENOS NO TESTÍCULO.....	11
I. 1.2.3. FUNÇÕES GONADAIS DOS ANDRÓGENOS.....	12
I. 1.2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA.....	13
I. 2. EFEITOS NÃO GENÔMICOS DE ESTERÓIDES	14
I.3. AÇÃO DA TESTOSTERONA SOBRE A MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI.....	17
I. 4.CANAIS IÔNICOS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR.....	20
I. 5. CANAIS DE CÁLCIO.....	22
I. 5.1. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM.....	23
I. 6. CANAIS DE POTÁSSIO.....	24
I.6.1.CANAIS DE POTÁSSIO RETIFICADORES DE INFLUXO (K_{IR}).....	27
I. 6.2. CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP}).....	29
1.7 FOSFOLÍPIDIOS DE MEMBRANA.....	35
I. 8. PRINCÍPIOS GERAIS SOBRE REGISTROS INTRACELULARES.....	40

II. OBJETIVOS	43
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
III. 1. MATERIAIS.....	45
III. 1.1. ANIMAIS.....	45
III. 1.2 SOLUÇÕES.....	45
III. 1.2.1 TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRb).....	45
III. 1.3. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	47
III. 2. MÉTODOS.....	47
III. 2.1. ELETROFISIOLOGIA.....	47
III. 2.1.1. PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	47
III. 2.1.2. PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO.....	49
III. 2.1.3. EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO.....	50
III. 2.1.4. CÁLCULO DA INTENSIDADE DO PULSO APLICADO.....	52
III. 2.1.5. CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA.....	53
III. 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
IV. RESULTADOS.....	55
IV. 1. PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS BASAIS DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	56
IV. 2. EFEITO DO KRb E DO ENANOL NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	57

IV. 3 EFEITO DA TESTOSTERONA-BSA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULO DE RATOS IMATUROS.....	58
IV.4. EFEITO COMPARATIVO DA APLICAÇÃO DE GLIBEMCLAMIDA, TULBUTAMIDA E TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO R DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA NOS TUBILOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	59
IV. 5. EFEITO DA ESPERMINA NO POTENCIAL DE REPOUSO E NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DA CÉLULA DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	60
IV. 6. EFEITO DO EGTA NO POTENCIAL DE REPOUSO E NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	61
IV.7. EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA SOBRE A HIPERPOLARIZAÇÃO PRODUZIDA PELO EGTA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	62
IV. 8. EFEITO DO U73122 NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	63
V. DISCUSSÃO.....	65
VI. CONCLUSÕES.....	79
VII. BIBLIOGRAFIA	83
VIII. ARTIGO PUBLICADO	102

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Diagrama esquemático mostrando os componentes do sistema reprodutor masculino humano.....	1
Figura I.2.	Biologia celular do testículo.....	3
Figura I.3.	Representação artística do testículo de rato e humano.....	4
Figura I.4.	Desenho esquemático da síntese de hormônios esteróides à partir do colesterol.....	10
Figura I.5.	Mecanismo de ação genômica de andrógenos numa célula alvo.....	14
Figura I.6.	Síntese e liberação pulsátil da testosterona no ambiente testicular.....	18
Figura I.7.	Efeito da aplicação tópica sobre o potencial de membrana de Células de Sertoli de rato de 17 dia e o efeito de diferentes doses de testosterona no potencial de repouso da células de Sertoli.....	19
Figura I.8.	Comportamento da resistência da membrana em diferentes doses de testosterona.....	20
Figura I.9.	Árvore foligenética da família de canais de potássio retificadores de influxo (K_{ir}).....	28

Figura I.10.	Canais de K^+_{ATP} regulados por nucleotídeos.....	31
Figura I.11.	Fórmula molecular da Glibenclamida.....	33
Figura I.12.	Fórmula molecular da Diazoxida.....	33
Figura I.13.	Fórmula molecular da Tolbutamida.....	33
Figura I.14.	Metabolismo dos fosfatidilinositol nas membranas celulares.....	38
Figura I.15.	Efeito dos fosfolipídios nos canais de K^+_{ATP}	39
Figura III.1.	Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo	48
Figura IV-1	Registro eletrofisiológico de uma célula de Sertoli de túbulos seminíferos de testículos de rato imaturo.....	56
Figura IV-2	Efeito do KRb no potencial de repouso de células de Sertoli de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	57
Figura IV-3	Efeito da Testosterona-BSA no potencial de repouso de células de Sertoli de túbulos seminíferos de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	58
Figura IV-4	Efeito comparativo da aplicação de glibenclamida, tolbutamida e testosterona no potencial de repouso e da resistência nos túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	59
Figura IV-5	Efeito da espermina no potencial de repouso e na resistência da membrana de células de Sertoli de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	60

Figura IV-6	Efeito do EGTA no potencial de repouso e na resistência da membrana de células de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	61
Figura IV-7	Efeito da aplicação de diferentes concentrações de testosterona sobre a hiperpolarização produzida pelo EGTA no potencial de repouso de células de Sertoli de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos.....	62
Figura IV-8	Efeito do U73122 na ação da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli de túbulos seminíferos de testículos de ratos imaturos	63
Figura V.1.	Mecanismo da regulação dos canais de K ⁺ ATP nas células β do pâncreas.....	72
Figura V.2	Modelo esquemático da arquitetura molecular dos canais de K ⁺ _{ATP}	74
Figura V.3	Efeito da ação da diazoxida no potencial de células de Sertoli.....	74
Figura VI.1	Representação esquemática da ação da testosterona na membrana de células de Sertoli.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela III-1.	Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.....	46
Tabela IV-1.	Potencial de repouso (E_m) e resistência elétrica (R) das células de Sertoli.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

μCi	micro Curie
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
A	ampère
Ca^{2+}	Íons cálcio
cAMP	AMP cíclico
CCDV	canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucléico
Em	potencial de repouso
EP	erro padrão
FAK	Quinase de adesão focal
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GPCRs	Receptores acoplado a proteína-G
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
Hz	Hertz
I	corrente
IP_3	inositol trifosfato
K^+_{ATP}	canal de potássio sensível ao ATP
K_{ir}	Canais de potássio de retificação interna
KRb	Krebs Ringer bicarbonato
L	litros
LaCl_3	Cloreto de Lantânio
LH	hormônio luteinizante
LNCaP	Células de câncer da próstata humana
M	molar

MΩ	mega ohms
mCi	mili Curie
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
ms	milisegundo
mV	milivolt
nA	nanoampère
nm	nanometro
PLC	Fosfolipase C
PKC	proteína quinase C
PIP ₃	3-4-5t-rofosfato de fosfatidilinositol
PIP ₂	4.5-difosfato de fosfatidilinositol
PIP	4-fosfato de fosfatidilinositol
PI	Fosfatidilinositol
PSA	Antígeno específico prostático
SUR	Receptores de sulfuniluréias
R	resistência elétrica
RA	receptor nuclear de andrógenos
SCE	enriquecido em células de Sertoli
seg	segundo
T-BSA	Testosterona conjugada ligada à albumina serica bovina
TM	relação tecido/meio
U73122	inibidor da PLC
ΔV	diferença de potencial

I. INTRODUÇÃO

I.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

I. 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, cada qual com seu sistema de ductos (ductos eferentes, epidídimo, canal deferente e ducto ejaculador), pelas glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) e pelo pênis (Fig I.1).

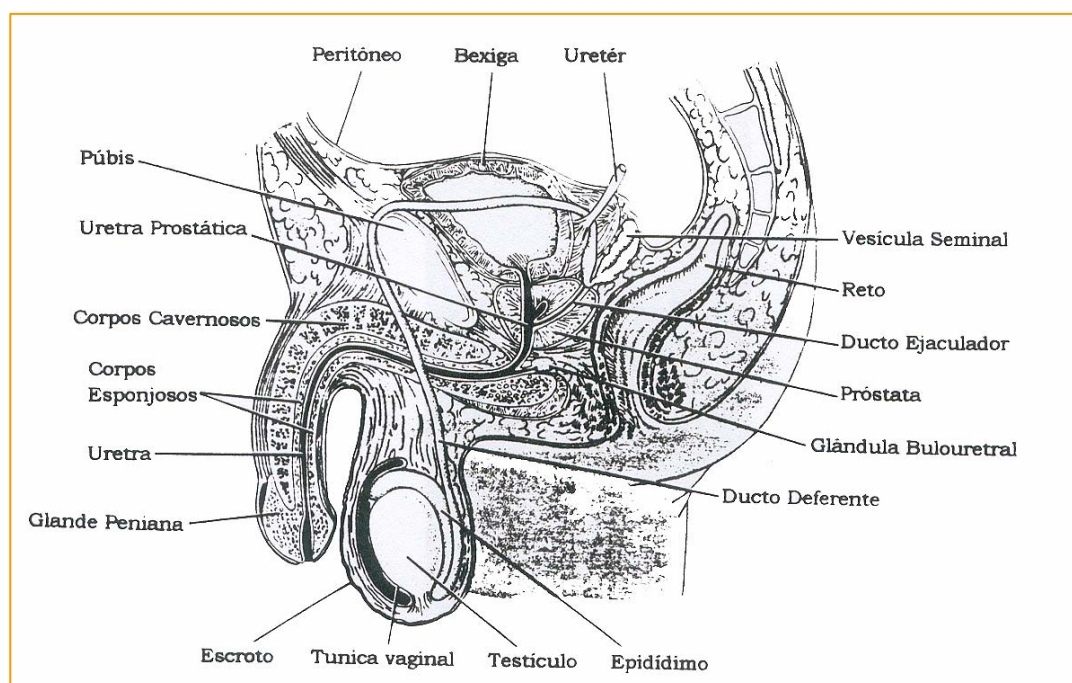


FIGURA I.1 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO OS COMPONENTES DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO HUMANO (ROSS *ET AL.*, 1995)

Durante o início do desenvolvimento embrionário em mamíferos, não há sexo fenotípico aparente. Embriões machos e fêmeas têm um conjunto duplo de dutos genitais rudimentares, e gônadas indiferenciadas que podem desenvolver-se em testículos ou ovários. A formação dos testículos inicialmente não é dependente de gonadotrofinas ou hormônios esteróides, e sim das atividades de células pré-Sertoli (que pode incluir a secreção de um fator que ativa a diferenciação das células de Leydig e de células mióides peritubulares (McCoshen., 1982; Merchant., 1975; Mintz e Russell., 1955). No entanto na série de eventos que se seguem à determinação e diferenciação de testículos, a testosterona produzida pelas células de Leydig e o hormônio anti-Mülleriano produzido pelas células de Sertoli são de importância crítica no desenvolvimento das características masculinas primárias (e mais tarde secundárias), incluindo o papel proeminente da testosterona na iniciação da espermatogênese na puberdade e manutenção da espermatogênese no adulto.

Os testículos são órgãos pareados, ovóides, encapsulados por uma forte membrana fibrosa chamada túnica albugínea. Desenvolvem-se dentro da cavidade abdominal e, no homem, migram um pouco antes do nascimento do seu local de origem para o escroto. O mesenquima testicular pode ser grosseiramente dividido em dois principais compartimentos: o espaço intersticial e os túbulos seminíferos. O espaço intersticial contém células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e fluido linfático. A parede externa dos túbulos seminíferos é formada por células mióides peritubulares e células endoteliais. A lâmina basal (ou membrana basal) cobre a parede externa do túbulo. Sobre a membrana basal situam-se as células germinais tronco (espermatogônia) e as células de Sertoli. Extensões

citoplasmáticas das células de Sertoli formam uma matriz estrutural altamente organizada dentro da qual a espermatogônia se desenvolve em espermatozóide maduro (Sertoli., 1865) (Fig. I.2).

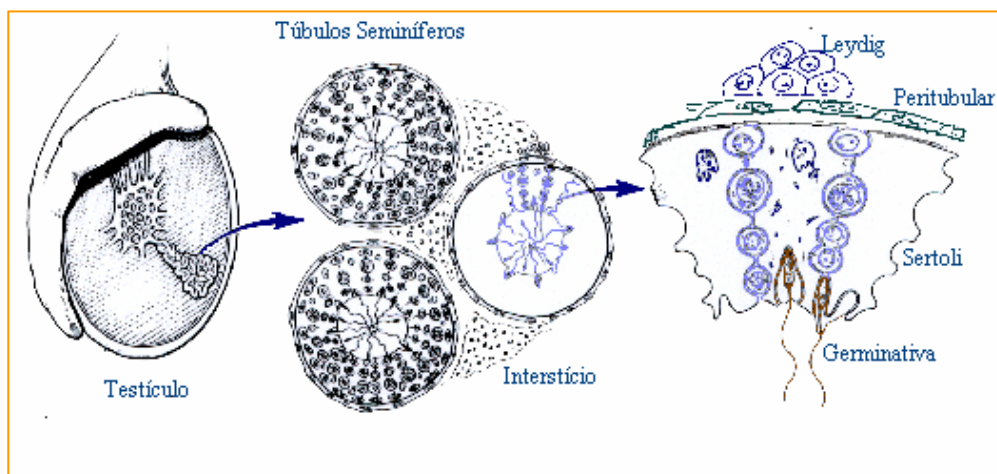


FIGURA I.2 BIOLOGIA CELULAR DO TESTÍCULO. (SKINNER, 1991)

Células de Sertoli não apenas provêm suporte estrutural, mas têm também um importante papel no suporte de processos bioquímicos das células germinativas (Russel., 1993). O instrumento para esse suporte é a barreira “hemato-testicular” ou “barreira de células de Sertoli” formada por complexos de junções ocludentes entre células de Sertoli adjacentes (Russel e Peterson., 1985; Dym e Fawcett., 1970). Essa barreira, impermeável às moléculas hidrofílicas maiores, divide o túbulo em um compartimento basal e um adluminal.

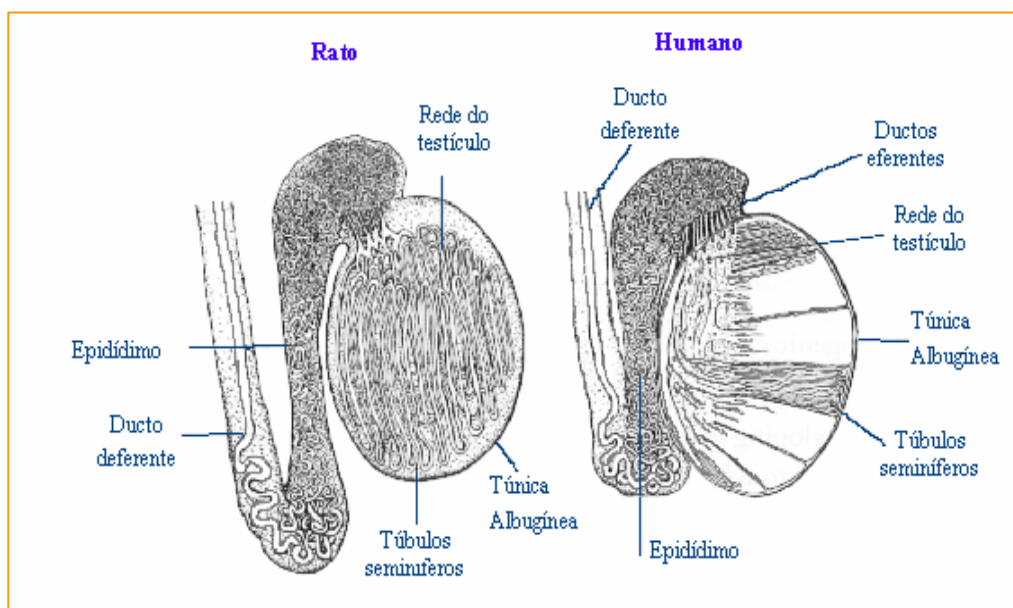


FIGURA I.3 REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DO TESTÍCULO DE RATO E HUMANO. O TESTÍCULO DE AMBOS, RATO E HUMANO, CONSISTE DE UMA TÚNICA ALBUGÍNEA FIBROSA, QUE ENCAPSULA OS TÚBULOS SEMINÍFEROS. O TESTÍCULO HUMANO É DIVIDIDO EM LÓBULOS, POR NUMEROSAS PARTIÇÕES FIBROSAS DENTRO DO TESTÍCULO. ESTAS PARTIÇÕES ESTÃO AUSENTES NO TESTÍCULO DE RATO. O QUE TORNA ESTE TESTÍCULO ADEQUADO PARA O USO DA TÉCNICA QUE SERÁ DESCRITA MAIS ADIANTE. OS TÚBULOS SEMINÍFEROS UNEM-SE DENTRO DA REDE TESTIS, DE ONDE O FLUÍDO SEMINÍFERO E OS ESPERMATOZÓIDES SÃO TRANSPORTADOS PARA DENTRO DO EPIDÍDIMO ATRAVÉS DE VÁRIOS DUCTOS EFERENTES. NO RATO, OS DUCTOS EFERENTES RAPIDAMENTE SE UNEM NUM TÚBULO ÚNICO ALTAMENTE CONTORCIDO QUE FORMA TODO O EPIDÍDIMO, E MAIS DISTALMENTE O DUCTO DEFERENTE. NO HUMANO, UMA REDE MAIS COMPLEXA DE TÚBULOS É FORMADA NO EPIDÍDIMO PROXIMAL, QUE SE UNE NUM ÚNICO TÚBULO EPIDIDIMAL NO CAPUT DISTAL. ESTE TÚBULO ÚNICO SUBSEQÜENTEMENTE FORMA O CAPUT DISTAL, O CORPO E A CAUDA DO EPIDÍDIMO E O DUCTO DEFERENTE (VAN ROIJEN, 1999).

No compartimento basal residem apenas as espermatogônias e espermátides em pré-leptóteno. As células que já entraram na prófase da meiose, começam a atravessar a barreira para alcançar o compartimento adluminal

(Russell., 1993). Centralmente dentro do túbulo se localiza o lúmen tubular, que é preenchido com fluido seminífero tubular e espermatozóides. Todos os túbulos se unem na rete testis, de onde o conteúdo tubular é direcionado para dentro dos ductos eferentes e epidídimo.

I. 1.1.2 REGULAÇÃO FUNCIONAL DO TESTÍCULO

O testículo adulto tem duas funções primordiais: uma é sua função endócrina como uma glândula que produz androgênos, necessários para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais masculinas primárias e secundárias e a espermatogênese. A outra envolve a produção de um imenso número de espermatozóides altamente especializados a partir de um pool de células tronco indiferenciadas (espermatogônias) que residem no compartimento basal dos túbulos seminíferos. O homem pode produzir 2×10^{12} espermatozóides ao longo de sua vida (Grootegoed.,1996). Isso não é apenas surpreendente pelos números, mas o testículo e o epidídimo cuidam do desenvolvimento e maturação das únicas células que são destinadas a viver e funcionar fora do corpo masculino. A dupla função do testículo, esteroidogênese e gametogênese é um processo finamente ajustado que envolve a inter-relações de um considerável número de células.

I. 1.1.2.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO

O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, através do sistema vascular porta, alcança a hipófise estimulando a produção e

secreção do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). O LH e o FSH se ligam a receptores transmembrana na membrana plasmática de células alvo específicas do testículo. As funções do hipotálamo e da hipófise são reguladas via mecanismo de *'feed-back'*, onde a testosterona (produzida pelas células de Leydig estimuladas pelo LH) inibe GnRH, e assim a secreção de LH e FSH, e a inibina (produzida sob o controle do FSH pelas células de Sertoli) inibe mais especificamente a secreção de FSH (Swerdloff e Wang., 1998).

A secreção do GnRH ocorre em intervalos periódicos resultando por sua vez, em liberação episódica das gonadotrofinas. A natureza pulsátil do sinal é importante para manter a atividade secretória do LH e do FSH, já que a infusão contínua do GnRH diminui a secreção desses hormônios por gerar dessensibilização nas células gonadotrofas (Weiss *et al.*, 1995). Em homens adultos, os pulsos de LH ocorrem numa frequência de 8-14 pulsos/24h, variando muito em magnitude, enquanto o FSH apresenta uma menor amplitude, em parte por causa de sua meia-vida mais longa na circulação (Griffin.,1996).

O FSH e o LH são secretados pelas mesmas células na hipófise. Ambos são glicoproteínas compostas de duas cadeias polipeptídicas designadas α e β . Compartilham a mesma sub-unidade α com a tireotrofina (TSH) e com a gonadotrofina coriônica (hCG), sendo que as diferentes características funcionais desses hormônios são determinadas pelas subunidade β . É necessária a presença de ambas subunidades para que haja uma completa atividade biológica (Griffin e Wilson., 1992).

Embora a maior parte das células gonadotrofas na hipófise sintetize tanto o FSH como o LH, sinais externos tais como a frequência do pulso do GnRH, proveniente do hipotálamo (o pulso de alta frequência favorece a síntese do LH) e

a modulação através do mecanismo de retroalimentação (*'feedback'*) com os esteróides sexuais e os peptídios gonadais parecem ser importantes para diferenciar a regulação desses hormônios (Schwartz., 1995)

I. 1. 2 TESTOSTERONA

Nos machos os andrógenos são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de tecidos reprodutivos específicos como testículos, próstata, epidídimo, vesícula seminal e pênis, bem como para outras propriedades masculinas características como, aumento da força muscular, crescimento de pêlos e barba, etc. Para manter a concentração de andrógenos em níveis apropriados, a produção de andrógenos deve ser balanceada com a taxa de “*clearance*” metabólico e excreção. A ação de andrógenos em células alvo depende da quantidade de esteróide que pode penetrar nas células, do nível de conversão metabólica dentro das células, da integração com as proteínas receptoras e finalmente, da ação dos receptores de andrógenos à nível genômico.

No homem, a testosterona é o principal andrógeno circulante. Mais de 95% é secretado pelo testículo, que produz aproximadamente 6-7 mg por dia. Os passos metabólicos necessários para a conversão do colesterol em andrógenos ocorrem nas células de Leydig, que constituem apenas uma pequena percentagem do volume testicular total. Apesar das células de Leydig serem as principais geradoras dos hormônios andrógenos circulantes, o córtex adrenal contribui com a produção de andrógenos menos potentes. A produção de esteróides não é limitada às clássicas glândulas endócrinas, mas pequenos volumes também podem ser produzidos em células do cérebro. Apesar da

contribuição das células no sistema nervoso para os níveis hormonais circulantes ser muito pequena, a produção local de esteróides pode ser fisiologicamente muito importante para ação local (Rommerts., 1998).

I. 1.2.1 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELO LH

Os hormônios hipofisários hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) são necessários para o desenvolvimento e manutenção das funções testiculares. O LH é o hormônio mais importante para o controle da produção de testosterona pela célula de Leydig. Dentro do testículo, o receptor de LH é encontrado exclusivamente nas células de Leydig. Estudos estimam que o número de células de Leydig é de 18 a 34×10^6 por testículo de rato (Kerr *et al.*, 1987; Mendis-Handagama *et al.*, 1988), representando aproximadamente 3% do volume total do testículo (Ewing e Keeney, 1993). A hipófise secreta LH de modo pulsátil para dentro da corrente sangüínea, através da qual atinge as células de Leydig dentro do testículo. O LH se liga ao receptor transmembrana na superfície da célula, resultando em estimulação da proteína-G e adenilil ciclase, aumentando a formação de cAMP. Em conseqüência, o cAMP ativa proteína quinase A, que por sua vez efetua a fosforilação de proteínas específicas. Mudanças observadas dentro da célula de Leydig sob estimulação com LH *in vitro* são: 1) depleção de gotículas de lipídios intracelulares que estocam esteres de colesterol, 2) estimulação da hidrólise de ésteres de colesterol para produzir colesterol livre, 3) mudanças em elementos do citoesqueleto 4) transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, local onde se situa a enzima

P450_{scc}, e 5) estimulação da síntese de RNA e proteínas (Dufau., 1988; Ewing e Keeney., 1993).

O precursor da síntese de esteróides é o colesterol. Este substrato pode ser sintetizado *de novo* a partir do acetato, mas pode também ser transportado por lipoproteínas do plasma. Gotículas de lipídios intracelulares, que contém ésteres de colesterol também podem funcionar como estoques intracelulares de colesterol. O nível de contribuição da síntese e do suprimento das lipoproteínas ou das gotículas de lipídios depende da espécie animal e do grau de estimulação da produção de esteróides.

Os hormônios esteróides contêm 21 ou 18 átomos de carbono, enquanto o colesterol contém 27. O primeiro estágio na síntese de hormônios esteróides é a remoção de 6 carbonos da cadeia lateral do colesterol para a formação de pregnenolona (Stryer., 1996). Essa conversão de colesterol a pregnenolona foi por muitos anos considerada o passo limitante na esteróidogênese testicular. Recentemente, no entanto têm-se observado que o real passo limitante é o transporte do colesterol da membrana externa da mitocôndria para a membrana interna da mitocôndria, onde a enzima P450_{scc} está situada (revisto em Stocco., 1998). A partir da pregnenolona é formada a progesterona e a partir desta são sintetizados os androgênios, que contém 19 átomos de carbono.

A síntese e secreção da testosterona são as funções mais conhecidas e mais importantes das células de Leydig. Durante a vida fetal, um pulso de testosterona é responsável pela diferenciação do sistema reprodutivo masculino, e durante o período neonatal um pulso subsequente efetiva o '*inprinting*' dos tecidos dependentes de andrógenos.

No período puberal, o aumento na produção de testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias, comportamento sexual masculino e o início da espermatogênese. Durante a vida adulta, a testosterona é necessária para a manutenção das características masculinas secundárias bem como para a manutenção da densidade dos ossos do esqueleto (Ewing *et al.*, 1980).

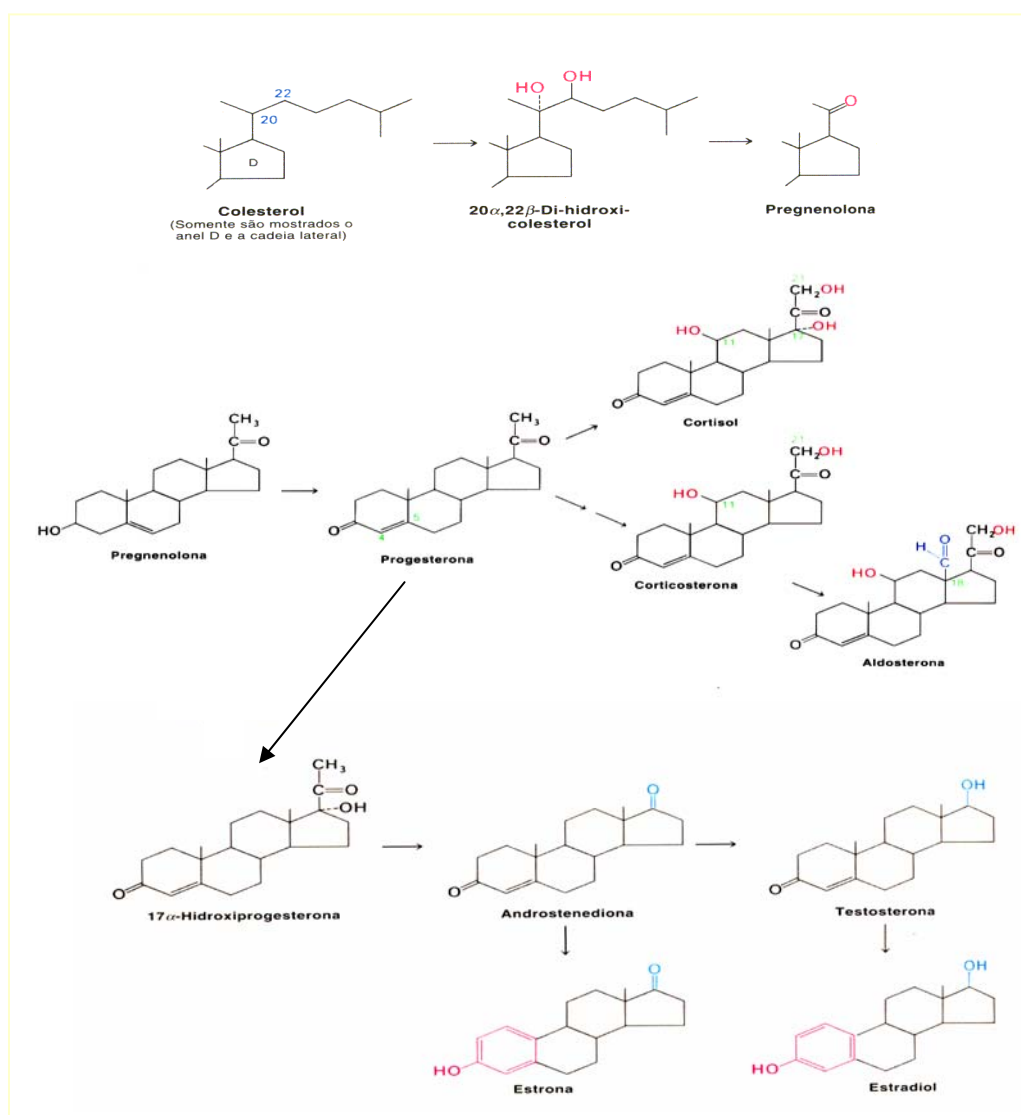


FIGURA I.4 DESENHO ESQUEMÁTICO DA SÍNTESE DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES À PARTIR DO COLESTEROL (STRYER., 1996).

O nível de esteróides biologicamente ativos no corpo é determinado pelas taxas de síntese e de degradação. Para manter uma concentração estável de esteróides numa célula alvo, deve haver um equilíbrio entre o suprimento e a sua retirada. No lado externo da célula alvo, esses fatores são: taxa de fluxo de fluidos biológicos (sangue e linfa), liberação das proteínas ligadoras, transporte através das membranas, camadas de células de tecido conectivo e às vezes inativação do esteróide durante o transporte. Dentro das células alvo, reações de ativação e inativação locais e transporte para fora da célula têm influência. Existem diversas possibilidades para o metabolismo da testosterona. A aromatização ou a redução da ligação Δ^4 da testosterona gera, respectivamente, 17β -estradiol e 5α -dihidrotestosterona. Esses esteróides têm atividades biológicas diferentes uma vez que interagem com receptores distintos nas células. Dessa forma as ações da testosterona em tecidos alvo são significativamente modulados por reações metabólicas.

I. 1.2.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ANDRÓGENOS NO TESTÍCULO

As células de Leydig não estocam testosterona, a testosterona se difunde rapidamente para dentro do compartimento intersticial (De Jong *et al.*, 1974; Sharpe, 1994). Subseqüentemente a testosterona pode difundir-se para dentro da rede de capilares de onde entra na corrente sanguínea periférica, ou pode ser transportada para dentro do túbulo seminífero. Um grande esforço tem sido feito na última década para elucidar os níveis reais de testosterona no testículo em

relação ao nível de testosterona que é necessário para iniciação e manutenção da espermatogênese.

Turner e colaboradores (1984) descreveram, que a concentração de testosterona nos testículos de ratos sendo como 0.2-0.25 μ M. Jarow e colaboradores (2001) descrevem, esse valor aproximadamente de 0.2 μ M em ratos e de 2.0 μ M em humanos, presente no fluido testicular. Maddocks e colaboradores (1993) descrevem, 0.3 μ M presente no sangue venoso testicular de ratos e Awoniyi e colaboradores (1989) descrevem, valores entre 0.2-0.3 μ M em testículos de ratos.

I. 1.2.3 FUNÇÕES GONADAIS DOS ANDRÓGENOS

Andrógenos testiculares são necessários para o desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas, incluindo a função espermatogênica do testículo e maturação do esperma no epidídimo. Em 1930 foi observado que a remoção da glândula hipófise resultou em degeneração da espermatogênese no rato. Essa degeneração foi, no entanto prevenida com a suplementação de testosterona em altas doses (Smith., 1930). Desde então um número considerável de pesquisas tem focado a regulação hormonal da espermatogênese e maturação do esperma, com particular interesse na ação dos andrógenos. Investigadores ainda precisam elucidar através de qual mecanismo os andrógenos estão envolvidos na iniciação e manutenção da espermatogênese. O testículo precisa de um nível muito mais elevado de testosterona para seu pleno funcionamento do que os outros tecidos dependentes de andrógenos. O

porque dessa necessidade de altas doses de testosterona e exatamente qual a concentração de testosterona requerida para que a espermatogênese ocorra, ainda não está bem esclarecido.

I. 1.2.4 MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA

A maioria das ações dos hormônios androgênicos ocorre através da ativação da transcrição de DNA via interações de alta afinidade com o receptor nuclear de andrógenos (RA). Este receptor é membro da superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes. Outros membros dessa família incluem os receptores para todos os hormônios esteróides, hormônio tireóideo, retinoides, vitamina D₃ e uma série de receptores sem ligante conhecido (receptores órfãos) (Tsai e O'malley., 1994). Quando o ligante (testosterona ou diidrotestosterona) associa-se com o RA no citoplasma ou no núcleo, o RA se dissocia das '*heat-shock proteins*' (hsp90 e hsp70), forma um dímero com uma segunda molécula de RA ativada e se liga a seqüência '*enhancer*' específicas conhecidas como elementos responsivos a andrógenos presentes nas regiões 5' adjacentes aos genes regulados por andrógenos (Riegman *et al.*, 1991). Acredita-se que a ligação dos dímeros de RA aos elementos responsivos a andrógenos estabilize os fatores de transcrição nos promotores dos genes alvo, induzindo assim um alto nível de iniciação de transcrição (Jenster., 1998; O'malley e Tsai., 1992).

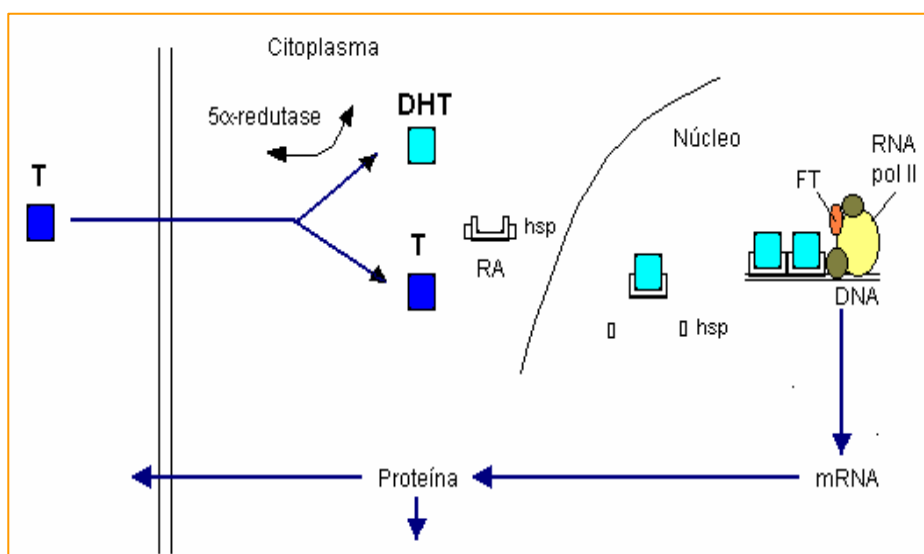


FIGURA I.5 MECANISMO DE AÇÃO GENÔMICA DE ANDRÓGENOS NUMA CÉLULA ALVO. TESTOSTERONA (T), DIFUNDE-SE PARA DENTRO DO CITOPLASMA CELULAR ONDE PODE SER CONVERTIDO À DIHIDROTESTOSTERONA (DHT) PELA ENZIMA 5α -REDUTASE. AMBOS, T E DHT PODEM SE LIGAR AO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) E ATIVÁ-LO. AO LIGAR-SE COM O HORMÔNIO, O RECEPTOR DE ANDRÓGENOS SE DISSOCIA DAS 'HEAT SHOCK PROTEINS' (HSP), E SE LIGA AO DNA COMO HOMODÍMERO. FT= FATOR DE TRANSCRIÇÃO; RNA POL II= RNA POLIMERASE II (VAN ROIJEN., 1999).

I. 2 EFEITOS NÃO GENÔMICOS DE ESTERÓIDES

Estudos recentes têm relatado uma variedade de efeitos rápidos não-genômicos de esteróides, geralmente envolvendo fluxo de íons, para ligantes como progesterona, estrógenos, corticosterona, aldosterona, andrógenos e vitamina D (Duval *et al.*, 1983; Revelli *et al.*, 1998; Christ *et al.*, 1999).

Já foi reportada a presença de receptores funcionais não-genômicos de progesterona em espermatozóides humanos (Luconi *et al.* 1998). Vários outros laboratórios também identificaram receptores de progesterona na membrana plasmática de oócitos de anfíbios (Brann, *et al.*, 1995). A vitamina D₃ produz uma hidrólise rápida, tempo dependente de esfingomielina, resultando na geração de ceramida e fosforilcolina em células leucêmicas promielocíticas humanas HL-60, e a progesterona tem o mesmo efeito em oócitos de *Xenopus leavis* (Gosh *et al.*, 1997; Okazaki *et al.*, 1989).

O estrogênio pode disparar uma variedade de eventos de tradução de sinais, como a estimulação de cAMP, fluxo de cálcio, ativação da fosfolipase C (PLC), geração de inositol fosfato, bem como a rápida liberação de prolactina (Razandi, *et al.*, 1999).

Tem-se demonstrado também que andrógenos induzem um rápido fluxo de cálcio numa variedade de tipos celulares classicamente dependentes de andrógenos. Koenig e colaboradores (1989) reportam, que a testosterona aumenta rapidamente a *exocitosis*, o transporte de amino ácidos e hexose em cortex de rim de ratos. Fluxos de cálcio seguindo adição de concentrações picomolares de testosterona tem sido reportados em miócitos de coração de rato (Koenig *et al.*, 1989) e osteoblastos de ratos e de galinhas (Armen., 2000; Lieberherr e Grosse., 1994;). Steinsapir e colaboradores (1991) demonstraram um aumento de cálcio intracelular em células de câncer de próstata humana (LNCaP), após adição de testosterona, em dois minutos. Recentemente, Kampa e colaboradores (2002), descreveram a existência de receptores de membrana em células de câncer na próstata humana (LNCaP). A ativação destes receptores

resulta da reorganização do citoesqueleto e aumento da secreção do antígeno específico prostático (PSA). Tem sido bem reportado que em células LNCaP, o andrógeno estimula o influxo de Ca^{2+} através de CCDV em menos de um minuto (Lyng *et al.*, 2000; Steinsapir *et al.*, 1991). Konoplya e Poppof (1992), usando várias técnicas, identificaram receptores de andrógenos na membrana de células da próstata e do fígado de ratos, com uma afinidade para andrógenos duas ordens de magnitude mais alta que a testosterona ligada a globulina (TeBG) no soro do rato.

Félix e colaboradores (2001) descreveram, que em neurônios ganglionares pélvicos de ratos a testosterona altera o potencial de membrana em repouso produzindo despolarização. O efeito foi obtido entre 1-2 minutos com a concentração fisiológica de 1mM.

A maioria desses efeitos não-genômicos de esteróides poderia adicionar sinais complementares aos efeitos genômicos desses esteróides. Sabe-se que a testosterona pode modificar a susceptibilidade de células-T à doenças infecciosas. Recentemente foram reportados efeitos da testosterona e da testosterona ligada à albumina sobre o fluxo de cálcio através da membrana plasmática de células-T (Benten *et al.*, 1999; Benten *et al.*, 1997). Uma vez que células-T não possuem o receptor clássico de andrógenos, esse efeito biológico indica o envolvimento de receptores de membrana plasmática para a expressão de efeitos de andrógenos. Um outro exemplo da ação não-genômica de andrógenos é a ativação rápida de receptores de membrana em neurônios do bulbo olfativo por concentrações nanomolares de androsterona ($\Delta^{16-5\alpha}$ -androsten-3-one) (Rommerts., 1998).

O fato de a espermatogênese depender de altos níveis de testosterona é um bom exemplo da ação intratesticular de testosterona que não pode ser facilmente explicada baseando-se nas propriedades do receptor nuclear clássico. Já que os níveis de testosterona necessários para a manutenção da espermatogênese são muito maiores que o nível de saturação do receptor de alta afinidade de andrógeno, é possível que opere um sistema alternativo, diferente do receptor clássico (Rommerts., 1988; Rommerts., 1992).

I.3 AÇÃO DA TESTOSTERONA SOBRE A MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI

O epitélio dos testículos é um tecido complexo, e a comunicação estrutural e funcional entre as células de Sertoli e as células germinativas é extremamente elaborada.

A posição das células de Sertoli permite que essas células recebam, integrem e emitam os sinais requeridos para o processo espermatogênico, esta comunicação ocorre via hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona, etc. com as células peritubulares e as células germinativas. As células germinativas, células de Sertoli e as células Leydig desenvolvem uma íntima e elaborada rede de comunicação entre si através dos hormônios, efeitos parácrinos e sinalização molecular. As células de Sertoli podem prover para as células germinativas nutrientes e fatores biológicos (Jegou., 1993; Skinner .,1991).

Este processo dinâmico é primariamente regulado por FSH e testosterona (Cheng *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Carreau *et al.*,1994) agindo em diferentes níveis da organização celular. FSH, através dos receptores acoplados à proteína-G na membrana (GPCRs), regula nas células de Sertoli a proliferação e a síntese

de glicoproteínas e proteínas (Bernard e Wassermann., 1982), captação de cálcio (Grasso e Reichert., 1989) e outros parâmetros metabólicos (Carreau *et al.*, 1994).

Hakola e colaboradores (1998), observaram que liberações pulsáteis de LH, seguindo seu biorritmo, produzem *quanta* de testosterona secretados em ratos. Mulligan e colaboradores (1997), demonstraram que rajadas secretórias de testosterona seguem o modo pulsátil de secreção de LH, e Winters e colaboradores (1999), descreveram que a testosterona e outros esteróides são co-secretados no interstício testicular em resposta a secreção pulsátil de LH. Em touros, foi demonstrado que também os níveis de testosterona periférica circulante são pulsáteis, seguindo o padrão do ritmo secretório do LH (Dixit *et al.*, 1998).

Todos esses dados indicam a presença de concentrações muito altas de testosterona na porção basal das células de Sertoli, seguindo as rajadas de secreção hormonal.

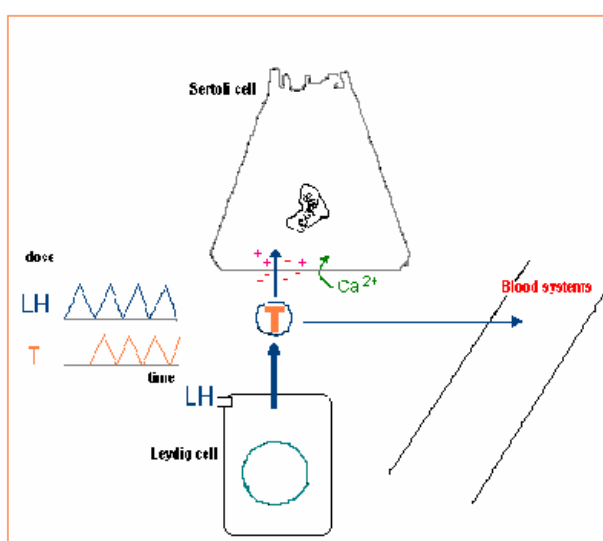


FIGURA 1.6 SÍNTESE E LIBERAÇÃO PULSÁTIL DA TESTOSTERONA NO AMBIENTE TESTICULAR.

Gorczyńska e Handelsman (1995) demonstraram, que a testosterona aumenta rapidamente o cálcio intracelular em células de Sertoli em ratos com 17-20 dias de idade. Eles sugerem que a testosterona pode exercer seus efeitos através da membrana, sinalizando um caminho rápido e de curta duração.

A testosterona aumenta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli isoladas de testículos de ratos (Leite *et al.*, 1999). Usando células de Sertoli enriquecida (SCE) onde os túbulos seminíferos foram irradiados no útero das ratas com 1 gray de ^{60}Co entre os dias 19 e 20 de prenhes (Wassermann *et al.*, 1992) descreveu que a testosterona induz a uma imediata (< 1 Seg) e transitória despolarização da membrana da célula de Sertoli. von Ledebur e colaboradores (2002), demonstraram que a testosterona aplicada topicamente, em concentrações observadas em fluidos testiculares do rato, produz uma despolarização imediata tempo e dose dependente.

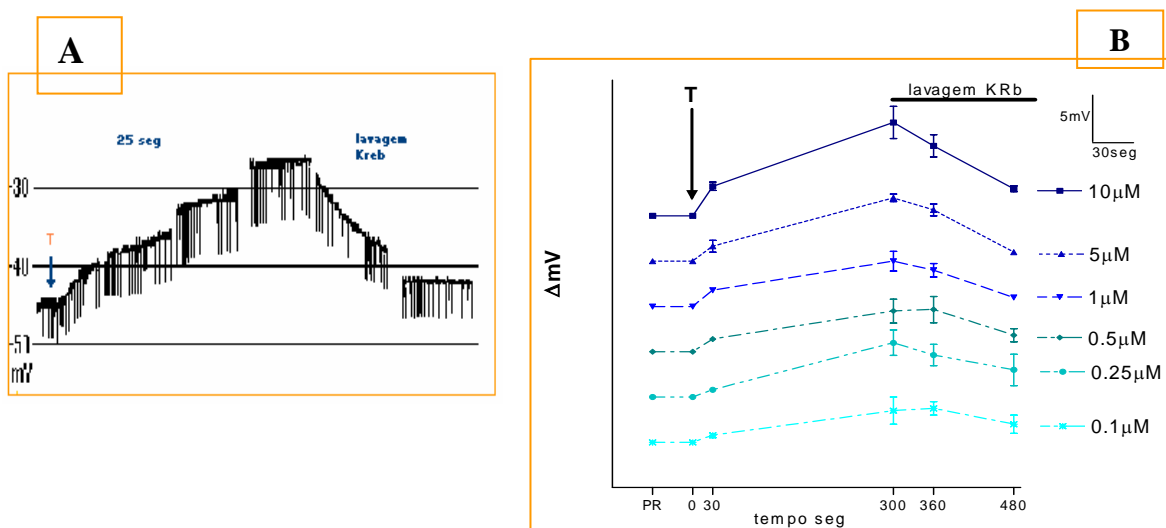


FIGURA 1.7 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE TESTOSTERONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA DE 10 μM DE TESTOSTERONA EM UMA CÉLULA DE POTENCIAL DE REPOUSO DE -46mV (A). EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DA CÉLULA DE SERTOLI (B). (VON LEDEBUR *ET AL.*, 2002).

Assim como, com aplicações tópicas, observaram que após a aplicação da testosterona, a resistência da membrana da célula empalada aumenta. Esse aumento se dá de forma dose dependente. O fato de a resistência mostrar-se aumentada, significa que o fluxo de íons através da membrana se dá com maior dificuldade, ou seja, é um indicativo de que canais iônicos estão se fechando.

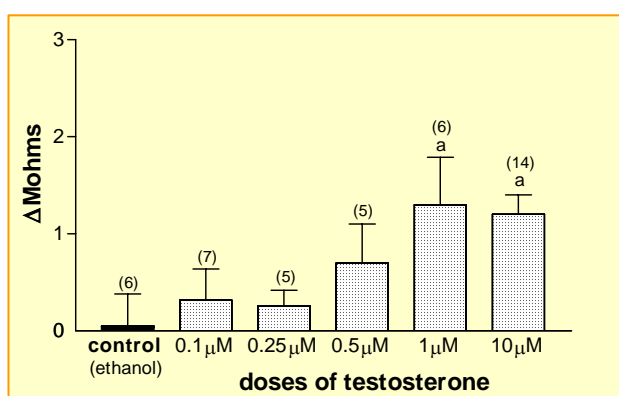


FIGURA 1.8 COMPORTAMENTO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA EM DIFERENTES DOSES DE TESTOSTERONA.(VON LEDEBUR *ET AL.*, 2002.).

I. 4 CANAIS IÔNICOS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR

A maior parte da membrana celular é quase completamente impermeável aos íons. Estes podem atravessá-la através de canais iônicos, de trocadores ou de transportadores, como a bomba Na^+/K^+ por exemplo. O fluxo de íons através de canais iônicos é passivo. A direção e o equilíbrio do fluxo iônico através de um canal não é determinado pelo canal, mas sim pela força eletroquímica à qual um determinado íon é submetido. A força motriz eletroquímica é determinada por dois fatores: 1) a diferença de potencial elétrico através da membrana e 2) o gradiente de concentração do íon através da membrana.

Algumas células geram sinais elétricos periódicos de maneira autônoma, outras permanecem silenciosas até que sejam estimuladas. Esses sinais surgem da ação de várias combinações de canais iônicos, que são proteínas que atravessam a membrana plasmática. A abertura e o fechamento dos canais é altamente regulado, sendo que diferentes canais têm especificidades iônicas diferentes e diferentes modos de regulação. O gradiente de concentração iônico através da membrana é a base da energia para os sinais elétricos. Quando canais iônicos estão abertos, os íons se movem através do canal ao longo de seu gradiente eletroquímico. Seu movimento líquido através da membrana constitui uma corrente que altera o potencial de membrana e gera um sinal elétrico. A densidade, especificidade, modo de regulação e cinética dos canais iônicos na membrana determina suas propriedades elétricas e os sinais elétricos que vai gerar (Sargent, 1992).

A maioria dos canais é altamente seletiva a apenas um tipo de íon que irá atravessá-los. Essa seletividade é baseada no tamanho, carga e hidratação dos íons. Todos os canais iônicos estudados até agora apresentam um ou mais estados conformacionais relativamente estáveis, ou seja, cada canal iônico tem pelo menos um estado aberto e um ou dois estados fechados. Alguns canais são regulados por ligantes químicos, que podem ser neurotransmissores ou hormônios no meio extracelular que se ligam ao lado extracelular do canal, ou podem ser segundo-mensageiros dentro da célula que atuam no lado citoplasmático do canal. Outros canais iônicos são influenciados por mudanças no potencial de membrana da célula e outros por estiramento mecânico ou pressão da célula. Alguns canais são regulados por mais de um desses três tipos de fatores. Um canal sob influência desses fatores reguladores pode então entrar em

um dos três estados funcionais a seguir: a-fechado e ativável (repouso) , b-aberto (ativo) e c-fechado e não ativável (refratário). Cada célula tem vários tipos de canais iônicos em suas membranas plasmáticas (Kandel *et al.*, 1995). Contudo, os canais de cálcio dependentes de voltagem e os de potássio sensíveis ao ATP serão analisados com maior ênfase por terem uma participação mais relevante neste trabalho.

I.5 CANAIS DE CÁLCIO

Existe uma grande diversidade de canais de cálcio, caracterizados por diferenças fundamentais nos mecanismos que governam sua abertura e fechamento. Alguns canais se abrem quando um neurotransmissor ou um hormônio ocasiona variações na diferença de potencial elétrico através da membrana e são denominados canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). Outros se abrem quando o ligante interage com o receptor de membrana celular associado a canais de membrana e são chamados canais de cálcio ligados ao receptor. Neste caso, a abertura dos canais pode se dar pela ação de segundos mensageiros, pela fosforilação do canal, por ação da proteína G, pelo próprio Ca^{2+} intracelular ou pela ligação direta do hormônio ou neurotransmissor ao próprio canal.

Existem vários tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem: canais do tipo L, do tipo N, do tipo P/Q e do tipo R. Neste trabalho vamos descrever somente os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), que são os mais importantes para o nosso entendimento nesse momento.

I. 5.1 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) fazem parte de uma grande família de canais que consistem em proteínas de membrana cuja atividade é modulada pela variação do potencial de membrana. Os canais sensíveis à voltagem podem existir em três estados funcionalmente distintos: fechados, abertos e inativos. Tanto o estado fechado como o inativado não são condutores. Os CCDV podem ser inativados por uma despolarização prolongada quando se tornam refratários (Catterall., 1995). Apesar da predominância do controle do canal ser a modificação do potencial da membrana, esta sensibilidade pode ser modificada por alguns fatores como: a fosforilação do canal, a ligação de uma proteína-G ao canal e a ligação de fármacos com afinidade específica aos canais. (Spedding e Paolette., 1992)

A descrição inicial de correntes de Ca^{2+} no miocárdio por Reuter (1967) iniciou uma série de trabalhos para definir as propriedades dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Tsien e Tsien (1990) identificaram, eletrofisiologicamente e farmacologicamente diferentes canais que foram chamados tipo L (para “*long lasting*”; de longa duração) tipo T (para “*transient, tiny*”; transitório, minúsculo) e tipo N (para neuronal, nem L nem T). Subseqüentemente, Llinas e colaboradores (1989), mostraram evidências da existência de canais de cálcio voltagem dependente com alto limiar de ativação que foram chamados de canais tipo P (para células de Purkinje) (Spedding e Paoletti, 1992).

Canais de cálcio dependentes de voltagem causam um rápido influxo de Ca^{2+} para dentro das células quando a membrana é despolarizada. Eles têm um

papel importante em neurônios, músculos esqueléticos, cardíacos e lisos, mas também em células não excitáveis como células endócrinas, e linfócitos. Esses canais estão envolvidos em eventos sinápticos de transmissão de sinais, acoplamento excitação-contração, acoplamento excitação-secreção, função marcapasso, crescimento celular, proliferação celular e apoptose (Staes *et al.*, 2001).

Baseados em suas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas, os canais de cálcio dependentes de voltagem podem ser funcionalmente classificados em seis classes de correntes de Ca^{2+} designadas L-, N-, T-, P/Q-, e R- (Tsien *et al.* 1991; Hofmann *et al.*, 1999). Os canais de cálcio consistem de complexos de uma subunidade formadora de canal - α_1 com subunidades α_2 , δ , β e γ . Canais de Ca^{2+} que contém subunidade $\text{Ca}_v2.2$ α_1 (antigamente chamada de α_{1B}) são responsáveis por correntes tipo N, e canais de Ca^{2+} contendo subunidade $\text{Ca}_v2.1$ α_1 (antigamente chamada de α_{1A}) são responsáveis pelas correntes de Ca^{2+} tipo P e Q (Herlitze *et al.*, 2000).

I. 6 CANAIS DE POTÁSSIO

Os íons potássio apresentam funções relacionadas com a geração de sinais elétricos na membrana e com a manutenção do potencial de membrana no repouso, juntamente com os íons cloro. Estas propriedades se devem ao fato de o potencial de equilíbrio do potássio se encontrar em valores muito negativos, geralmente abaixo do nível de repouso, e apresentar uma permeabilidade relativamente alta. Assim sendo, partindo do repouso, quando houver maior fechamento dos canais de K^+ ocorrerá uma despolarização devido à redução do

efluxo de K^+ , e quando houver maior abertura desses canais ocorrerá uma hiperpolarização pelo aumento do efluxo do íon (Hodgkin e Horowicz, 1959).

Canais de K^+ , originalmente identificados como as entidades moleculares que mediam fluxos de íons K^+ através da membrana dos nervos na geração de potenciais de ação são agora conhecidos em virtualmente todos os tipos celulares em todos os organismos, onde eles estão envolvidos numa variedade de funções fisiológicas (Miller, 2000).

Os canais de K^+ são os mais numerosos e com maior diversidade se comparados aos demais canais. Existe uma grande variabilidade dos canais de K^+ nos diferentes tecidos e entre os tipos celulares do mesmo órgão, quando consideramos os tipos e/ou a densidade de canais (Barry e Nerbonne., 1996). Eles são proteínas integrais da membrana que formam poros aquosos transmembrana através dos quais especificamente o K^+ permeia. Muitas subfamílias moleculares de canais de K^+ são conhecidas, e essas correspondem grosseiramente aos sinais fisiológicos pelos quais a abertura dos canais é controlada, como por exemplo, voltagem, Ca^{2+} , proteína-G e poliaminas. A estrutura do canal de K^+ bacteriano é conhecida com alta resolução, e ela revela a base química para a permeação seletiva do K^+ . Os genomas de humanos, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* contém 30-100 genes de canais de K^+ cada, e alguns deles ainda estão sujeitos a “*splicing*” alternativos. Várias doenças genéticas humanas, como as patologias envolvendo arritmias cardíacas, surdez, epilepsia, diabetes e má regulação da pressão arterial, são causadas pela ruptura de genes para canais de K^+ .

Os canais de K^+ são os membros fundadores da “superfamília-S4” de canais iônicos dedicados à sinalização elétrica. Os canais dependentes de

nucleotídeos cíclicos (cAMP por exemplo) evoluíram dos canais de K^+ via a aquisição de um domínio de ligação para nucleotídeos cíclicos perto do terminal carboxil; os canais de Ca^{2+} e Na^+ , cada um dos quais é um monômero contendo quatro repetições internas, evoluíram dos canais de K^+ através de duas duplicações de genes, sendo que os canais de Ca^{2+} surgiram em organismos unicelulares como os protistas e os canais de Na^+ surgiram com o aparecimento de neurônios em organismos multicelulares (Miller., 2000).

Existem duas grandes classes de canais de K^+ definidas pela topologia transmembrana: o subtipo com seis hélices transmembrana ligado à voltagem (K_v) e o subtipo de duas hélices transmembrana com retificação para dentro (inward-rectifier) (K_{ir}).

Os canais de K^+ são encontrados em tantos tipos celulares diferentes efetuando tantas tarefas biológicas distintas que são impossíveis resumir todos eles aqui. Todos os canais de K^+ no entanto efetuam uma função básica: a formação de um “vazamento” extremamente específico para íons K^+ . Praticamente todas as células mantêm uma concentração citoplasmática de K^+ muito mais alta que a extracelular e a abertura de um canal de K^+ automaticamente implica numa mudança na voltagem elétrica através da membrana plasmática em direção à negatividade. Essa mudança é chamada de hiperpolarização e ocorre em diferentes contextos fisiológicos para diferentes propósitos.

De um modo geral, as atividades dos canais de K^+ são reguladas de maneira elaborada e estreita, tanto por controles de transcrição específica de cada tecido como por ações bioquímicas nas proteínas do canal. Alguns canais de K^+ são constitutivamente ativos, mas a maioria atua transitoriamente, sendo

regulados por sinais fisiológicos. Os canais K_v são ativados por mudanças de voltagem despolarizantes, alguns canais de K^+ ativados por Ca^{2+} são sensíveis tanto à voltagem quanto aos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , enquanto outros respondem apenas ao Ca^{2+} , diferentes classes de canais K_{ir} são diretamente regulados por fatores intracelulares como proteínas-G, nucleotídeos ou poliaminas. Além disso, a fosforilação de proteínas muitas vezes modula a sensibilidade dos canais de K^+ para os sinais fisiológicos propriamente ditos, ou é ela mesma o sinal de ativação (Miller., 2000).

Nesta seção, serão apenas citados os canais K^+ (K_{ir}) devido à sua grande diversidade e complexidade e serão descritos os canais envolvidos diretamente no foco deste trabalho.

1.6.1 CANAIS DE POTÁSSIO RETIFICADORES DE INFLUXO (K_{IR})

Os canais de potássio de retificação interna (K_{ir}), expressados em muitos tecidos de invertebrados e vertebrados, vários subtipos evoluíram especializações na regulação da excitabilidade da membrana e transporte de K^+ . (Doupnik *et al.*, 1995). Estas subfamílias são designadas K_{ir} 1.0 - 5.0 de acordo com a nomenclatura de Chandy e Gutman., (1993) e K_{ir} 6.0 de acordo com (Inagaki *et al.*, 1995).

Os canais da subfamília K_{ir} 1.0 (1.1 a, b, c) são expressos predominantemente em rins, e provavelmente estão envolvidas na regulação da homeostase do K^+ .

Os canais da subfamília K_{ir} 2.0 (2.1, 2.2, 2.3); estão distribuídos em numerosos tipos de células, incluindo neurônios (Constante e Galvan.,1983; Inoue

et al., 1998); células da glia (Barres *et al.*, 1990; Newman.,1993); fibras do músculo esquelético (Leech e Stanfield.,1981); miócitos ventriculares (Sakmann e Trude.,1984; Kurachi.,1985); células do músculo liso vascular (Quayle *et al.*,1993), células endoteliais (Silver e DeCoursey.,1990) células epiteliais (Cooper *et al.*, 1991); e em osteoclastos (Kelly *et al.*,1992).

Os canais da subfamília K_{ir} 3.0 (3.1, 3.2, 3.3, 3.4), um clássico canal de K_{ir} ativado por proteína-G expressados em miócitos atriais e no nodo sinoatrial (Kurachi *et al.* , 1992), e em vários neurônios de cérebro de mamíferos. (Karschin *et al.*,1994; DePaoli *et al.*, 1994).

Os canais da subfamília K_{ir} 4.0 e K_{ir} 5.0 foram clonados em cérebro de ratos (Bond *et al.*, 1994).

Os canais da subfamília K_{ir} 6.0 (6.1, 6.2), expressados no pâncreas, são canais com alta afinidade para sulfuniluréias (SUR) (Inagaki *et al.*, 1995a; Inagaki *et al.*, 1995b).

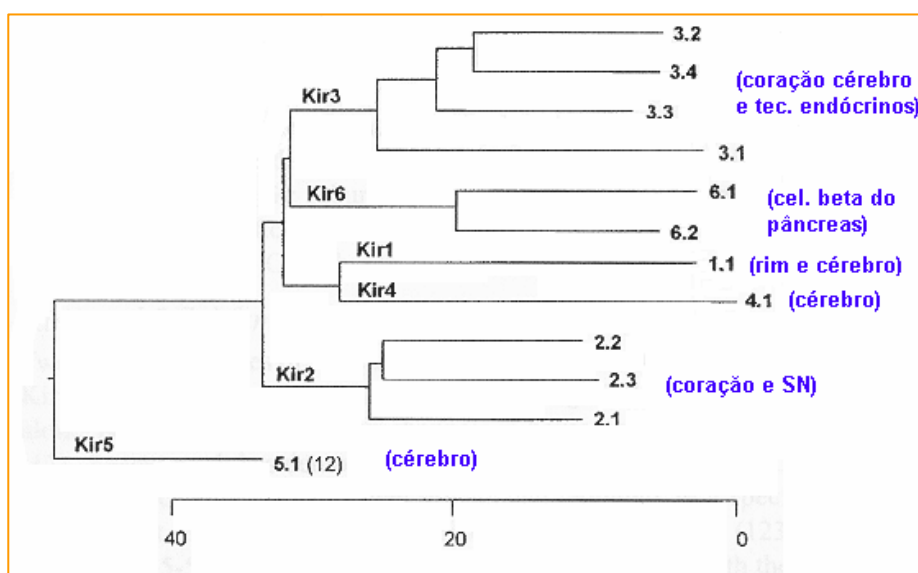


FIGURA I. 9 ÁRVORE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA DE CANAIS DE POTÁSSIO RETIFICADORES DE INFLUXO (K_{IR}). (MODIFICADA DE NICHOLS E LOPATIN., 1997).

I. 6.2 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K^+_{ATP})

Os canais K^+_{ATP} são amplamente distribuídos em uma variedade de tecidos e tipos celulares onde eles acoplam mudanças do metabolismo intracelular à atividade elétrica da membrana plasmática, tendo, portanto um importante papel tanto na fisiologia normal quanto na patofisiologia. A abertura dos canais K^+_{ATP} levará o potencial de membrana em direção ao potencial de equilíbrio do íon potássio (perto de -80mV para a assimetria fisiológica de K^+ extracelular/ K^+ intracelular) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1998).

Os canais K^+_{ATP} acoplam a excitabilidade da membrana ao estado metabólico das células e estão presentes em uma variedade de tecidos (Ashcroft., 1998), no coração, nas células β do pâncreas, músculo esquelético, músculo liso, cérebro, hipófise e no rim. No pâncreas, os canais de K^+_{ATP} são como um sensor da concentração sanguínea de glicose na regulação da secreção de insulina.

Os canais de K^+_{ATP} têm propriedades de canais de K^+ com retificação interna. A clonagem e reconstituição das subunidades desses canais demonstraram que de fato, os canais K^+_{ATP} são hetero-multímeros de subunidades dos canais de K^+ com retificação interna ($K_{ir}6.x$) (Inagaki *et al.*, 1995a ; Nichols e Lopatin, 1997) e acoplados a receptores de sulfoniluréias (SUR) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995), membros da superfamília “ATP-binding cassette” (ABC) (Higgins, 1995). Estudos recentes indicam que SUR e $K_{ir}6.x$ se associam para formar um grande canal tetramérico ($SUR/K_{ir}6.x$)₄. As subunidades $K_{ir}6.x$

formam o poro do canal enquanto SUR é requerida para ativação e regulação do canal (Bryan e Aguilar-Bryan., 1997). A atividade dos canais K^+_{ATP} é controlada pela concentração de ATP e ADP intracelular, ou seja, pelo equilíbrio ATP/ADP. Quando há um aumento da razão ATP/ADP, os canais se fecham e quando há uma redução dessa razão os canais se abrem. Desta forma sua função está estreitamente relacionada com o estado metabólico das células (Miki *et al.*, 1999; Kakei , 2003).

Em miócitos cardíacos e esqueléticos, e em músculo liso vascular e neurônios ainda há controvérsia se os canais de K^+_{ATP} são ativos em condições fisiológicas normais. Já é aceito, no entanto que canais de K^+_{ATP} podem ser abertos, mesmo em miócitos isolados quiescentes, por condições de hipóxia ou isquemia, e sua corrente para fora é suficiente para reduzir a duração do potencial de ação. Essa redução diminui o influxo de Ca^{2+} , diminuindo a força contrátil, o que reduz o consumo de ATP e que acaba por proteger a célula durante períodos de restrição metabólica. Em células de músculo liso que, da mesma forma que as células- β , têm alta resistência, um pequeno número de canais de K^+_{ATP} pode influenciar o tônus vascular. Em neurônios, a abertura de canais de K^+_{ATP} reduz a frequência de potenciais de ação, tendo novamente uma função protetora (Aguilar-Bryan *et al.*, 1998).

As propriedades funcionais dos canais de K^+_{ATP} foram melhor caracterizadas em células- β do pâncreas. Desde o descobrimento dos canais K^+_{ATP} em células- β , o modelo no qual a liberação de insulina estimulada por glicose é dependente do fechamento dos canais K^+_{ATP} tornou-se amplamente aceito. Neste modelo, o aumento da razão ATP/ADP decorrente do metabolismo da glicose, leva os canais K^+_{ATP} a se fecharem, despolarizando a membrana das

células- β , levando à abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e permitindo o influxo de Ca^{2+} . O aumento na concentração de cálcio intracelular nas células- β então dispara a exocitose dos grânulos de insulina (Aguilar-Bryan *et al* 1995.; Cook *et al* 1984.; Loussouarn *et al.*, 2001). Além disso, sulfoniluréias como tolbutamida e glibenclamida, que são amplamente usadas no tratamento de diabetes mellitus não dependente de insulina, estimulam a liberação de insulina por fecharem diretamente os canais K^+_{ATP} (Miki *et al.*,1999).

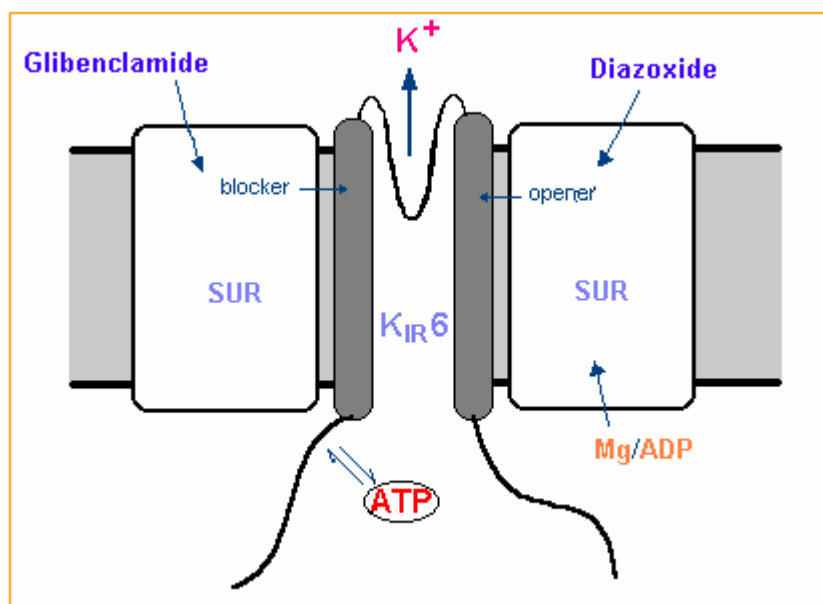


FIGURA 1.10 CANAIS K^+_{ATP} REGULADOS POR NUCLEOTÍDIOS. A SUBUNIDADE $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ FECHA OS CANAIS DE K^+_{ATP} . QUE É COMPLETADA NA SUBUNIDADE SUR1. A SUBUNIDADE SUR1 HIPER SENSIBILIZA O CANAL E AUMENTA A SENSIBILIDADE AO ATP. ESTA HIPER SENSIBILIDADE OCORRE POR HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS NO SUR1 *NUCLEOTIDE BINDING FOLDS* (NBFs), E ESTE EFEITO É MINIMIZADO, OU ANULADO, POR MGADP OU DIAZOXIDA (MODIFICADA DE SHYNG *ET AL.*, 1997).

Como SUR1 não é expresso em músculo cardíaco e esquelético onde canais de K^+_{ATP} estão presentes, sugeriu-se a presença de uma isoforma de SUR1 nesses tecidos. Foi encontrada a isoforma SUR2A. No entanto essa isoforma tem a afinidade ~500 vezes menor por glibenclamida que a SUR1. Altos níveis de mRNA de SUR2A é expresso em coração, músculo esquelético e ovário e níveis moderados são encontrados em ilhotas pancreáticas, cérebro, língua, testículo e glândula adrenal (Miki *et al.*, 1999).

A Glibenclamida ($1\mu\text{M}$), concentração suficiente para bloquear correntes de canais K^+_{ATP} de células- β , inibiu apenas moderadamente a atividade do canal SUR2A/ $K_{ir}6.2$. Por outro lado, abridores de canal K^+_{ATP} cardíaco, cromakalina e pinacidil, ativaram canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$. No entanto, diazoxida ($100\mu\text{M}$), concentração suficiente para ativar canais K^+_{ATP} de células- β , não ativou os canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$. Portanto, as propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas de canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$ são similares àquelas dos canais K^+_{ATP} descritos em músculo esquelético e cardíaco. Estudos até agora sugerem que diferentes combinações de isoformas de SUR e suas variações e $K_{ir}6.2$ ou $K_{ir}6.1$ podem ser responsáveis em parte pela diversidade molecular e funcional dos canais K^+_{ATP} (Miki *et al.*, 1999).

Os canais K^+_{ATP} são muito conhecidos como alvo da ação das sulfoniluréias, drogas muito usadas como hipoglicemiantes como foi descrito acima. As sulfoniluréias mais utilizadas como antagonistas (“fechadoras de canais”) são a glibenclamida (gliburida), a tolbutamida e a glipzida. Alguns agonistas (“abridores de canais”) utilizados são a cromakalina, a diazoxida e o pinacidil.

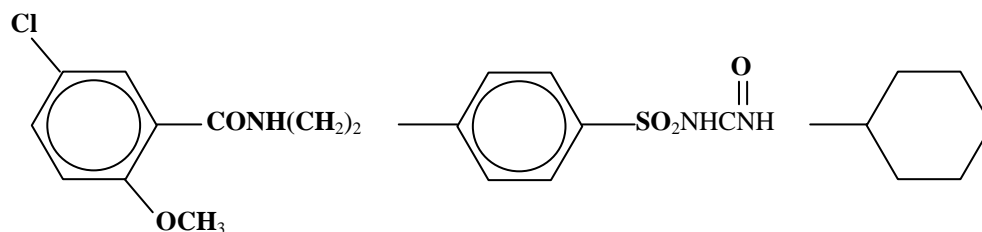


FIGURA I.11 FÓRMULA MOLECULAR DA GLIBENCLAMIDA. (HARDMAN *ET AL.*, 1996)

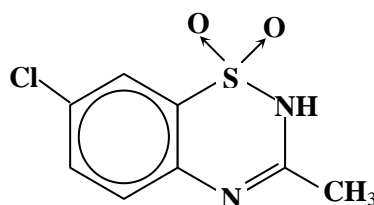


Figura I.12 FÓRMULA MOLECULAR DA DIAZOXIDA. (HARDMAN *ET AL.*, 1996)

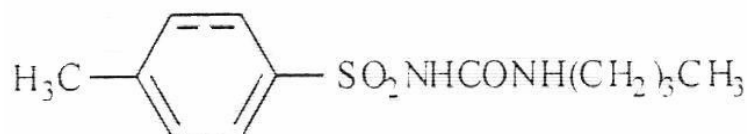


Figura I.13 FÓRMULA MOLECULAR DA TOLBUTAMIDA (KAKEI, 2003)

Há várias outras descrições de envolvimento de canais de K^+ na ação hormonal, como por exemplo, a investigação dos efeitos da melatonina sobre correntes de K^+ em cultura de células cerebelares de rato, onde se demonstrou a presença de um receptor funcional de melatonina e que a ativação desse receptor pode modular as correntes para fora de K^+ “*outward current*” ligando-se à uma proteína G sensível à toxina pertussis (Huan *et al.*, 2001). Em células foliculares

que circundam os oócitos de *Xenopus*, a aplicação tanto de FSH ou de adenosina sob “*voltage clamp*” induz uma corrente de K^+ . Essa corrente de K^+ se produz por um aumento de cAMP intracelular e é inibida por ATP. Essa inibição pode ser mediada por ativação da PKC sendo que o local de ação da PKC parece ser em algum ponto descendente na produção de cAMP envolvida na abertura dos canais de K^+ (Fujita *et al.*, 2001). $17\text{-}\beta$ estradiol provoca uma queda no potencial da membrana plasmática de osteoclastos isolados de ave. Esta queda se dá em segundos após a administração do estradiol e é bloqueada por ouabaína (bloqueador específico da Na^+K^+ ATPase) e por $BaCl_2$ (inibidor do canal de K^+ com retificação interna). Verapamil e cloreto de lantânio ($LaCl_3$), inibidores de canais para dentro de Ca^{2+} e 4'4-diisotiocianatostibene-2'2-ácido dissulfônico (DIDS), um inibidor de canais de Cl^- , não afetaram a despolarização. Os autores sugerem que o estrogênio regula osteoclastos através da atividade de canais iônicos (Brubaker e GAY., 1999). Em miócitos cardíacos, foi sugerido que o fechamento dos canais K^+_{ATP} pela glibenclamida leva a uma despolarização da membrana e conseqüente aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} através da ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (Kim *et al.*, 1997). Em túbulos seminíferos de testículos enriquecidos em células de Sertoli, a glibenclamida rapidamente estimula (20 segundos) a captação de Ca^{2+} através de canais do tipo L e produz alterações eletrofisiológicas na membrana de células de Sertoli, resultando numa despolarização prolongada (Miranda *et al.*, 1998).

von Lebedur e colaboradores (2002) descreveram que a glibenclamida produziu despolarização da membrana de células de Sertoli de ratos imaturos e aumentou sua resistência depois de uma latência de 1 minuto. A superfusão dos túbulos seminíferos com diazoxida em doses 250 e 400 μ M causaram uma

hiperpolarização do potencial de membrana das células de Sertoli. Esse efeito estava de acordo com o esperado para essa droga, uma vez que a abertura de canais de K^+ provocada pela diazoxida, leva a uma saída deste íon da célula direcionada pelo seu gradiente eletroquímico através da membrana. Com a saída de cargas positivas, o interior da célula torna-se mais negativo, o que se traduz numa hiperpolarização da membrana.

1. 7 FOSFOLIPÍDIOS DE MEMBRANA

Há cada vez mais evidências de que a membrana plasmática das células, não é apenas uma bicamada lipídica inerte, e os próprios lipídios são hoje participantes ativos da vida celular. As moléculas de lipídios constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas de células animais. Todas as moléculas de lipídios nas membranas celulares são *anfipáticas*. Os mais abundantes são os fosfolipídios, pequenas moléculas que são compostas principalmente por ácidos graxos, glicerol é uma porção polar.

Acredita-se que os lipídios existam em diferentes fases em bicamadas lipídicas modelo, incluindo gel, estado líquido ordenado e estado líquido desordenado, citados aqui em fluidez crescente. No estado gel, os lipídios estão semicongelados, na fase líquida ordenada, os fosfolipídios com cadeias de carbono saturadas, se agrupam firmemente com o colesterol, mas mesmo assim continuam móveis no plano da membrana, no estado líquido desordenado, toda a bicamada lipídica é fluída, como foi proposto pelo modelo de Singer-Nicholson.

Porém, tem sido difícil demonstrar que os lipídeos existem nessas diferentes fases no complexo meio ambiente celular.

Há mais de dez anos, surgiu a hipótese de balsas de lipídios (*'lipid rafts'*). Ela se originou de estudos sobre polaridade das células, e sua postulação central era a existência de grupamentos dinâmicos de colesterol e esfingolipídios na camada exoplasmática da bicamada lipídica, formando balsas de lipídios. A preponderância de cadeias de hidrocarbono saturadas em esfingolipídios celulares permite que o colesterol se intercale firmemente, numa organização semelhante à do estado líquido ordenado nos modelos de membrana. A membrana a volta das balsas de lipídeos é mais fluida, e consiste principalmente de fosfolipídios com cadeias laterais insaturadas e colesterol. Uma das mais importantes propriedades das balsas de lipídios, é que podem incluir ou excluir proteínas de maneira variável. O papel mais importante das balsas na superfície da célula pode ser sua função na transmissão de sinal (Simons e Toomre, 2000).

Atualmente acredita-se que as balsas de lipídios são estruturas especializadas da membrana plasmática, formando microdomínios que concentram uma variedade de moléculas sinalizadoras, incluindo receptores ligados à proteína-G, proteínas-G heterotriméricas e pequenas adenilil ciclase, proteína quinase C (PKC), óxido nítrico sintase, além de receptores individuais, ativados por ligação do agonista.

Têm sido propostas várias explicações para o significado da associação dessas moléculas sinalizadoras dentro dos microdomínios. Uma teoria é que servem como andaimes para o recrutamento de componentes de cascatas sinalizadoras, aumentando sua eficiência e ligando rapidamente os receptores a mais de um sistema sinalizador e assim, as interações em um microdomínio

desses poderia compartimentalizar, modular e integrar sinais na membrana plasmática. Uma teoria alternativa é de que essas estruturas podem manter as moléculas sinalizadoras em seu estado inativo, até que se tornem ativas para liberar a mensagem, ou podem atrair componentes sinalizadores para finalizar o sinal do receptor (Hur e Kim., 2002).

Uma característica convergente nos modelos existentes, é que balsas individuais se agrupam em '*clusters*' para conectar proteínas da balsa de modo a formar um complexo sinalizador. Podemos vislumbrar que segundos mensageiros como fosfoinositídeos ou de esfingolipídios, estimulados por esteróides como por exemplo a progesterona (Gosh., *et al.*, 1997) e a testosterona, poderiam influenciar no movimento e comportamento das balsas ou '*clusters*' de balsas, regulando a interação ('*cross-talk*') de diferentes cascatas sinalizadoras.

PIP₂ em quantidade é o menor constituinte de fosfolipídios da membrana plasmática, mas ele é o substrato chave da fosfolipase C (PLC) que catalisa a degradação de PIP₂ em DAG e IP₃. Os níveis de PIP₂ na membrana podem determinar a atividade dos canais de K⁺_{ATP}. (Kakei.,2003).

A cadeia de eventos que leva à hidrólise do PIP₂ inicia-se com a molécula sinalizadora a um receptor associado à proteína Gq na membrana plasmática. Esses fosfolipídios interagem com a terminação-C do Kir 6.2 causando a ativação do canal e reduzindo a sensibilidade ao ATP (Baukrowitz e Fakler., 2000).

Spiegel e colaboradores (1996), descreveram que a PLC com hidrólise de PIP₂ para geração de DAG fica dentro de três grupos: β,γ e δ. Todas as três isoformas da PLC são polipeptídios simples contendo duas regiões de alta

homologia, designada X e Y. Dois mecanismos tem sido descritos para a ativação da PLC: ativação PLC- β através de receptores serpentinicos mediado pela proteína-G, ou PLC- γ ligadas à receptores tirosina kinase . A ativação PLC- β ocorre via a ligação GTP com a subunidade α na proteína Gq ou via subunidade $\beta\gamma$.

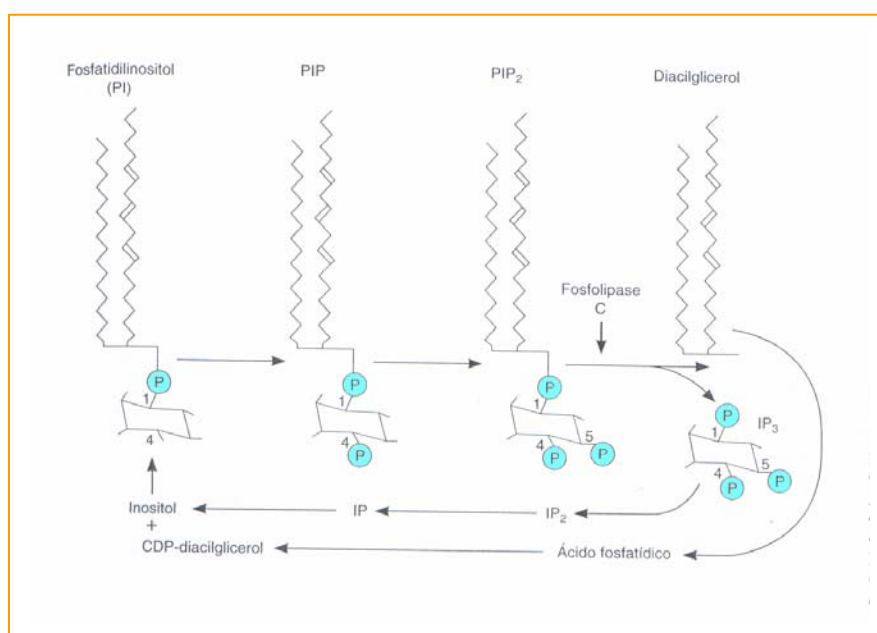


FIGURA I.14 METABOLISMO DOS FOSFATIDILINOSÍTOIS NAS MEMBRANAS CELULARES. O FOSFATIDILINOSÍTOIS É SUCESSIVAMENTE FOSFORILADO ATÉ FORMAR 4-FOSFATO DE FOSFATIDILINOSÍTOIS (PIP) E, 4,5-DIFOSFATO DE FOSFATIDILINOSÍTOIS (PIP₂). (MODIFICADO DE BERRIDGE.,1984).

Os canais K_{ir} podem interagir diretamente com PIP₂. Os efeitos de PIP₂ na atividade dos canais de K^+ retificadores de influxo ligados a proteína-G, (KRIG) são diretos e não são minimizados por produtos da hidrólise de PIP₂. Kobrinsky e colaboradores (2000); demonstraram em células cardíacas que a hidrólise de PIP₂

resulta na dessensibilização da corrente de potássio estimulada pela proteína ligada ao GTP. Dois caminhos regulados por receptores na membrana plasmática interagem nos níveis desses canais para modular a corrente de potássio: 1) Estimulatório, sinalizando através das subunidades $G\beta\gamma$, que interage diretamente com o canal. Para estabilizar as interações com PIP_2 levando à ativação do canal. 2). Inibitório, Ativando PLC para hidrólise do PIP_2 que limita a estimulação da atividade por $G\beta\gamma$.

O efeito dos PIPs na inibição do ATP envolve um mecanismo eletrostático porque a negatividade da carga do grupo fosfato pode ser crítica para o efeito do fosfolípido na inibição do ATP. PIP_3 e PIP_2 são mais eficientes, reduzindo a inibição do ATP. Entretanto, fosfatidil-4-fosfato (PIP) é menos potente e fosfatidilinositol (PI) não tem efeito. (Kakei.,2003; Baukrowitz *et al.*,1998). Os polycations como Ca^{2+} , La^{3+} , polilisina, poliaminas, e neomicina; neutralizam as cargas negativas dos fosfolípidios, anulando o efeito dos PIPs na inibição do ATP (Shyng e Nichols., 1998; Deutsch e Matsuoka.,1994).

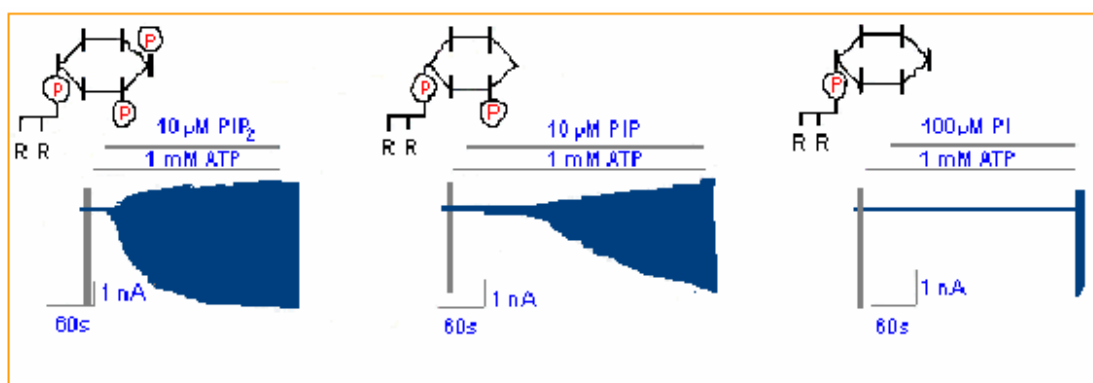


FIGURA 1.15 EFEITO DOS FOSFOLÍPIDIOS NOS CANAIS DE K^+_{ATP} . ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE FOSFOLÍPIDIOS PARA VISUALIZAR O RELACIONAMENTO ENTRE O NÚMERO DO GRUPO FOSFATO (P) DO INOSITOL E A POTÊNCIA DOS FOSFOLÍPIDIOS, (R) SÃO ÁCIDOS GRAXOS.

ALTAS CONCENTRAÇÕES DE PIP_2 E PIP ATUANDO NA UNIDADE $KIR6.2$ DO CANAL INSENSIBILIZADO AO ATP, MANTENDO-O ABERTO, PRODUZINDO HIPERPOLARIZAÇÃO PELA SAÍDA DE K^+ . (MODIFICADO DE BAUKROWITZ *ET AL.*, 1998).

I. 8 PRINCÍPIOS GERAIS SOBRE REGISTROS INTRACELULARES

A membrana celular adquire suas propriedades elétricas de seus lipídios e proteínas, como os canais iônicos e transportadores. Existe uma *diferença de potencial elétrico* entre o interior e o exterior das células. Um objeto carregado (íon) ganha e perde energia conforme se move entre lugares de diferentes potenciais elétricos, da mesma maneira que um objeto com massa se move 'para cima' e 'para baixo' entre pontos com potencial gravitacional diferentes. Diferenças de potencial elétrico são normalmente denominadas como V ou ΔV e medidas em *volts* (V), por isso, potencial também é chamado de *voltagem*. A diferença de potencial através da célula relaciona o potencial entre o interior da célula e o da solução externa. O potencial da solução externa convencionou-se ser zero. Em outras palavras, o potencial de membrana (E_M), é definido como o potencial dentro da célula menos o potencial fora da célula.

Diferenças de potencial entre dois pontos separados por um isolante são maiores do que as diferenças entre esses pontos separados por um condutor. Assim, a membrana lipídica, que é um bom isolante, tem uma diferença de potencial através dela. Essa diferença de potencial (potencial transmembrana) é menor do que 0.1V, normalmente fica em torno de 30 a 90mV em células animais. As soluções ricas em sais do citoplasma e do sangue são condutores bastante eficientes, e, portanto no equilíbrio, normalmente há apenas diferenças de

potencial muito pequenas (raramente mais de poucos milivolts) entre quaisquer dois pontos dentro do citoplasma de uma célula ou dentro da solução extracelular.

Equipamentos eletrofisiológicos possibilitam que sejam medidas diferenças de potencial (voltagem) em sistemas biológicos. Potenciais de membrana podem ser medidos com microeletrodos de vidro, que são feitos de tubos capilares estirados para terem uma ponta muito fina e preenchidos com uma solução salina concentrada. Esse microeletrodo é conectado por um fio ao amplificador, assim como, um fio de cloreto de prata também chega ao amplificador. Essa combinação de microeletrodo, fio de cloreto de prata e amplificador é uma ferramenta muito sensível para medir potenciais na região externa imediatamente adjacente à ponta do microeletrodo. Na prática, o amplificador é zerado com o fio de cloreto de prata e o microeletrodo fora da célula, ambos na mesma solução do banho, e então o microeletrodo é direcionado até que subitamente penetra através da membrana plasmática. Imediatamente o amplificador relata uma mudança negativa no potencial medido. Esse é o potencial de repouso da célula. Valores típicos ficam entre -40 e -100mV (Hille.,1992).

Equipamentos eletrofisiológicos também podem medir corrente, que é o fluxo de cargas elétricas passando por um ponto por unidade de tempo. *Corrente* (I) é medida em *ampères* (A). Normalmente as correntes medidas por equipamentos eletrofisiológicos variam entre picoampères (pA) e microampères (μA). Correntes fluem através de resistores e condutores. Os dois termos de fato são complementares, o primeiro indica as barreiras ao fluxo de corrente e o segundo indica os caminhos para a corrente. Em termos quantitativos a resistência R (unidade: ohms (Ω)) é o inverso da condutância G (unidade:

siemens (S)). Condutâncias lado a lado, ou seja, em paralelo, se somam (Sherman-Gold., 1993).

Para eletrofisiologia, talvez a lei da eletricidade mais importante é a lei de Ohm que diz que a corrente (I) é igual ao produto da diferença de voltagem através do condutor (ΔV) e da condutância (G).

$$I = \Delta V \times G \quad \text{ou em termos de resistência:}$$

$$I = \Delta V / R$$

Alternativamente, a diferença de potencial (ΔV) entre dois pontos ligados por uma resistência R e uma corrente I é:

$$\Delta V = I \times R \quad \text{ou em termos de condutância:}$$

$$\Delta V = I / G$$

II. OBJETIVOS

O estudo da transmissão de sinal procura essencialmente explicar o comportamento celular elucidando os eventos moleculares pelos quais sinais extracelulares promovem uma resposta intracelular. Não há dúvidas de que a transmissão efetiva e bem regulada desses sinais é crucial para o comportamento celular normal.

O nosso trabalho teve como objetivo geral, investigar a ação da testosterona em células de Sertoli de ratos imaturos avaliando o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} e o conseqüente efeito nos canais de Ca^{2+} , através da técnica de registro intracelular. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1- Verificar o efeito da testosterona ligada à albumina (T-BSA) para verificar se o efeito da testosterona é exclusivo de membrana.
- 2- Comparar o efeito da testosterona com o efeito da glibenclamida e tolbutamida, sulfoniluréias conhecidas como bloqueadores dos canais de K^+_{ATP}
- 3- Observar o efeito dos policátions como $LaCl_3$ e espermina sobre o potencial de membrana
- 4- Verificar o efeito do quelante de Ca^{2+} , EGTA sobre o potencial de membrana. E se a testosterona produz seu efeito na presença do quelante.

- 5- Observar o envolvimento da PCL na ação da testosterona utilizando o inibidor da PLC o U73122.
- 6- Observar o envolvimento da proteína-G na resposta da testosterona.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1 MATERIAIS

III. 1.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos com idade entre 14-16 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 com no máximo 8 filhotes em gaiolas individuais onde recebiam ração Purina, Nutripal (Porto Alegre -RS) e água “*ad libitum*”, com iluminação controlada em ciclos de 12horas e a temperatura controlada a aproximadamente 24C.

III. 1.2 SOLUÇÕES

III. 1.2.1 TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRb)

Foi utilizado 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 feita a partir de soluções estoques conforme tabela III.1.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final no KRb (mM)
	(g/L)	(M)	
NaCl CLORETO DE SÓDIO	180,00	3,08	118
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 SULFATO DE MAGNÉSIO	7,64	0,031	1,2
CaCl₂.2H₂O CLORETO DE CÁLCIO	9,60	0,065	2,5
C₆H₁₂O₆ GLICOSE	25,00	0,14	5,5

TABELA III.1 COMPOSIÇÃO SALINA E CONCENTRAÇÕES PRESENTES NAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE KRb E NA SOLUÇÃO FINAL.

Para o preparo do KRb, foram misturados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio. A solução era então avolumada com água destilada até o volume desejado, de modo a obterem-se as concentrações finais descritas na tabela III-1. A solução era então gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4. A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

III. 1.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Testosterona, Testosterona BSA, EGTA e espermina foram obtidas da (*Sigma-Aldrich Co*, St. Louis, MO, USA). As sulfoniluréias: glibenclamida e tolbutamida; e os agonistas dos canais de K_{ATP} foram adquiridos da (*Biochemical Internacional*, Natick, MA, USA. F-12 (HAMO (1:1)) (D-MEM/ F-12) adquiridos da (*Gibco BRL Life technology Rockville MD. USA*). A *Toxina Pertussis* foi adquirida da (*List Biological Laboratories, Inc*, Campbell, CA, USA) e U73122 foi adquirido da (*Biomol Reserch Labs, Inc. Plymont, PAS, USA*).

III. 2 MÉTODOS

III. 2.1 ELETROFISIOLOGIA

III. 2.1.1 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 esticado com duas pinças de maneira a isolar 4 a 8 túbulos seminíferos. Estes eram 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 (figura III.1).

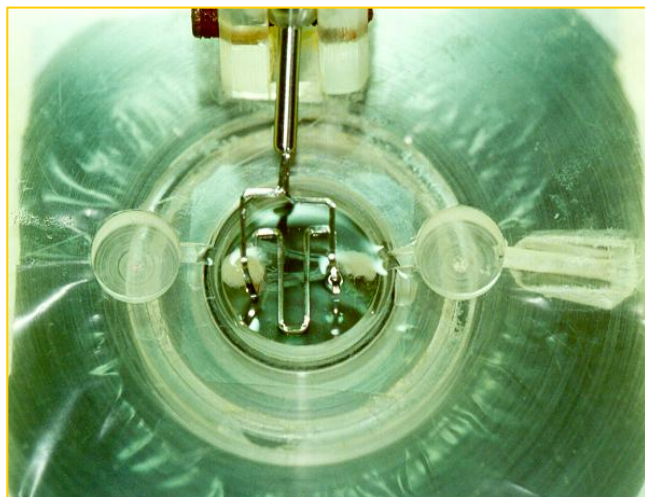


FIGURA III.1 CÂMARA DE PERFUSÃO COM TÚBULOS SEMINÍFEROS FIXADOS AO FUNDO.

Todo o KRb utilizado nos experimentos de eletrofisiologia foi glicosado e foi 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 36°C e chegava na câmara de perfusão em 32°C. O pH foi mantido em 7.4 com carbogênio 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 se estabilizando antes do início dos registros. Após esse período, uma célula de Sertoli era empalada com uma micropipeta de vidro, sob controle visual.

III. 2.1.2 PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO

Para o registro intracelular foram utilizados microeletrodos, feitos a partir de uma micropipeta de vidro de borossilicato com diâmetro externo de 1,2mm, com filamento interno, que facilita seu posterior preenchimento (*World Precision Instruments, Inc., USA*). A ponta das micropipetas foi estirada para possibilitar o empalamento, num estirador de pipetas vertical (*David Kopf Instruments, Tujunga, California - 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 microeletrodio para o empalamento de células de Sertoli é de 15 a 25 megaohms ($M\Omega$) (von Lebedur *et al.*, 2002). A fim de obterem-se resultados reproduzíveis 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 preenchidas com solução KCl 3M e conectadas a um “holder” (eletrodo de prata cloretado), que também foi preenchido com o mesmo KCl 3M e fazia 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 eletrodio para aproximação das células e empalamento era feita por um micromanipulador mecânico (Narishige-Japão), capaz de movimentos grossos (macro) e finos (micro) 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 consistia de um fio de prata cloretado (Ag/AgCl). A cloretação era feita diariamente antes do início do experimento, limpando-se o fio de prata com esponja de aço e então o mergulhando em água sanitária 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 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 podermos visualizar somente o potencial de membrana.

III. 2.1.3 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 nele e num osciloscópio (*Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210*). Os traçados observados no osciloscópio eram armazenados num 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 eletrodos estavam em líquido extracelular, ou colocava-se próximo de zero no eletrodo e no microscópio, 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 0,5nA na célula. 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 eletrômetro apresenta uma resistência de 20×10^6 ohms, que serve para reduzir a corrente que vai entrar na célula a níveis suportáveis.

Quando uma célula era empalada, se esperava que seu potencial de membrana e sua resistência de membrana permanecessem estáveis por no mínimo 3 minutos, estes eram registrados, e só então os agentes a serem investigados eram aplicados. Para evitar trabalhar com células germinativas, se utilizou 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 Sce (Wasserman *et al.*, 1992).

A resistência da membrana foi medida de acordo com Wassermann e colaboradores (1992). Os esteróides T-BSA e a testosterona assim como, tolbutamida, espermina, espermina e LaCl_3 foram aplicados topicamente no banho com pipeta automática após a estabilização do potencial de membrana por aproximadamente 2 minutos. Soluções de Ca^{2+} com EGTA e/ou U73122 foram perfundido nas células por 3 minutos, após foi aplicado topicamente testosterona ou LaCl_3 . Os testículos foram pré-incubados em D-MEM/F-12 com 1 $\mu\text{g/ml}$ de *toxina pertussis* por 3 horas antes do registro do potencial de membrana. Este tratamento foi repetido em diferentes células, e a variação do potencial e da resistência da membrana foi registrada.

A testosterona e o U73122 foram diluídas em etanol e adicionado à preparação para obter-se as concentrações finais desejadas. A solução final continha no máximo 0,1% de etanol.

III. 2.1.4 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:

$$I = V/R \Rightarrow \boxed{V = I \times R}$$

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

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

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

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

III. 2.1.5 CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA

Para calcula a resistência da membrana (R_m), utilizou-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I = V/R \Rightarrow \boxed{R = V/I}$$

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

A voltagem registrada no osciloscópio corresponde às “franjas” obtidas no traçado do potencial da célula em decorrência do pulso de corrente aplicado, e seu valor era obtido medindo-se essas franjas. O pulso de corrente aplicado era de 0,5nA.

III. 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o Teste-T pareado ou ANOVA seguido do pós-teste, usando 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. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1 PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS BASAIS DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Com o objetivo de obter medidas dos potenciais intracelulares, os túbulos seminíferos foram diretamente observados ao microscópio invertido, empaladas com um microeletrodo de registro conforme descrito no método experimental, e o potencial de repouso (E_m) visualizado na tela do osciloscópio e no eletrômetro. A tabela IV.1 mostra a média dos potenciais de repouso para 136 células empaladas.

A fim de determinar os valores das resistências para cada célula pulsos de corrente de 0.5nA, 0.5Hz e 250ms de duração foram aplicados pelo estimulador de pulso quadrado. Através da aplicação da Lei de Ohm as resistências foram calculadas, a média obtida está na tabela IV.1 e uma célula modelo esta representada na figura IV.1.

	Média \pm EP	n ^o de células empaladas
E_m (mV)	-47.2 \pm 0.8	136
R (M Ω)	12.7 \pm 1.3	136

TABELA IV.1 POTENCIAL DE REPOUSO (E_m) E RESISTÊNCIA ELÉTRICA (R) DAS CÉLULAS DE SERTOLI.

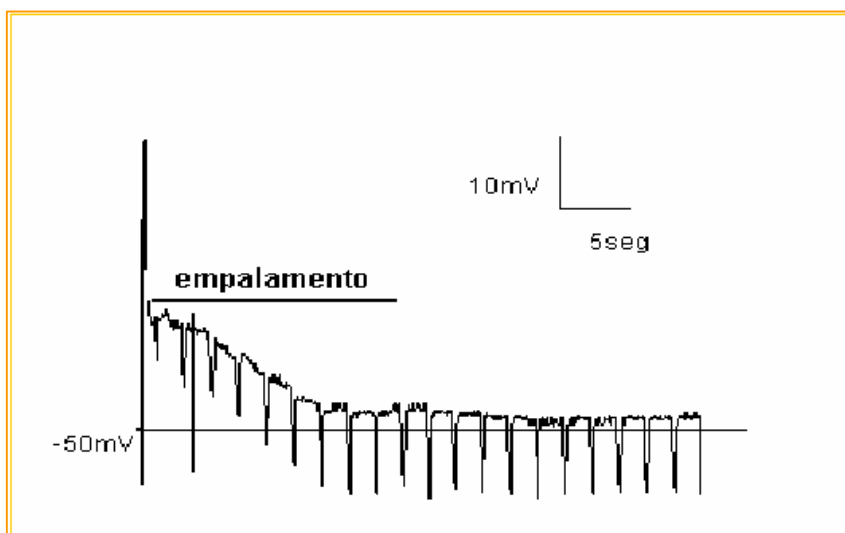


FIGURA IV.1 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DE UMA CÉLULA DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULO DE RATO IMATURO. COMPORTAMENTO DE UMA CÉLULA DE SERTOLI COM $E_m = -48\text{mV}$ EM CONDIÇÕES BASAIS E PULSOS DE CORRENTE HIPERPOLARIZANTE (0.5nA , 0.5Hz , 250ms DURAÇÃO). FLUXO DA SOLUÇÃO = $1\text{mL}/\text{MIN}$.

IV.2 EFEITO DO KRb NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Antes da realização dos experimentos, KRb foi adicionado às preparações como controle. Constatou-se que nenhuma modificação foi produzida nos parâmetros elétricos basais das células de Sertoli. Resposta típica da aplicação tópica de KRb em uma célula de Sertoli (Fig.IV.2). O etanol utilizado na diluição de maior concentração de testosterona não produziu efeito sobre o potencial de membrana (Leite *et al.*, 1999).

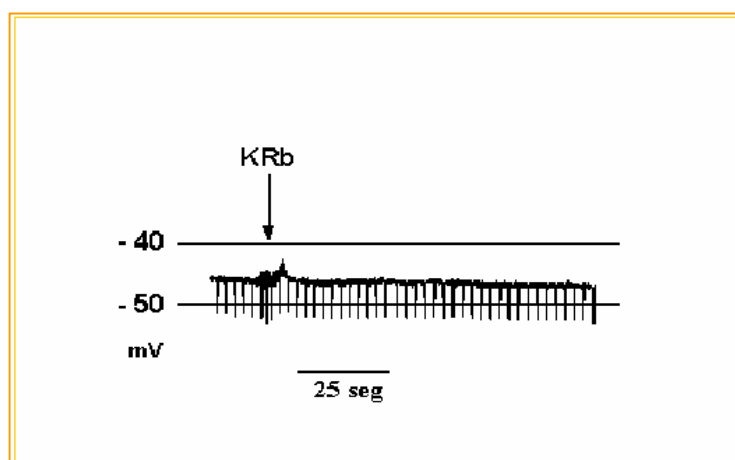


FIGURA IV.2 EFEITO DA APLICAÇÃO DE KRb NO POTENCIAL DE REPOUSO DA CÉLULA DE SERTOLI.

IV.3 EFEITO DA TESTOSTERONA-BSA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

A aplicação tópica da testosterona ligada à Albumina Serica Bovina (BSA) produziu uma despolarização no potencial de membrana, com menor intensidade que a despolarização ocorrida com a aplicação da testosterona livre, ver(Fig. I.6) na introdução e as (Fig. IV.3A e B).

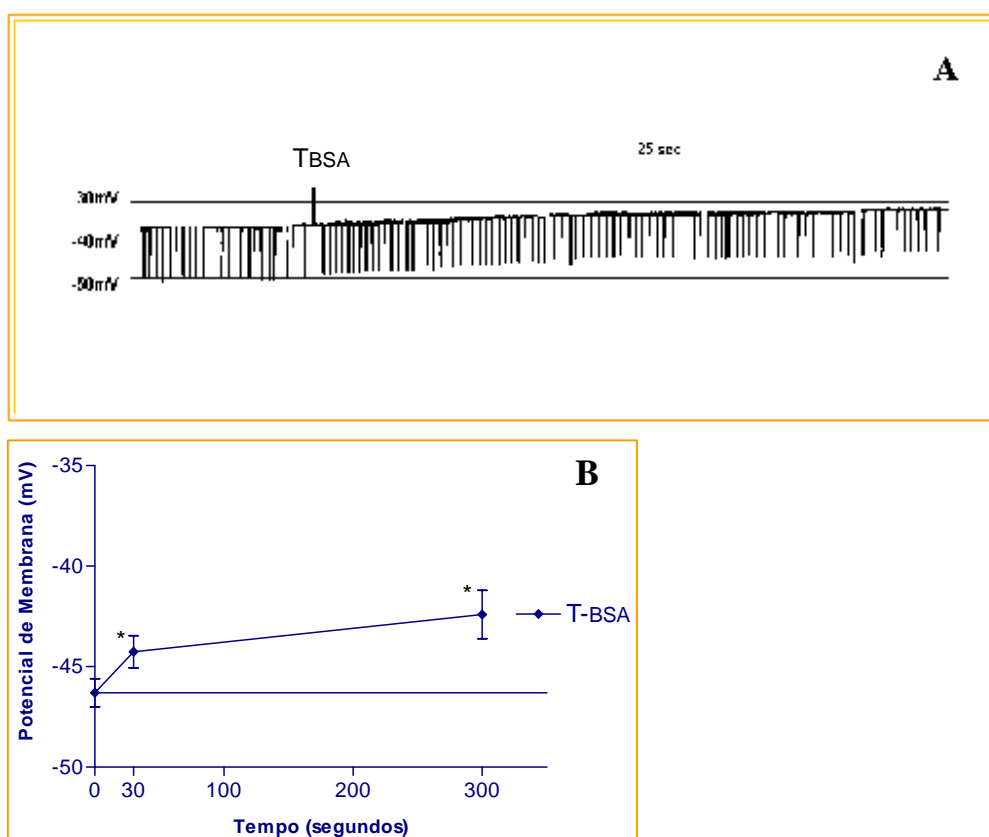


FIGURA IV.3 RESPOSTA TÍPICA DA APLICAÇÃO DA T-BSA 10µM DE T(A). AÇÃO DA T-BSA SOBRE O POTENCIAL DE REPOUSO. PM = -46.3 ± 0.7 , APÓS 30 SEGUNDOS DA APLICAÇÃO DE T-BSA = -44.4 ± 0.8 ; APÓS 300 SEGUNDOS = -42.4 ± 1.2 (B). (N=10). FOI FEITO TESTE-T PAREADO E COMPARADO COM OS VALORES DE REPOUSO.* A DIFERENÇA FOI SIGNIFICATIVA (P< 0.05).

IV.4 EFEITO COMPARATIVO DA APLICAÇÃO DE GLIBENCLAMIDA, TOLBUTAMIDA E TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO E DA RESISTÊNCIA NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

O efeito despolarizante da testosterona e glibenclamida, foi também observado com a tolbutamida (Fig. IV.4A). Este efeito foi associado com o aumento da resistência da membrana (Fig. IV.4B).

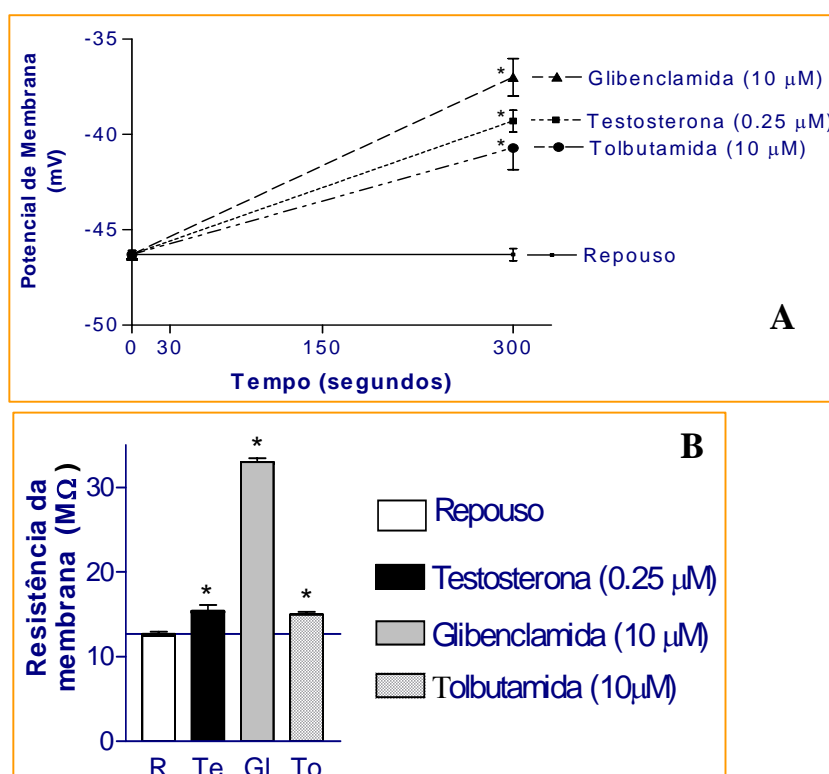


FIGURA IV.4 EFEITO DA APLICAÇÃO DE TOLBUTAMIDA (10μM), DE GLIBENCLAMIDA (10μM) E DE TESTOSTERONA (0,25μM), SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DA CÉLULA DE SERTOLI (A). EFEITO DAS MESMAS SUBSTÂNCIAS NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA (B). (MEANS±SEM,N=6). FOI FEITO TESTE-T PAREADO E COMPARADO COM OS VALORES DE REPOUSO * A DIFERENÇA FOI SIGNIFICATIVA (P<0.05).

IV.5 EFEITO DA ESPERMINA NO POTENCIAL DE REPOUSO E NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

A aplicação tópica sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 15 dias na presença da espermina produziu uma despolarização significativa nos 30 segundos (Fig. IV.5A) e um aumento na resistência da membrana (Fig. IV.5B).

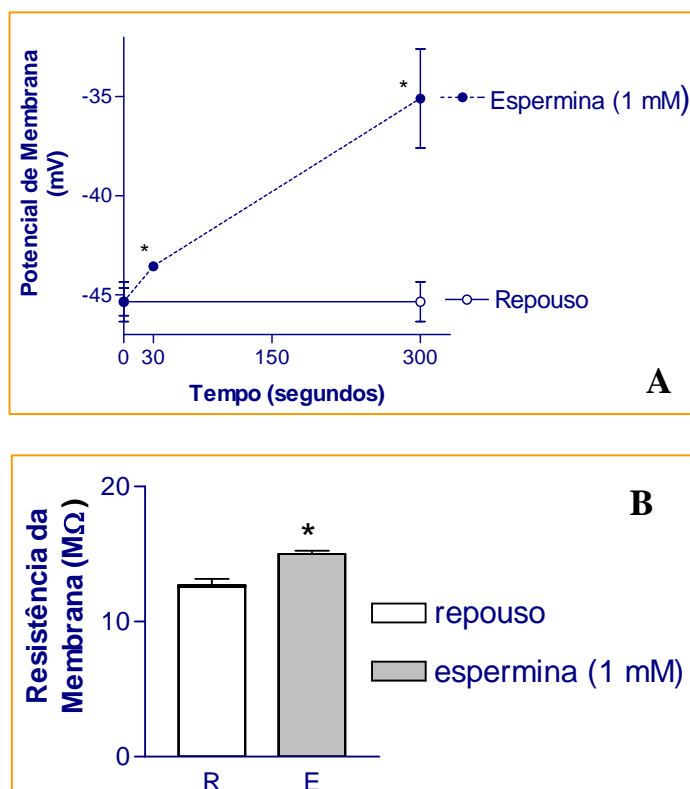


FIGURA IV.5 EFEITO DA APLICAÇÃO DE 1MM DE ESPERMINA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA EM CÉLULAS DE SERTOLI (A). EFEITO DA ESPERMINA SOBRE A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA (B). RESULTADOS ANALIZADOS EM TEST-T PAREADO E COMPARADO COM O GRUPO CONTROLE. *A DIFERENÇA FOI SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$). (MEANS \pm SEM, N=4)

IV.6 EFEITO DO EGTA NO POTENCIAL DE REPOUSO E NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Na ausência, no meio extracelular, do íon Ca^{2+} , o quelante EGTA na perfusão produziu uma hiperpolarização no potencial de membrana (Fig. IV.6A) com redução da resistência da membrana (Fig. IV.6B). A aplicação tópica do LaCl_3 reverteu o efeito do EGTA despolarizando o potencial de membrana (Fig. IV.6C).

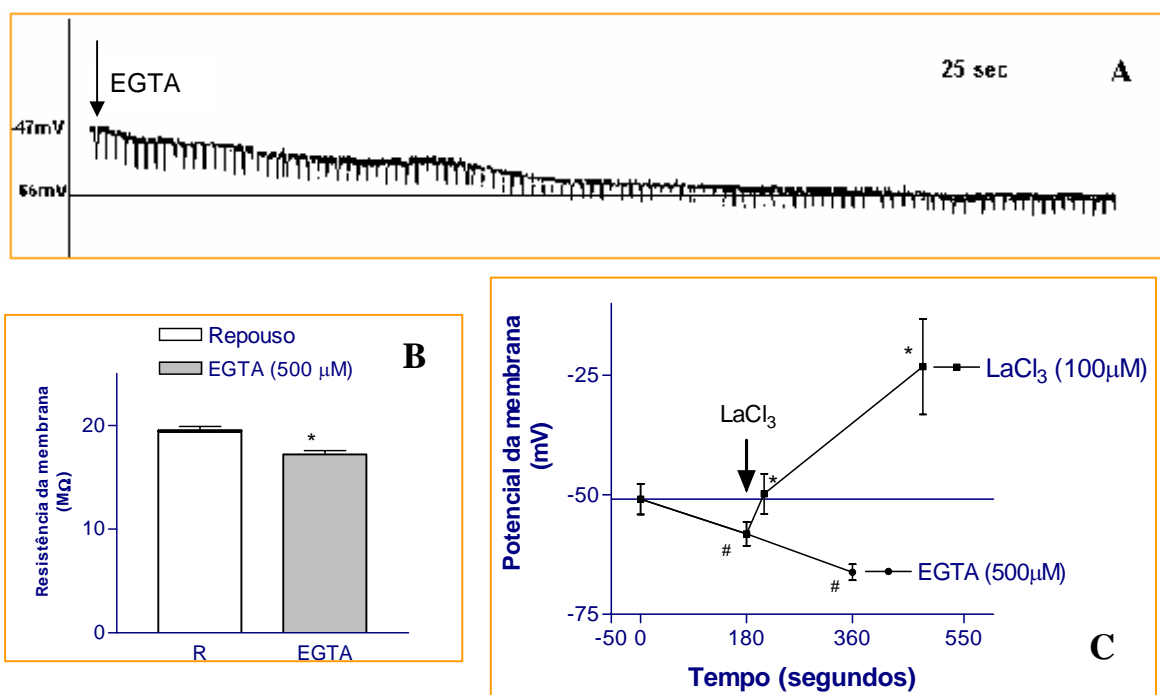


FIGURA IV.6 EFEITO HIPERPOLARIZANTE NA MEMBRANA PRODUZIDO PELO EGTA (500 μM) EM UMA CÉLULA DE SERTOLI DE -47mV (A). EFEITO DO EGTA NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA (B). EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE LaCl_3 (100 μM), EM CÉLULAS DE SERTOLI PRÉ-TRATADA COM EGTA (C). OS DADOS FORAM AVALIADOS UTILIZANDO TEST-T PAREADO SENDO SIGNIFICATIVO QUANDO COMPARADO COM O EGTA * ($P < 0,05$), E QUANDO COMPARADO COM O REPOUSO # ($P < 0,05$). ESTE TESTE FOI SEGUIDO PELA ANALISE ANOVA SEGUIDA DE TESTE DE BONFERRONI. (MEANS \pm SEM, N=6).

IV.7 EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA SOBRE A HIPERPOLARIZAÇÃO PRODUZIDA PELO EGTA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

A aplicação da testosterona na concentração fisiológica intratesticular de 0,3 μM reverteu a hiperpolarização produzida pelo EGTA, produzindo uma pequena despolarização nas diferentes concentrações testadas.

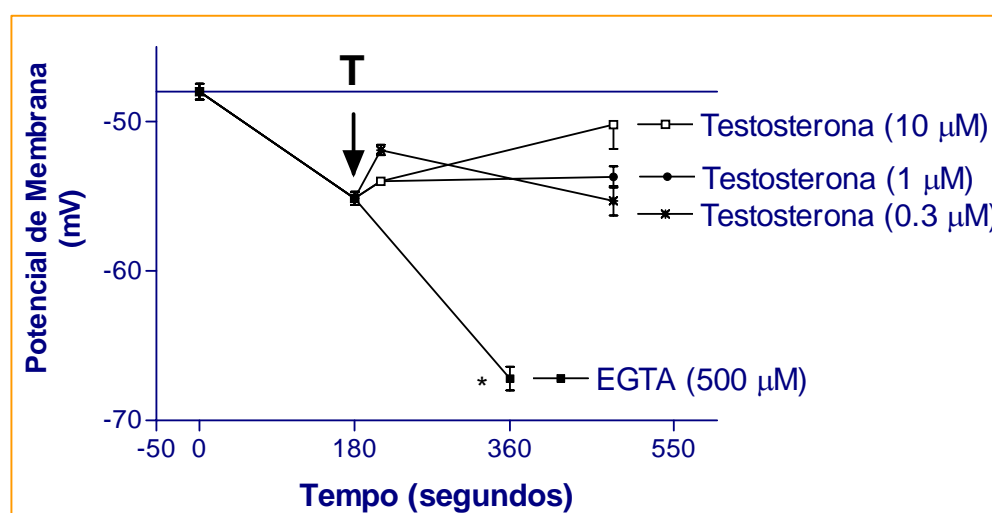
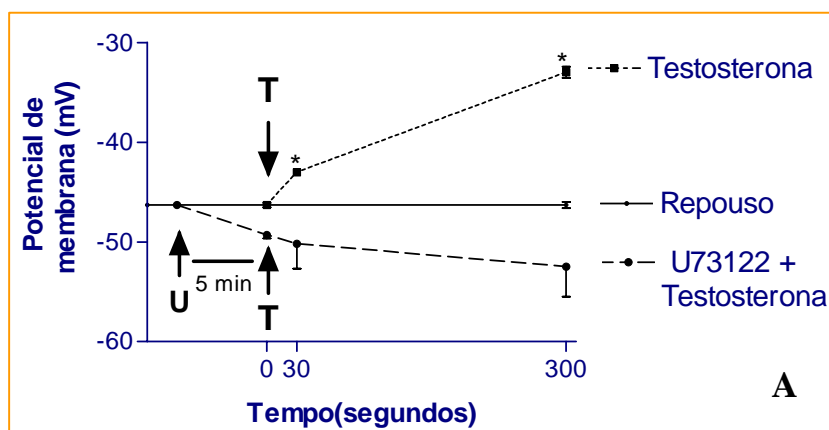


FIGURA IV.7 EFEITO DAS DOSES DE TESTOSTERONA (0,3 μM , 1 μM , 10 μM) SOBRE A HIPERPOLARIZAÇÃO PRODUZIDA PELO EGTA. OS RESULTADOS FORAM AVALIADOS EM TEST-T PAREADO E COMPARADO COM OS GRUPOS COM TESTOSTERONA ATRAVÉS DA ANÁLISE VIA ANOVA SEGUIDO DE TESTE DE BONFERRONI. * SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$). (MEANS \pm SEM, N=6).

IV.8 EFEITO DO U73122 NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

A ação O U73122 exerceu efeito inibitório sobre a despolarização produzida pela testosterona (Fig. IV.8 A) e sobre a variação da resistência da membrana de células de Sertoli (Fig. IV.8B) A ação da testosterona de reverter a hiperpolarização produzida pelo EGTA (Fig. IV.7) também foi anula pela presença do inibidor da PLC, o U73122 na perfusão (Fig. IV.8C).



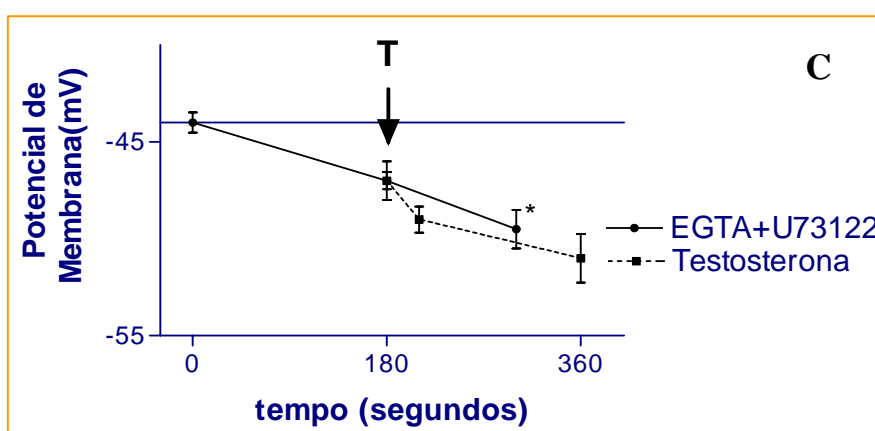
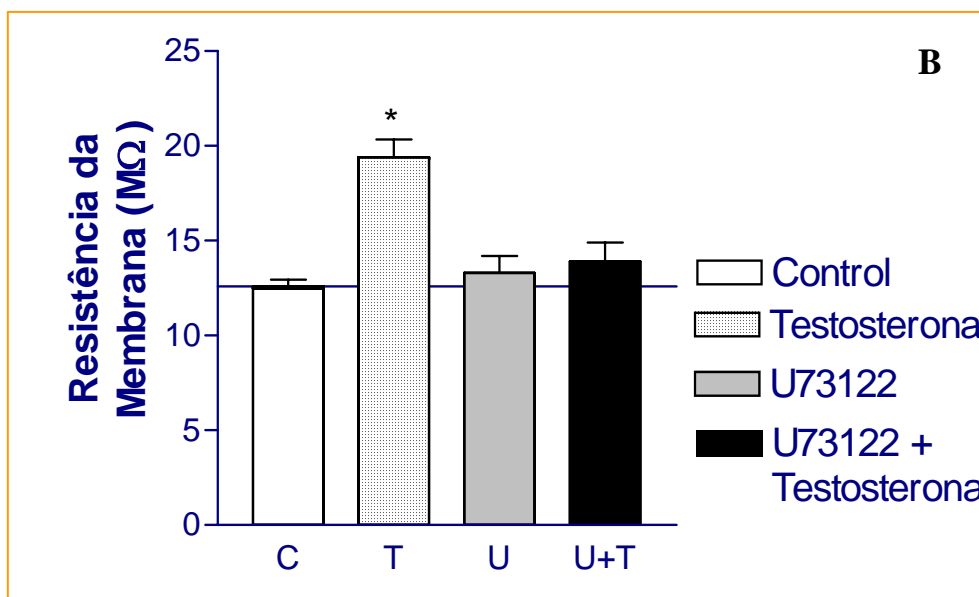


FIGURA IV.8 EFEITO DO U73122 ($2\mu\text{M}$) SOBRE A AÇÃO DA TESTOSTERONA ($10\mu\text{M}$) NO POTENCIAL DE MEMBRANA (A), NA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA (B), E EM CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM EGTA (C). OS VALORES FORAM AVALIADOS EM TEST-T PAREADO E COMPARADO COM OS VALORES DE REPOUSO. *CONSIDERADOS SIGNIFICATIVOS ($P < 0.05$)(B) (MEANS \pm SEM, N=5).

V. DISCUSSÃO

A função primordial da célula de Sertoli é criar um ambiente apropriado para o desenvolvimento das células germinativas. Para desempenhar sua função, esta célula está sob o comando de vários hormônios, fatores de crescimento, vitaminas e proteínas, elas mantêm uma sinalização neuro-endócrina e uma inter-relação muito estreita com as células de Leydig, as peritubulares e as germinativas (Skinner.,1991). Para que os efeitos moleculares e celulares da estimulação de hormônios e outras substâncias sejam esclarecidos, é importante definir os mecanismos de sinalização através dos quais eles atuam e interagem.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a ação da testosterona sob o potencial de membrana, em células de Sertoli de ratos imaturos avaliando o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} e a possível via de ativação ligada a fosfolipase C (PCL) através da técnica de registro intracelular. Para tanto foram utilizados túbulos seminíferos de testículos inteiros, e foi observado o registro elétrico intracelular, que se vale dos gradientes iônicos e elétricos, através da superfície da membrana, para estudar as variações provocadas pelo hormônio sobre o potencial de repouso e a resistência da célula.

Com a utilização da técnica de registro intracelular foram obtidos alguns dados eletrofisiológicos básicos para as células de Sertoli. Observamos, com o

empalamento de 136 células, um potencial de membrana com média de -47.2 ± 0.8 mV (n=136).

A determinação dos valores de resistência celular é importante pois representa uma maneira adicional de verificar os efeitos de hormônios no movimento de íons através de seus canais. O método de estudo usual consiste em determinar a resistência basal da célula empalada e então medir a resistência da mesma célula após a aplicação de alguma substância. Dessa forma, verificamos se a substância adicionada evocava um aumento ou redução na resistência basal. A resistência basal da membrana encontrada em 136 células empaladas foi de 12.7 ± 1.3 M Ω (n=136).

Os valores de resistência basal encontrados no presente trabalho em túbulos normais são mais baixos que os encontrados em túbulos SCE (Wassermann *et al.*,1992; Loss *et al.*,1998). Resultados semelhantes foram encontrados por Eusebi e colaboradores (1983). Essa resistência baixa é uma evidência do acoplamento elétrico existente entre as células de Sertoli no túbulo seminífero, e o fato dela ser menor em túbulos normais do que SCE, é uma indicação de que exista também o acoplamento elétrico entre células de Sertoli e células germinativas (Eusebi *et al.*,1983). Por este motivo usamos túbulos seminíferos inteiros no presente trabalho, num esforço de preservar as junções do tipo “gap” das células de Sertoli imaturas. Desta forma, o meio ambiente das células nos túbulos foi mantido o mais próximo possível de sua integridade funcional.

Com a finalidade de descartar qualquer artefato ou interferência devidos à utilização dos equipamentos eletrofisiológicos, antes de adição do hormônio e dos agonistas e antagonistas, um registro basal era obtido. Para certificarmos que o efeito constatado pelo uso de determinada substância era inerente à mesma, antes de cada experimento KRb era adicionado à preparação como controle. Observava-se apenas uma interferência no sinal devido à presença da mão do experimentador dentro da gaiola de Faraday durante a aplicação (Fig. IV.1).

Yamada (1979) observou, em ratos adultos que aplicações eletroforéticas de testosterona em neurônios individuais no hipotálamo anterior e no núcleo septal, resultaram em um aumento da frequência de disparos com uma latência na resposta de 2-30 segundos. Os resultados de Koenig e colaboradores (1989), demonstraram que concentrações fisiológicas de testosterona (1-10nM) estimulam o transporte de aminoácidos, excitação e o transporte de hexose em córtex renal de ratos. Esta ação rápida representa uma resposta específica e direta da testosterona na superfície das células. Usando aplicações microiontoforéticas, Orsini e colaboradores (1985) observaram, que a testosterona aumenta, dentro de segundos, a frequência de pulsos de mais da metade dos neurônios testados no hipotálamo lateral de rato. Koenig e colaboradores (1989) demonstraram que em miócitos cardíacos, concentrações nanomolares de testosterona induzem, em menos de minutos a atividade da ornitina descarboxilase (ODC) e o aumento da concentração de poliaminas (espermina e espermidina), assim como, em 30-60 segundos, a estimulação do fluxo de Ca^{2+} e de transporte na membrana

dependente Ca^{2+} (exocitoses, transporte de amino ácido e hexoses). Lieberherr e Grosse (1994) demonstraram que, em osteoblastos de ratos, a testosterona aumenta o cálcio intracelular em 5 segundos via influxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) e via Ca^{2+} mobilizado do retículo endoplasmático. Os resultados de Benten e colaboradores (1999), em células-T de camundongos, nas quais não foi demonstrada a presença do receptor funcional de andrógenos clássico, forneceram evidências experimentais para a presença de locais de '*binding*' de receptores funcionais de testosterona ligados funcionalmente à canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Recentemente, Kampa e colaboradores (2003) reportaram a existência de receptores de membrana para testosterona em células de câncer da próstata humana (LNCaP). A ativação desses receptores resulta em uma reorganização do citoesqueleto e aumenta a secreção do antígeno específico prostático (PSA).

Benten e colaboradores (1999) descreveram, a presença de receptores para testosterona na membrana das células-T. Sítios de ligação para testosterona foram localizados na membrana plasmática das células-T intactas usando a testosterona-BSA. Papakonstanti e colaboradores (2003) analisaram a fosforilação e a ativação da quinase de adesão focal (FAK), após uma incubação de 10 minutos das células com testosterona-BSA, a testosterona-BSA induziu a um aumento significativo na fosforilação da FAK, associação e ativação da FAK com PI-3 quinase. Estrada e colaboradores (2003) descreveram que em células do músculo esquelético a testosterona ou nandrolona produziram em menos (<1min) um aumento de Ca^{2+} intracelular. O aumento do Ca^{2+} também foi induzido por T-BSA em miotubulos e esta resposta foi similar à obtida com o hormônio livre,

sugerindo que o aumento do Ca^{2+} intracelular e um caminho comum para a ação dos androgênios nas células do músculo esquelético e que o IP_3 está envolvido na liberação do cálcio intracelular induzido por androgênios.

Gorczińska e Handelsman (1995), observaram que a testosterona e seu metabólito dihidrotestosterona aumentavam rapidamente a concentração de cálcio intracelular em células de Sertoli isoladas de ratos com idade entre 17 e 20 dias, eles sugeriram que a testosterona pode exercer seus efeitos através da membrana plasmática implicando em um efeito não genômico, agudo e de curta duração. Lyng e colaboradores (2000); demonstraram que células de Sertoli de fragmentos tubulares de cultura de ratos de 20 dias de idade, respondem para testosterona exógena, seu análogo R1881, e dihidrotestosterona com um aumento rápido de cálcio intracelular (20-30 segundos). von Lebedur e colaboradores (2002), descreveram que a testosterona em doses entre 0,1 a $10\mu\text{M}$ tem efeito despolarizante nas células de Sertoli em ratos imaturos em menos de 10 segundos e causa aumento da resistência destas células. Estas ações foram imediatamente e estatisticamente significativa em 30 segundos sendo que o efeito da testosterona no potencial e na resistência da membrana foi mais evidente aos 5 minutos; e que após a lavagem com KRb, estes retornaram para valores próximo ao do repouso (Fig. 1.6).

Para investigarmos se a ação da testosterona era exclusiva na membrana de células de Sertoli. Nós analisamos a ação da testosterona-BSA ($10\mu\text{M}$) na membrana plasmática das células. Observamos que ocorreu uma despolarização no potencial de membrana, já em 30 segundos. O potencial de repouso da célula

no estado estável se encontrava em -46.3 ± 0.7 ; após a aplicação da testosterona-BSA nós registramos um potencial de membrana de -44.4 ± 0.8 ; e após os 300 segundos registramos um potencial de membrana de -42.4 ± 1.2 . Estes dados se confirmaram em um $n=10$ e a diferença foi significativa $p<0.05$. A testosterona-BSA é impermeável a membrana plasmática. Neste trabalho, foi observado uma menor intensidade da despolarização produzida pela T-BSA se comparada com a testosterona livre (ver figura 1.6). Estes resultados indicam a localização deste efeito na membrana da célula.

A testosterona é sintetizada e secretada pelas células intersticiais testiculares (células de Leydig) sob a ação estimulatória do hormônio luteinizante (LH). Pela proximidade destas células com as células de Sertoli nos túbulos seminíferos sugere-se que há uma relação parácrina entre elas (Hakola *et al*, 1998). Bartke e Dalterio (1975) reportam que, em testículos de roedores a secreção episódica da testosterona é entremeada com períodos de atividade esterogênica mínima. Coquelin e Desjardins (1982) demonstraram, que em camundongos o LH e a testosterona são liberadas na circulação em pulsos.

Estes dados apontam para presença de concentrações muito altas de testosterona na porção basal das células de Sertoli depois da secreção do hormônio. Awoniyi e colaboradores (1989); encontrou valores entre de $0.2-0.3\mu\text{M}$ de testosterona em testículos de ratos. Maddocks e colaboradores (1993) encontrou $0.3\mu\text{M}$ de testosterona no sangue venoso testicular de ratos e Turner e colaboradores (1984); reportou valores entre $2-0.25\mu\text{M}$ de testosterona em ratos e

Jarow e colaboradores (2001); encontrou valores de $2.0\mu\text{M}$ no fluido testicular aspirado em humanos.

Os níveis de testosterona encontrados dentro dos testículos são muito mais altos que os níveis plasmáticos (Awoniyi *et al.*, 1989). A maioria dos efeitos de andrógenos são mediados pelo seu receptor nuclear, já bem caracterizado. Níveis de testosterona ao redor de 1nM , são suficientes para estimular o receptor nuclear de andrógenos, o que torna difícil o entendimento de como esses receptores podem responder a níveis mais altos de andrógenos quando eles já estão saturados. Um sistema alternativo de percepção de variações dos níveis de andrógenos acima do nível de saturação dos receptores nucleares poderia estar atuando em conjunto com os mesmos. Sugere-se que, além dos já descritos receptores nucleares de esteróides, haja receptores localizados na membrana plasmática.

A partir dos dados obtidos com a testosterona-BSA, decidiu-se investigar o envolvimento dos canais K^+_{ATP} na membrana de células de Sertoli.

Os canais de K^+ dependentes de ATP são, essencialmente, independentes de voltagem e Ca^{2+} , são seletivos ao K^+ . A principal característica dos canais K^+_{ATP} é que são inibidos por concentrações fisiológicas de ATP ($10\text{-}100\mu\text{M}$) e abrem quando diminui as concentrações de ATP. Esses canais foram primeiro descritos por Noma (1983) e apresentam características semelhantes em células- β do pâncreas, no músculo esquelético liso e em algumas regiões do SNC (Edwards e

Weston.,1993). Miki e colaboradores (1999), descreveram que em células- β do pâncreas o aumento da glicose produz o aumento da relação ATP/ADP provocando o fechamento dos canais de K^+ , e esse fechamento produz uma despolarização da membrana das células- β , o que leva à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{2+} . Esse aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} dispara a exocitose dos grânulos de insulina (Dunne e Peterson.,1991), (Fig. V.1)

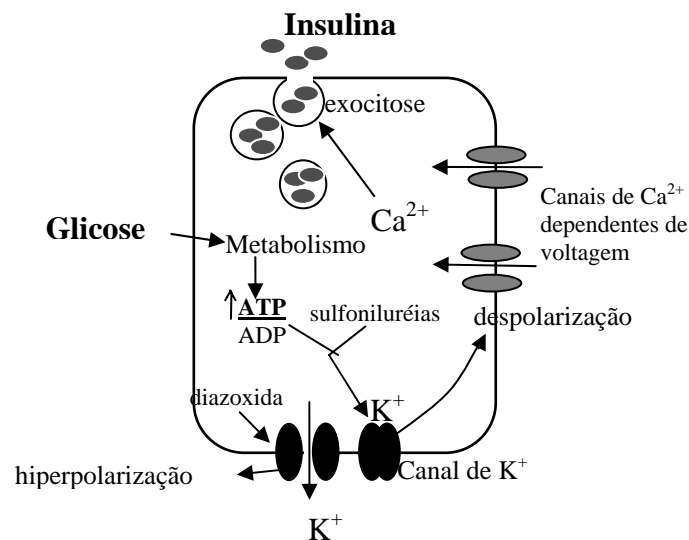


FIGURA V.1 MECANISMO DE REGULAÇÃO DOS CANAIS DE K^+ ATP NAS CÉLULAS- β DO PÂNCREAS. (DENNE E PERTENSON., 1991).

Os canais de K^+ de retificação interna (K^+_{ir}) são uma superfamília de proteínas que também são expressadas em vários tecidos, incluindo testículos, e são responsáveis por diversos processos fisiológicos (Schulze *et al.*, 2003; Aguilar-Bnryan *et al.*, 1995; Ashcroft.,1988).

O membro da família Kir 6.x é o canal K^+_{ATP} , que é caracterizado por um sinal de K^+ de fraca retificação e que estabiliza a membrana próximo do potencial de equilíbrio do potássio (Baukrowitz e Fakler., 2000). Este canal produz alterações no potencial de membrana, está acoplado ao estado metabólico da célula e medeia processos de sinalização celular.

Canais de K^+_{ATP} podem ser ativados por diazoxida ou inibidos por sulfoniluréias, como glibenglamida e tolbutamida (Bryan e Aguilar-Bryan., 1997).

Associado a estrutura do canal existem subunidades receptoras às sulfoniluréias (SUR), que são constituintes do canal que é a estrutura retificadora de influxo (Kir) do canal de potássio (K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2) (Fig. V.2). As sulfoniluréias ligam-se a sítios específicos ao SUR provocando inibição do canal. A diazoxida, também ao se ligar ao SUR, provoca abertura do canal iônico (Bryan e Aguilar-Bryan., 1997 e Baukrowitz e Fakler.,2000). O efeito das sulfoniluréias mimetiza o efeito do aumento de glicose em células β do pâncreas, aumentando a liberação de insulina, enquanto que a diazoxida produz hiperpolarização da membrana, sendo ambos efeitos através do controle da abertura sobre os canais de K^+_{ATP} (Fig. V.2).

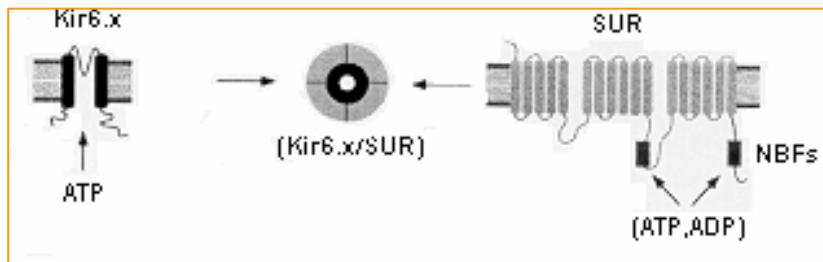


FIGURA V.2 MODELO ESQUEMÁTICO DA ARQUITETURA MOLECULAR DOS CANAIS DOS K^+ ATP. MODELO TÍPICO DO K_{IR} 6.X E SUR. (BAUKROWITZ E FALKER.,2000).

Em células de Sertoli a superfusão dos túbulos com diazoxida em doses 250 e 400 μ M causa uma hiperpolarização do potencial de membrana (Fig. V.3).

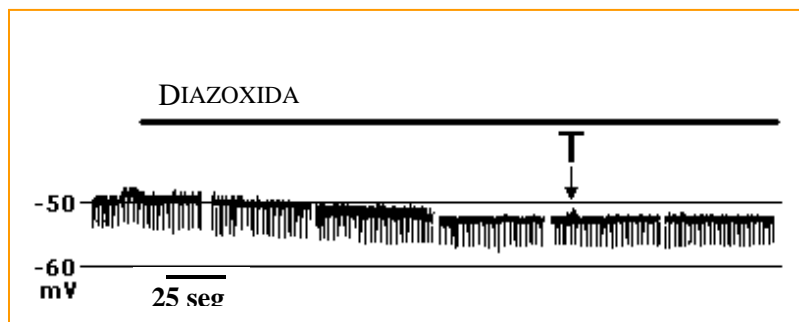


FIGURA V.3 EFEITO DA AÇÃO DA DIAZOXIDA NO POTENCIAL DE CÉLULAS DE SERTOLI (VON LEBEDUR *ET AL.*, 2002)

A abertura de canais de K^+ provocada pela diazoxida, leva à uma saída deste íon da célula direcionada pelo seu gradiente eletroquímico através da membrana. O interior da célula torna-se mais negativo, o que resulta em uma hiperpolarização da membrana (von Ledebur *et al.*, 2002).

A glibenclamida provoca uma despolarização da membrana e aumenta sua resistência depois de uma latência de 1 minuto na membrana de células de Sertoli de túbulos seminíferos de ratos (von Lebedur *et al.*,2002).

Da mesma forma que a glibenclamida a tolbutamida é uma sulfoniluréia e um potente inibidor dos canais de K^+_{ATP} , sendo usado no tratamento de pacientes com diabetes. A inibição dos canais pela droga despolariza a membrana e aumenta a concentração citoplasmática de Ca^{2+} como consequência da ativação dos VDCC, aumentando a secreção de insulina (Kakei.,2003).

Tanto a glibenclamida ($10\mu M$) como a tolbutamida ($10\mu M$) e a testosterona ($0,25\mu M$) tiveram efeito despolarizante sobre a membrana das células de Sertoli (figura IV.4A) e este efeito foi associado com um aumento da resistência da membrana. (Figura IV-4B). Esta ação homologa da resposta eletrofisiológica da testosterona com as sulfoniluréias nas células de Sertoli, sugere um possível envolvimento dos canais de K^+_{ATP} na resposta da testosterona sugerido por von Lebedur e colaboradores (2002).

Baseados na semelhança dos efeitos observados podemos propor que, de maneira análoga à glibenclamida em células- β , a testosterona fecha os canais de K^+_{ATP} nas células de Sertoli, este fechamento provoca a despolarização da membrana, com a consequente abertura dos canais de Ca^{2+} e aumento do Ca^{2+} intracelular.

Os canais de K^+_{ATP} são também modulados por fosfolipídios como o PIP_2 e PIP_3 (Kakei., 2003; Baukrowitz *et al.*,1998, Baukrowitz e Falker 2000; Fan e Makielski., 1997., Hilgemann.,1996). Este efeito representa um mecanismo de controle da excitabilidade da membrana celular através de fosfolipídios, que em sua presença atuam abrindo os canais K_{IR} . (Shyng e Nichols., 1998).

O PIP_2 é um constituinte da membrana presente em pequenas quantidades, mas ele é o substrato chave para fosfolipase C (PLC) que hidroliza PIP_2 em DAG e IP_3 .(Gosh *et al.*, 1997). Os níveis de PIP_2 na membrana podem determinar a atividade basal dos canais, sugerindo que a atividade dos canais pode ser modulada por uma via que envolve receptor acoplado à proteína-G, estimulação do fosfatidilinositol pela fosfolipase C (PLC) o que provoca depleção do PIP_2 membrana (Kakei.,2003). Assim, os canais de K^+_{ATP} além de promoverem uma interface entre as cargas metabólicas e a excitação elétrica, transmitem rapidamente sinais extracelulares, através de receptores acoplados a proteína-G pelo caminho PI-PLC via metabolismo do PIP_2 (Kakei.,2003). A Ativação da PLC mediada por receptores resulta na inibição das correntes mediada por canais de K^+_{ATP} . Estes efeitos representam um mecanismo de controle da excitabilidade da membrana celular através de fosfolipídios.

Experimentos bioquímicos e eletrofisiológicos indicam que PIP_2 interage com resíduos na terminação-C do canal K_{ir} 6.2 (Baukrowitz e Falker.,2000; Fan e Makielski.,1997). Estas interações parecem ser eletrostáticas e o número de cargas negativas do inositol é crítico para o efeito do fosfolipídio na inibição do canal de K^+_{ATP} (Baukrowitz e Falker.,2000; Baukrowitz *et al.*, 1998).

Em nossos experimentos, analisamos a ação da testosterona na membrana da célula de Sertoli na presença do inibidor do PLC U73122 (Fig. IV.9). Observamos que a despolarização característica que ocorre com a aplicação da testosterona na membrana de células de Sertoli foi anulada na presença do inibidor da PLC. O bloqueio da hidrólise do PIP_2 preservou as cargas do PIP_2 na membrana e conseqüentemente impediu o efeito da testosterona.

A espermina é uma poliamina, esta poliamina aumenta o bloqueio dos canais de acordo com sua carga: espermina (spm^{4+}) > espermidina (spd^{3+}) > putrescina (puc^{2+}). Deste modo, espermina bloqueia o canal de K^+_{ATP} em concentrações nanomolares para potenciais de membrana positivas no equilíbrio do potássio (EK) (Doupnik *et al.*, 1995). Foi verificada a ação da espermina na membrana de células de Sertoli, e foi observado que, a aplicação de espermina (1mM) provocou a despolarização da membrana em 30 segundos (Fig. IV.6A) e o aumento da resistência da membrana, (Fig. IV.6B), esta ação foi similar à testosterona.

Foi utilizado o quelante de cálcio EGTA (0.5mM), em perfusão no banho, para reduzir as cargas positivas do Ca^{2+} na membrana, e foi observado que ocorreu uma hiperpolarização do potencial de membrana das células de Sertoli (Fig. IV.6) com redução da resistência da membrana. Com aplicação tópica de LaCl_3 (100 μm), o efeito do EGTA foi revertido com despolarização da membrana, indicando que as cargas foram neutralizadas (Fig. IV.7).

Quando foi aplicada topicamente a testosterona na concentração fisiológica intratesticular de $0,3\mu\text{M}$, esta reverteu o efeito produzido pelo EGTA (hiperpolarização), produzindo uma despolarização da membrana (Fig. IV.7). Estes resultados estão de acordo com as interações eletrostáticas que regulam os canais de K^+_{ATP} (Deutsch *et al.*, 1994). A ação da testosterona no potencial da membrana e na resistência das células de Sertoli foi eliminada com a perfusão no banho do inibidor da PCL o U73122 (Fig. IV.9). Estes resultados indicam que a ação da testosterona resulta da sua influência no caminho PLC-PIP₂.

Os resultados da ação da testosterona na membrana da célula de Sertoli são similares aos reportados por Lieberherr e Grosse (1994) em osteoblastos de ratos, com os resultados de Benten e colaboradores (1999) em macrófagos e os de Estrada e colaboradores (2003) em miotubulos. Nestas células a ação da testosterona é relatada ser via GPCR-PLC-PIP₂. Finalmente, PIP₂ e Ca^{2+} podem ter efeitos opostos na estabilidade do citoesqueleto facilitando a reestruturação das “junctions” aderentes entre as diferentes células do epitélio seminífero, assim capacitando a extrema mobilidade destas células e a metamorfose continua das células germinativas (Loss *et al.*, 2004).

VI. CONCLUSÕES

As características elétricas basais das células de Sertoli empaladas dos túbulos seminíferos isolados de ratos entre 14 e 16 dias de idade foram: potencial de membrana = -47.2 ± 0.8 mV (n=136); e resistência da membrana = 12.7 ± 1.3 M Ω (n=136).

1. A administração tópica da testosterona ligada à albumina bovina serica (T-BSA) ($10\mu\text{M}$ de testosterona) produziu uma despolarização de membrana ($P_m = -46.3 \pm 0.7$ mV; após 30 segundos da aplicação da T-BSA = -44.4 ± 0.8 mV; após 300 segundos - 42.4 ± 1.2 mV (n=10) a diferença foi significativa, demonstrando uma ação da testosterona na membrana das células de Sertoli.

2. O efeito da testosterona ($0,25\mu\text{M}$) na membrana foi similar ao da Glibenclamida ($10\mu\text{M}$), que bloqueia canais de K^+_{ATP} , e foi também observado com a sulfoniluréia tolbutamida ($10\mu\text{M}$). Este efeito foi associado com um aumento da resistência da membrana.

3. A espermina (1mM) neutralizou as cargas aniônicas, despolarizando a membrana em 30 segundos e aumentando sua resistência, ação similar à testosterona

4. O EGTA (500 μ M), ao retirar os íons Ca^{+2} do meio, liberou as cargas aniônicas e produziu uma hiperpolarização na membrana, e reduziu a sua resistência.
5. O efeito do EGTA foi revertido quando se aplicou LaCl_3 (100 μ M), que neutralizou as cargas, e despolarizou a membrana.
6. A aplicação da testosterona na concentração fisiológica intratesticular de 0,3 μ M reverteu o efeito do EGTA, produzindo uma despolarização.
7. A ação da testosterona no potencial de membrana e na resistência da membrana das células de Sertoli foi anulada na presença da em perfusão do inibidor da PLC o U73122.

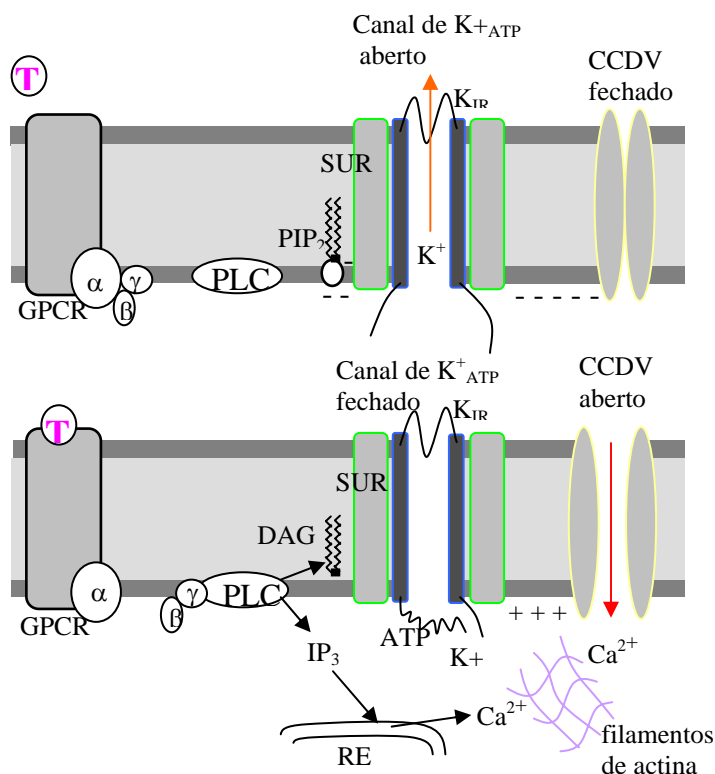


FIGURA V.4 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DA TESTOSTERONA NA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI. ER= RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E T=TESTOSTERONA (WASSERMANN E LOSS, 2004)

A partir destes dados elaboramos um modelo esquemático de como seria a ação da testosterona na membrana (Fig. V.4). A testosterona provavelmente ativa um suposto receptor ligado à proteína-G o que provoca a ativação da PLC, que por sua vez hidrolisa PIP₂ em IP₃ e DAG. A redução do montante de PIP₂ da membrana inibe a condutância do canal devido a diferença de cargas iônicas. O

fechamento dos canais de K^+_{ATP} despolariza a membrana e aumenta o influxo de Ca^{2+} através dos CCDV. Ao mesmo tempo, IP_3 libera Ca^{2+} do retículo endoplasmático, que por sua vez atua como segundo mensageiro exercendo múltiplos efeitos. PIP_2 e Ca^{2+} podem agir na estabilidade da rede do citoesqueleto sob a membrana plasmática (Wassermann e Loss, 2004).

VII. BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Bryan, L.; Nichols, C.G.; Wechsler, S.W.; Clement, J.P.; Boyd, A.E.; Gonzalez, G.; Herrera-Sosa, H.; Nguy, K.; Bryan, J.; Nelson D.A. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**. 268: 423-426, 1995.

Aguilar-Bryan, L.; Clement I.V, J.P.; Gonzalez, G. ; Kunjilwar, K.; Babenko, A.; Bryan, J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. **Physiol. Rev.** 78: 227-245, 1998.

Armen, T.A.; Gay, C.V. Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. **J. Cell. Biochem.** 79:620-627, 2000.

Ashcroft, F.M. Adenosine 5'- triphosphate-sensitive potassium channels. **Annu Rev Neurosci.** 11: 97-118, 1988.

Awoniyi, C.A.; Santulli, R.; Sprando, R.L.; Ewing, L.L.; Zirkin, B.R. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinol.**, 124: 1217-1223, 1989.

Barres, B. A.; Koroshetz, W. J.; Chun, L. L.; Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. **Neuron**.5(4):527-44, 1990.

Barry, D.M.; Nerbonne, J.M. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. **Annu. Rev. Physiol.** 58: 363-394, 1996.

- Baukrowitz, T.; Schulte, U.; Oliver, D.; Herlitze, S.; Krauter, T.; Tucker, S.J.; Ruppertsberg, J.P.; Fakler, B. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. **Science**. 282: 1141-1144, 1998.
- Baukrowitz, T.; Fakler, B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. **Eur J Biochem** 267: 5842-5848, 2000.
- Benten, W.P.M.; Liberherr, M.; Sekeris, C.E.; Wunderlich, F. Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. **FEBS Lett**. 407: 211-214, 1997.
- Benten, W.P.M.; Lieberherr, M.; Giese, G.; Wrehlke, C.; Stamm, O.; Sekeris, C.E.; Mossmann, H.; Wunderlich, F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **FASEB J**. 13: 123-133, 1999.
- Bernard, E.A.; Wassermann, G.F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by in vivo administration of follicle stimulating hormone. **Mol Cell Biochem**. 44: 45-7, 1982.
- Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. **Biochem J**. 220:345, 1984.
- Bartke, A.; Dalterio, S. Evidence for episodic secretion of testosterone in laboratory mice. **Steroids**. 26: 749-756, 1975.
- Bond, C.T.; Pessia, M.; Xia, X.M.; Lagrutta, A.; Kavanaugh, M.P.; Adelman, J.P. Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. **Recept. Channels** 2:183-91, 1994.

- Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L. The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of puzzle. *Corr Opin Cell Bio.* 9:553-559, 1997.
- Brann, D.W.; Hendry, L.B.; Mahesh, V.B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52:113-133, 1995.
- Brubaker, K.D; Gay, C.V. Depolarization of osteoclast plasma membrane potential by 17beta-estradiol. *J. Bone Miner. Res.*, 14: 1861-1866, 1999.
- Carreau, S.; Foucault, P.; Drosdowsky, Ma. La cellule de Sertoli: Aspects fonctionnels comparés chez le rat, le porc et l'homme. *Ann. Endocrinol.* (Paris) 55: 203-220, 1994.
- Catterall, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Biochem.* 64:493-531, 1995.
- Christ, M.; Haseroth, K.; Falkenstein, E.; Wehling, M. Nongenomic steroid actions: fact or fantasy. *Vitamins and Hormones.* 57:325-373, 1999.
- Chandy, K.G.; Gutman, G.A. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:434, 1993.
- Cheng C.Y, Mruk D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Ver.* 82:825-74, 2002.
- Constanti, A.; Galvan, M. Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones. *J. Physiol.* 335:153-78,1983.

Cook, D.L.; Hales, C.N. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. **Nature**. 311: 271-3, 1994.

Cooper, D.S.; Cevallos, J.L.; Houston, R.; Chagnon, N.; Laderson, P.W. The thyroid status of the yanomamo Indians of southern Venezuela. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 77:878-880, 1993

De Jong, F.H.; Hey, A.G.; Van Der Molen, H.J. Oestradiol-17 β and testosterone in rat testis tissue: effect of gonadotrophins, localization and production in vitro. **J. Endocrinol.** 60:409-419,1974.

Deutsch, N.; Matsuoka, S.; Weiss, J.N. Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. **J Gen Physiol.** 104: 773-800, 1994.

Dixit, V.D.; Singh, B.; Singh, P.; Georgie, G.C.; Galhotra, M.M.; Dixit V.P. Circadian and pulsatile variations in plasma levels of inhibin, FSH and testosterone in adult Murrah buffalo bulls. **Theriogenology.** 50: 283-292, 1998.

Doupnik, C.A.; Davidson, N.; Lester, HA. The inward rectifier potassium channel family. **Curr. Opin. Neurobiol.** 5:268–77,1995.

Dufau, M.L. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. **Ann. Rev. Physiol.** 50: 483-508, 1988.

Duval, D.; Durant, S.; Homo-Delarche, F. Non-genomic effects of steroids – Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. **Biochim. Biophys. Acta.** 737:409-442, 1983.

- Dunne, W. J.; Peterson, O. H. Potassium selective ion channels in insulin secreting cells: physiology, pharmacology and their role in insulin secreting cells. *Biochim Biophys Acta*. 1071:67-82, 1991.
- Dym, M.; Fawcett, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3: 308-326, 1970.
- Edwards, G.; Weston, A.H. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Acta Pharmacol. Toxicol.* 33: 597-637, 1993.
- Estrada, M.; Espinosa, A.; Müller, M.; Jaimovich E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 144: 3586-3597, 2003.
- Eusebi, F.; Ziparo, E.; Fratamico, G.; Russo, M.A.; Stefanini, M. Intracellular communication in rat seminiferous tubules. *Dev. Biol.* 100: 249-255, 1983.
- Ewing, L.L.; Davis, J.C.; Zirkin, B.R. Regulation of testicular function: a spatial and temporal view. Em *Reproductive Physiology III international Review of Physiology*. R.O. Greep, ed. Baltimore: University Park Press:41-115, 1980.
- Ewing, L.L.; Keeney, D.S. Leydig cells: structure and funtion. Em: *Cell and Molecular Biology of the Testis*. C. Desjardins e L.L. Ewing, eds. New York: Oxford University Press: 137-165, 1993.

- Fan, Z.; Makielski, J.C. Anionic phospholipids activate ATP sensitive potassium channels. *J Gen Chem*, 272: 5388-5395, 1997.
- Félix, B.; Catalin, D.; Miolan, J.P.; Niel, J.P. Effects of testosterone on the electrical properties and nicotinic transmission of the major pelvic and coeliac ganglion neurones. *J Neuroendocrinol*. 13: 193-8, 2001.
- Fujita, R.; Kimura, S.; Kawasaki, S.; Takashima, K.; Matsumoto, M.; Hirano, H.; Sasaki, K. ATP suppresses the K(+) current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *Jpn. J. Physiol*, 51: 491-500, 2001.
- Gorkzynska, E.; Handelsman, D.J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136: 2052-2059, 1995.
- Gosh, A.; Greenberg, M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 268: 239-247, 1995.
- Gosh, S.; Strum, J.C.; Bell, R.M. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *FASEB J*. 11:45-50, 1997.
- 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*. 125: 3029-36, 1989.
- Griffin, J.E. Male Reproductive Function. Em: *Textbook of endocrine physiology*. Griffin, J.E., Ojeda, S.R. Oxford University Press, New York/Oxford, p. 201-222, 1996.

Griffin, J.E.; Wilson, J.D. Disorders of the testes and the male reproductive tract. Em: **William's textbook of endocrinology**. 8ª edição, Wilson J.D. and Foster, D.W.W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 799-852, 1992.

Grootegoed, J.A. The testis: Spermatogenesis. Em: **Scientific Essentials of Reproductive Medicine**. S.G.Hillier, H.C. Kitchener. J.P. Neilson Eds. Philadelphia, Saunders. p.172-184, 1996.

Hakola, K.; Pierroz, D.D.; Aebi, A.; Vuagnat, B.A.M.; Aubert, M.L.; Huhtaniemi, I. Dose and time relationships of intravenously injected rat recombinant luteinizing hormone and testicular testosterone secretion in the male rat. **Biol. Reprod.** 59: 338-343, 1998.

Hardman, J.G.; Gilman, G.A.; Limbrid, L.E. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9ª. edição, International Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA, 1996.

Herlitz, S.; Zhong, H.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Allosteric modulation of Ca²⁺ channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C and Ca_vβ subunits. **PNAS- Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 98: 4699-4704, 2000.

Hille, B. Ohm's law is central em **ionic channels of excitable membranes**, 2a edição. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. cap 1 p. 1-20, 1992.

Higgins, C.F. The ABC of channel regulation. **Cell.** 82:693-696, 1995.

- Hockerman, G.H.; Peterson, B.Z.; Johnson, B.D.; Catterall, W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. ***Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*** 37: 361-196, 1997.
- Hodgkin, A.L.; Horowicz, P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. ***J. Physiol.*** 148: 127-160, 1959.
- Hofmann, F.; Lacinová, L.; Klugbauer, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. ***Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.***, 139: 33-87, 1999.
- Huan, C.; Zhou, M; Wu, M; Zhang, Z; Mei, Y. Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K⁺ current in rat cerebellar granule cells. ***Brain Res.***, 917: 182-190, 2001.
- Hur, E.M.; Kim, K.T. G-protein-coupled receptor signalling and cross-talk. Achieving rapidity and specificity. ***Cell. Signal.*** 14: 397-405, 2002.
- Inagaki, N.; Gonoj, T.; Clement, J.P.; Namba, N.; Inazawa, J. Reconstitution of I_{KATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. ***Science*** 270:1166–58, 1995a.
- Inagaki, N.; Tsuura, Y.; Namba, N.; Masuda, K., Gonoj, T. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. ***J. Biol. Chem.*** 270:5691–94. 1995b.

- Inoue, M.; Nakajima, S.; Nacajimam Y. Somastotatin induces an inward rectification in rat locus coeruleus neurones through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *J. Physiol.* 407:177-98, 1988.
- Jarrow, J.P.; Chen, H.; Rosner,W.; Trentacoste, S.; Zirkin, B.R. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J. Androl.* 22: 640-645, 2001.
- Jegou, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol.* 147: 25-96, 1993.
- Jenster, G. Coactivations and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol. Cell. Endocrinol.* 143:1-7, 1998.
- Kampa, M.; Papakonstansti, EA.; Hatzoglou, A.; Stathopoulos, S.; Stournaras, C.; Castanas, E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J.* 16: 1429-31,2002.
- Takei M. Receptor-operated regulation of ATP-sensitive K⁺ channels via membrane phospholipid metabolism. *Curr Med Chem.* 10: 235-243, 2003.
- Kelly, M.E.; Dixon, S.J.; Sims, S.M. Inwardly rectifying potassium current in rabbit osteoclasts: a whole-cell and single-channel study. *J. Membr. Biol.* 126:171-81, 1992.
- Kerr, J.B.; Bartlett, J.M.S.; Sharpe, R.M. Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat: an ultrastructural, morphometric and hormonal assay study. *Cell Tissue Res.* 249: 367-377, 1987.

- Kim, A.H.; Cho, K.W.; Chang, S.H.; Kim, S.Z.; Chae, S.W. Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion: involvement of K⁺_{ATP} channels and L-type Ca²⁺ channel modulation. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* 434: 362-372, 1997.
- Koenig, H.; Fan, C.C.; Goldstone, A.D.; Lu, C.Y.; Trout, J.J. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. *Circ. Res.* 64:415-426, 1989.
- Konoplya, E.F.; Poppof, E.H. Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membranes. *Int J Biochem.* 24:1979-83, 1992.
- Kobrinsky, E.; Mirshahi, T.; Zhang, H.; Jin, T.; Logothetis D. E. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP₂ leads to K⁺-current desensitization. *Natura Cell Biology.* 2:507-514, 2000.
- Kurachi, Y. Voltage-dependent activation of the inward rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J. Physiol.* 366:365-385, 1985.
- Leite, L.; Luchi, R.; Von Ledebur, E.I.C.F.; Loss, E.S.; Wassermann, G.F. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Med. Sci. Res.* 27: 25-28, 1999.
- Lieberherr, M.; Grosse, B. Androgens increase intracellular calcium concentrations and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin sensitive G protein. *J. Biol. Chem.* 269: 7219-7223, 1994.

- Llinas, R.R.; Sugimori, M.; Cherksey, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons: the P channel. **Ann. N.Y.Acad. Sci.** 560: 103-111, 1989.
- Loss, E.S.; Barreto, K.P.; Leite, L.; Wassermann, G.F. Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and membrane potential in Sertoli cells. **Medical Science Research**, 26: 195-199, 1998.
- Loss, E.S.; Jacobsen, M.; Costa, Z.S.M.; Jacobus, A.P.; Borelli, F.; Wassermann, G.F. Testosterone modulates K^+_{ATP} channels in Sertoli cell membrane by PLC-PIP₂ pathway. **Horm Metab Res**; in press agosto.2004.
- Loussouarn, G.; Pike, L. J.; Ashcroft, F. M.; Makhina, E. N.; Nichols, C. G. Dynamic sensitivity of ATP-sensitive K(+) channels to ATP. **J Biol Chem.** 276: 29098-103, 2001.
- Luconi, M.; Bonaccorsi, L.; Maggi, M.; Pecchioli, P.; Krausz, C.; Forti, G.; Baldi, E. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 83: 877-885, 1998.
- Lyng, F.; Jones, G.R.; Rommerts, F.F.G. Rapid androgen actions on calcium signalling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. **Biol. Reprod.** 63: 736-747, 2000.
- Maddocks, S.; Hargreave, T.B.; Reddie, K.; Fraser, H.M.; Kerr, J.B.; Sharpe, R.M. Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea-pig, monkey and human. **Int. J. Androl.** 16: 272-278, 1993.

- McCoshen, J.A. In vivo sex differentiation of congenic germinal cell aplastic gonads. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142: 83-88, 1982.
- Mendis-Handagama, S.M.L.C.; Zirkin, B.R.; Ewing, L.L. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in the hamster, rat and guinea pig testes perfused in vitro. *Am. J. Anat.*, 181: 12-22, 1988.
- Merchant, H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44: 1-21, 1975.
- Miki, T.; Nagashima, K.; Seino, S. Review - The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cell. *J. Mol. Endocr.* 22: 113-123, 1999.
- Miller, C. Review - An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4): 0004.1-0004.5, 2000.
- Mintz, B.; Russel, E.S. Developmental modifications of primordial germ cells, induced by W-series genes in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 122: 443-449, 1955.
- Miranda, M.J.; Liedke, P.E.R.; Leite, L.; Loss, E.S.; Wassermann, G.F. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. *Med. Sci. Res.* 26: 703-706, 1998.

- Mulligan, T.; Iranmanesh, A.; Gheorghiu, S.; Godschalk, M.; Veldhuis, J.D. Amplified nocturnal luteinizing hormone (LH) secretory burst frequency with selective attenuation of pulsatile (but not basal) testosterone secretion in healthy aged men: possible Leydig cell desensitization to endogenous LH signalization – a clinical research center study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 80: 3025-3031, 1997.
- Newman, E. A. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. **J. Neurosci.** 13:3333–45, 1993.
- Nichols, C. G.; Lopatin, A. N.; Makhina, E.N.; Pearson, W. L.; Sha, Q. Inward rectification a Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. Diabetologia.nd implications for cardiac excitability. **Circ. Res.** 78:1–7 42: 903-919, 1999.
- Noma, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature.** 305:147, 48, 1983.
- O'malley, B.W.; Tsai, M.J. Molecular pathways of steroid receptor action. **Biol. Reprod.** 46:163-167,1992.
- Okazaki, T; Bell, Rm; Hannun, Ya. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. **J. Biol. Chem.** 264(32): 19076-19080,1989.
- Orsini, J.C.; Barone, F.C.; Armstrong, D.L.; Wayne, M.J. Direct effects of androgens on lateral hypothalamic neuronal activity in the male rat: I. A microiontophoretic study. **Brain Res. Bull.** 15: 293-297, 1985.
- Papakonstanti, E. A.; Kampa, M.; Castanas, E.; Stournaras C. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by

activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol.*; 17:870-81, 2003.

Quayle, J. M.; McCarron, J. G.; Brayden, J.E.; Nelson, M,T. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 265(5 Pt 1):C1363-70, 1993.

Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G.L.; Levin, E.R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13: 307-319, 1999.

Revelli, A.; Massobrio, M.; Tesarik, J. Non-genomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* 19:3-17, 1998.

Riegman, P.H.J.; Vlieststra, R.J.; Van Der Korput, J.A.G.M.; Brinkmann, A.O.; Trapman, J. The promoter of the prostate specific antigen gene contains a functional androgen response element. *Mol Endocrinol.* 5:1921-1930, 1991.

Rommerts, F.F.G. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? *J. Endocr.* 116: 7-9, 1988.

Rommerts, F.F.G. Cell surface actions of steroids: A complementary mechanism for regulation of spermatogenesis? Em *Spermatogenesis, Fertilization and Contraception (Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction)*, Schering Foundation Workshop 4, Nieschlag E and Habenicht UF (eds), Springer Verlag, Berlin: 1-19, 1992.

- Rommerts, F.F.G. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and nongenomic actions. Em ***Testosterone, action, deficiency, substitution***. E Meschlag, H.M. Behre, 2^a Edição, Springer Verlag, Berlin, cap.1:1-31, 1998.
- Ross, T.R.; Romrell, L.J.; Kaye, G.I. Male reproductive system, **em *Histology A Text and Atlas***. 3^a Edição, Williams&Williams, Baltimore, Maryland, cap. 21:636-676, 1995.
- Russel, L.D. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. Em ***The Sertoli Cell***. L.D. Russel e M.D. Griswold eds., Clearwater, Cache River Press. p. 365-390, 1993.
- Russel, L.D.; Peterson, R.N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. ***Int. Rev. Cytol.*** 94: 177-211, 1985.
- Sakmann, B.; Trube, G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. ***J Physiol (Lond)***. 347: 641-657, 1984.
- Sargent, P.B. Electrical Signaling em ***An Introduction to Molecular Neurobiology***, Hall, A.W. e 11 contribuidores, Sinauer Associate, Ibnc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. cap.2 p.33-80, 1992.
- Schwartz, N.B. The 1994 Stevenson Award Lecture. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: a tale of two gonadotropins. ***Can. J. Physiol. Pharmacol.*** 73(6): 675-684, 1995.
- Schulze, D.; Krauter, T.; Fritzenschaft, H.; Soom, M.; Baukrowitz, T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH

sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP2 site in the N terminus. **J Biol Chem.** 278: 10500-5, 2003.

Sertoli, E. E lesistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi dell' testicolo umano. **Morgagni** 7: 31-40, 1865.

Sharpe, R.M. Regulation of spermatogenesis. Em **The Physiology of Reproduction**. Knobil, E. e Neill, JD, eds. New York: Raven Press, p. 1363-1434, 1994.

Sherman-Gold, R. Bioelectricity. Em **The Axon-Guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques**, cap.1, p.1-16, 1993.

Silva, F.R.; Leite, L.D.; Barreto, K.P.; D'Agostini, C.; Zamoner, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sci.** 69: 977-986, 2001.

Silva, F.R.M.B; Leite, L.D.; Wassermann, G.F. Rapid Signal Transduction In Sertoli Cells. **European Journal Of Endocrinology**, 147:425-433, 2002.

Simons, K.; Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 1:31-39, 2000.

Skinner, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews.** 12: 45-77, 1991.

Silver M.R, DeCoursey T.E. Intrinsic gating of inward rectifier in bovine pulmonary artery endothelial cells in the presence or absence of internal magnesium. **J. Gen. Physiol.** 96:109–33, 1990.

Smith, P.E. Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. **Am. J. Anat.** **45**: 205-256, 1930.

Spedding, M.; Paolette, R. III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol. Rew.** **44**: 363-376, 1992.

Staes, M.; Talavera, K.; Klugbauer, N.; Prenen, J.; Lacinová, L.; Droogmans, G.; Hofmann, F.; Nilius, B. The amino side of the C-terminus dermines fast inactivation of the T-type calcium channel α_{1G} . **J. Physiol.** **530**: 35-45, 2001.

Steinsapir, J.; Soccl, R.; Reinach, P. Effects of androgen on intercellular calcium of LNCaP cells. **Biochem. Biophys Res Commun.** **179**: 90-96, 1991.

Stocco, D.M. Steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis. Em **Testicular Function: From Gene Expression to Genetic Manipulation**. M. Stefanini, C. Boitani, M. Galdieri, R. Geremia, F. Palombi, eds. Springer-Verlag, Berlin: 179-211, 1998.

Stryer, L. **Bioquímica**, 4^a edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1996.

Swerdloff, R.S.; Wang, C. Physiology of hipothalamic-pituitary function. Em: **Campbell's Urology**. P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan, A.J. Wein Eds., Philadelphia, Saunders. p. 1239-1253, 1998.

- Shyng, S.L.; Nichols, C. G. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol.* 110: 655-64, 1997.
- Shyng, S. L, Nichols, C. G. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science.* 282: 1138-41, 1998.
- Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 451-486, 1994.
- Tsien, R.W.; Ellinor, P.T.; Horne, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12: 349-354, 1991
- Tsien, R.W.; Tsien, R.Y. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:715-760, 1990.
- Turner, T.T.; Jones, C.E.; Howards, S.S.; Ewing, L.L.; Zegeye, B.; Gunsalus, G.L. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinol.* 115: 1925-1932, 1984.
- Van, Roijen. J. H. Basic studies in andrology – spermatogenesis and sperm maturation in rodents and men. *Tese de doutorado apresentada na Erasmus Universiteit Rotterdam*, 1999.
- Von Ledebur, E. I. C. F.; Almeida, J. P.; Loss, E. S.; Wassermann, G. F. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K⁺_{ATP} channels. *Horm Metab Res.* 34: 550-555, 2002.

Wassermann, G.F.; Montl Bloch, L.; Grillo, M. L.; Silva, F.R.M.B.; Loss, E. S.; McConnel, L. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. ***Horm. Metab. Res.***, 24: 326-328, 1992.

Wassermann, G.F.; Loss, E. S. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: A $K_{IR6.X}$ Channel related effect. ***Current Design of pharmacology***. In press.2004.

Weiss, J.; Cote, C.R.; Jameson, J.L.; Crowley, W.F. Jr. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated luteinizing hormone secretion in vitro occurs within the duration of an endogenous GnRH pulse. ***Endocrinology***. 136(1):138-143, 1995.

Winters, S.J.; Takahashi, J.; Troen, P. Secretion of testosterone and its Δ^4 precursor steroids into spermatic vein blood in men with varicocele-associated infertility. ***J. Clin. Endocrinol. Metab.*** 84:997-1001, 1999.

Yamada, Y. Effect of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. ***Brain Res.*** 172:165-168, 1979.

**Testosterone modulates K^+ _{ATP} channels in Sertoli cell
membrane by PLC-PIP₂ pathway**

Loss, ES, Jacobsen, M, Costa ZSM, Jacobus AP, Borelli, F, Wassermann GF*

*Departamento de Fisiologia ICBS, UFRGS
Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
Phone/Fax: +55 (51) 33 16 33 02 e-mail: gwass@ufrgs.br

Short running title: Testosterone action on K^+ _{ATP} channels

Summary

Testosterone at physiological intratesticular concentrations induces a dose-dependent depolarisation and an increase in input resistance together with an increment of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in the Sertoli cells from seminiferous tubules of immature rat. Previous studies have implicated the K^+_{ATP} channels in these testosterone actions. This study demonstrates that testosterone and the sulphonylureas, glibenclamide and tolbutamide, depolarise the membrane potential, augment the resistance and the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in the Sertoli cells of seminiferous tubules from 10-15 day-old rats. These actions were nullified by the presence of the K^+_{ATP} channel opener diazoxide. The depolarisation was also observed with the impermeant bovine serum albumin-bound testosterone. Testosterone actions were blocked by both pertussis toxin and the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 implying the involvement of PLC – phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate (PIP_2) hydrolysis via G protein in testosterone actions. Polycations, including spermine and LaCl_3 , depolarised the membrane potential and increased the resistance. The hyperpolarization caused by EGTA was reversed by LaCl_3 and by the presence of testosterone. This last effect was nullified by the presence of U73122. All the above results indicate that the action of testosterone on the Sertoli cell membrane is exercised on the K^+_{ATP} channels through PLC- PIP_2 hydrolysis that closes the channel, depolarises the membrane and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake.

Key Words: Androgens, K_{IR} channels, testes, sulphonylureas, diazoxide, pertussis toxin, U73122.

Introduction

The existence of a membrane androgen receptor (mAR) on the surface of cells has been presumed by various authors based on the detection of specific androgen binding sites [1]. Testosterone binding sites can be visualised on the surface of splenic T cells using the ligand testosterone-bovine serum albumin (T-BSA) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). The fluorescence of testosterone-BSA-FITC colocalized with that of ConA-rhodamine, a marker of the plasma membrane [2].

The results of Lieberherr and Grosse [3] with osteoblasts from male animals demonstrated that testosterone (10 pM – 10 nM) increases $[Ca^{2+}]_i$ within 5 sec via Ca^{2+} influx through voltage dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and via Ca^{2+} mobilisation from the endoplasmic reticulum as shown by the effect of thapsigargin. Testosterone also increases inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG) formation within 10 seconds.

Gorczyńska and Handelsman [4] showed that testosterone rapidly increases intracellular calcium in Sertoli cells from 17-20 day-old rats. Furthermore, they suggested that testosterone may exert its effects through a membrane-based, short-term signalling pathway. The existence of an alternative cell surface receptor system for androgens in immature (prepubertal) rat Sertoli cells has been postulated from calcium flux measurements. Lyng *et al.* [5] showed that Sertoli cells from cultured tubular fragments from 20 day-old rats responded to exogenous testosterone, T-BSA, dihydrotestosterone and R1881, a synthetic androgen, with a transient fast (20 – 30 sec) increase in intracellular calcium levels.

Testosterone also increases $^{45}Ca^{2+}$ uptake in Sertoli cells isolated from immature rat testes within 30 seconds [6]. Using Sertoli cell-enriched (SCE) seminiferous tubules from rats irradiated “in utero” with 1 gray of ^{60}Co between the 19th and 20th days of pregnancy [7] it was found that testosterone induced an immediate (<1 second) and

transitory depolarisation in the membrane potential of Sertoli cells. With the same preparation it was shown that the sulphonylurea glibenclamide, an antagonist that acts on the sulphonylurea receptor (SUR) subunit of the K^+_{ATP} channel, rapidly stimulates (within 20 seconds) Ca^{2+} uptake through VDCC and induces electrophysiological changes in the membrane of Sertoli cells, resulting in a prolonged depolarisation [8, 9] and an increase in the membrane resistance [9].

Von Ledebur *et al.* [9] demonstrated that the topical administration of intratesticular physiological concentrations of testosterone (0.1 – 0.25 μ M) [10, 11] on seminiferous tubules from immature rats induced an immediate (<1 second) depolarisation response in impaled Sertoli cells. This Sertoli cell response to testosterone was specific, since neither estradiol nor progesterone produced any effect. Testosterone also increased the membrane resistance of the Sertoli cells in less than 30 seconds in a dose dependent manner.

Perfusion of the tubules with diazoxide, a K^+_{ATP} channel opener (acting on the sulphonylurea receptor (SUR) subunit), caused hyperpolarization of the membrane potential. Diazoxide also nullified the electrophysiological effect of testosterone [9].

The homologous effect of testosterone and glibenclamide in terms of the electrophysiological response of Sertoli cells, as well as the suppression of the testosterone effect with the K^+_{ATP} agonist diazoxide, points to the involvement of K^+_{ATP} channels in the action of the hormone.

K^+_{ATP} channels have a complex regulation by intracellular nucleotides. K^+_{ATP} channels are unique among K_{IR} channels in requiring an ATP binding cassette (ABC) transporter protein subunit (SUR) in addition to the K_{IR} channel subunit to reconstitute channel activity [12]. Evidence suggests that the SUR subunit confers regulation by ADP, K^+ channel openers (diazoxide, etc.), and pharmacological agents such as sulphonylureas (glibenclamide, tolbutamide). The sulphonylureas bind to the SUR and reduce channel open probability by a poorly understood

mechanism [13]. The inward rectifier K_{IR6} subunit forms the ion conducting pore and binds the ATP that closes the channel [14, 15].

In addition to K_{ATP}^+ channel regulation by nucleotide concentration, the channel activity is also dependent on the concentrations of membrane phospholipids, including phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) and phosphatidyl inositol-3,4,5-trisphosphate (PIP_3) [15]. Although PIP_2 is only a minor constituent of membrane phospholipids, it is the key substrate for phospholipase C (PLC) that hydrolyses PIP_2 to DAG and IP_3 . The levels of PIP_2 in the membrane may determine the basal activity of the channels. This suggests that channel activity would be modulated by the pathway of receptor-coupled GTP-binding protein (G-protein) and PLC stimulation, which brings about depletion of the membrane PIP_2 pool. Thus, K_{ATP}^+ channels not only provide an interface for metabolic changes with electrical excitation, but also rapidly transmit extracellular signals through a receptor-coupled G-protein and PLC pathway via PIP_2 metabolism [15].

The effect of PIPs on ATP inhibition seems to involve an electrostatic mechanism because the negatively charged phosphate groups at the inositol ring seem to be critical for the phospholipid effect on ATP inhibition. Highly negatively charged PIP_3 and PIP_2 are very effective in reducing ATP inhibition, whereas phosphatidyl inositol-4-phosphate (PIP) is less potent and phosphatidyl inositol (PI) has no effect [15, 16]. Moreover, polycations such as Ca^{2+} , La^{3+} , polylysine, polyamines, and neomycin, which are known to bind to phospholipids and neutralise their negative charges, abolish the effect of PIPs on ATP inhibition [17, 18].

Therefore, taking all these results into consideration, the aim of the present study was to analyse the involvement of GPCR-PLC- PIP_2 pathways in the regulation of K_{ATP}^+ channels by testosterone in the Sertoli cells from immature rat testis.

Materials and Methods

Testosterone, testosterone-BSA, verapamil, EGTA and spermine were purchased from Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. The sulphonylureas glibenclamide and tolbutamide, and the K_{ATP} channel agonist, diazoxide, came from Research Biochemicals International, Natick, MA, USA. Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (HAM)(1:1) (D-MEM/F-12) came from Gibco BRL (Life Technology Rockville MD USA). Pertussis toxin was from List Biological Laboratories, Inc, Campbell, CA, USA and U73122 and U73343 from Biomol Research Labs, Inc. Plymont Meeting, PA, USA. $^{45}Ca^{2+}$ (specific activity 444 GBq/g) was from NEN Life Science Products Inc., Boston, MA, USA.

The experimental animals were immature Wistar rats (10-16 days of age). These animals were bred in our animal quarters and housed in an air-conditioned room (about 24°C) with controlled lighting (lights on from 06:00 to 20:00 h). Pelleted food (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and tap water were available to the mothers *ad libitum*.. The suckling rats were kept with their mothers until sacrificed by cervical dislocation.

Electrophysiological experiments. One whole testes was decapsulated and carefully stretched with two callipers, exposing 3 to 10 undisrupted seminiferous tubules and fixed to the bottom of one superfusion chamber, with 1ml/minute of Krebs Ringer bicarbonate (KRb) buffer with glucose (5 mmol/l), at 32°C, pH 7.4, equilibrated with $O_2:CO_2$ (5:95; v/v). The intracellular membrane potential (MP) recording was made according to von Ledebur et al [9]. Square current pulses of 0.5 nA, 0.5 Hz, and 250 ms duration were applied through the intracellular electrode for membrane resistance (R_0) estimation. The R_0 was measured with a bridge circuit according to Wassermann et al [7]. T-BSA, testosterone, glibenclamide, tolbutamide, spermine and $LaCl_3$ were applied topically to the bath after stabilisation of the resting potential for at least 2 minutes. Ethylene Glycol Tetraacetic acid

(EGTA) and/or U73122 was superfused on the cells for 3 minutes, before topical application of testosterone or LaCl_3 . Testes were preincubated in D-MEM/F-12 with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ of pertussis toxin during 3 hours before the MP registration. Each treatment was repeated at least four times with different cells, and variations in MP and R_0 were registered. The results are given as means \pm SEM.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiments. Testes from immature rats (10 days old) were removed and one gonad, alternately left and right, from each rat was used as control with the contralateral one being used as experimental. The testes (n=5) were weighed, decapsulated, and pre-incubated for 60 minutes in a Dubnoff metabolic incubator to equilibrate in KRb buffer with the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ at 32°C, pH 7.4 and gassed with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (5:95; v/v). The gonads were incubated for 1 minute in KRb with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and with or without testosterone, and for 2 minutes with spermine and 4 minutes with glibenclamide or tolbutamide. In some experiments the testes were preincubated for 10 minutes with diazoxide, verapamil or U73122; or 3 hours with medium D-MEM/F12 containing pertussis toxin. In order to halt the incubation, we used the technique reported by Batra *et al.* [19] with modifications. Two ml of cold buffer with lanthanum chloride (10 mM) at 2°C was added to the samples to stop the calcium fluxes. The supernatant was preserved and the testes were washed twice with the cold lanthanum chloride solution. The testes were removed to screw-cap tubes containing 1 ml of distilled water. They were frozen and afterwards boiled for 10 minutes. Aliquots of 100 μl were taken from each sample for radioactivity measurement in Aquasol 2 in an LKB rack beta liquid scintillation spectrometer model 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Sweden). The counting efficiency was 85-90%.

Testosterone and U73122 were diluted in ethanol to a final concentration of 0.1%. The application of ethanol up to a concentration of 40 $\mu\text{l/ml}$ was without significant effect on the MP (control: -44 ± 0.5 , ethanol: -43.8 ± 0.2) (6). A stock solution of

glibenclamide was prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO) and stored at -20°C until required. This stock solution was diluted in KRb to achieve the final concentration at the time of use. DMSO (0.1%) did not affect the membrane potential (data not shown). Diazoxide was freshly prepared for each experiment in 0.05 N NaOH and the final concentration of NaOH in the KRb was 0.001 N. The drug concentration used in each experiment is included in the legend of the figures. The lanthanum chloride solution, used to stop the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes, was calcium free and contained, in mM: NaCl 127.5, KCl 4.6, MgCl_2 1.2, LaCl_3 10, HEPES 10, and Glucose 11 [19].

Statistical evaluation was performed by a paired t-test and one-way ANOVA with Bonferroni's post test, using GraphPad InStat version 3.01, 32 bit for Windows 95/NT (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

In our experimental conditions, the basal electrical characteristics of impaled Sertoli cells from isolated seminiferous tubules of 15 day-old rats were resting potential -47.2 ± 0.8 mV ($n=136$); and membrane resistance, 12.7 ± 1.3 $\text{M}\Omega$ ($n=174$). The topical administration of unpermeant testosterone-bound to bovine serum albumin (T-BSA) (10 μM of testosterone) produced depolarization in the MP. (MP resting = -46.3 ± 0.7 ; after 30 seconds of T-BSA application = -44.4 ± 0.8 ; after 300 seconds = -42.4 ± 1.2 ($n=10$) the difference was significant $p < 0.05$).

K^+_{ATP} channel and testosterone action on MP, R_0 , and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake The depolarising effect of testosterone and glibenclamide [9] was also observed with the sulphonylurea tolbutamide (Fig. 1A). Again this effect was associated with an increase in R_0 (Fig. 1A insert). Testosterone and glibenclamide stimulate the Ca^{2+} uptake in isolated Sertoli cells [6, 8], this stimulatory effect was also observed in whole testes from 10 day-old rats. These actions were nullified by the presence of

the K^+_{ATP} opener, diazoxide (Fig. 1B). The presence of the diazoxide at different concentrations (50 – 200 μ M) did not significantly alter the basal uptake of $^{45}Ca^{2+}$ (data not shown).

VDCC blocking agents and the actions of testosterone and glibenclamide. The presence of VDCC blocking agents, verapamil, nifedipine, and Ni^{2+} caused a slight diminution of the MP depolarisation produced by testosterone (Fig. 2A). In addition, verapamil partially blocked the stimulatory effect of testosterone and glibenclamide on the $^{45}Ca^{2+}$ uptake by whole testes (Fig. 2B).

Involvement of PLC in the testosterone actions. The testosterone action on membrane potential and resistance in Sertoli cells was abolished by the presence in the perfusion buffer of the PLC inhibitor U73122 (Fig. 3A). Again, the effect of testosterone on $^{45}Ca^{2+}$ uptake was nullified by the presence of U73122 in the extracellular medium (Fig. 3B).

Effect of pertussis toxin on testosterone action. Whole testes preincubated during 3 hours with DMEM/F12 medium with or without pertussis toxin were used for MP registration. The presence of pertussis toxin (1 μ g/ml) in the preincubation medium inhibits the testosterone action on MP depolarization in these preparations (Fig. 4A). The stimulatory effect of testosterone (within 1 minute) on $^{45}Ca^{2+}$ uptake on testes preincubated with D-MEM/F12 medium was nullified by the presence of pertussis toxin (1 μ g/ml) in the preincubation period (Fig. 4B).

Regulation of the K^+_{ATP} channels by electrostatic interactions. The presence of the polycation spermine produced a significant MP depolarisation at 30 seconds (Fig. 5A) and an increase in the R_0 (Fig. 5A insert). Spermine produces an increase in $^{45}Ca^{2+}$ uptake within 1 minute (Fig 5B). The reduction of the positive Ca^{2+} charges on the membrane by the inclusion in the perfusion buffer of the chelating agent EGTA (0.5 mM), produced hyperpolarization of the membrane in the Sertoli cells with the reduction of R_0 (Fig. 6A). Topical application of $LaCl_3$ reversed the

EGTA effect (Fig. 6B), depolarising the MP. The application of testosterone at the physiological intratesticular concentration of 0.3 μM reversed the EGTA effect, producing a slight depolarisation that increased with the higher concentration of testosterone (Fig. 7A). This effect of testosterone was nullified by the presence of U73122 in the medium (Fig. 7B).

Discussion and Conclusions

The results reported here allow the following conclusions to be drawn: the actions of testosterone on the MP changes in Sertoli cells occur at the membrane, as is clearly demonstrated by the effect of the impermeant T-BSA. The involvement of K^+_{ATP} channels in the testosterone action on MP, R_0 , and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake becomes evident from the blocking effect of diazoxide, and the similitude of testosterone's action with those of the sulphonylureas. The testosterone effect seems to be mediated by a GPCR-PLC- PIP_2 pathway. The pertussis toxin and U73122 nullified the testosterone action on MP and R_0 , as well as on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake. Testosterone at physiological testicular concentrations reversed the hyperpolarization caused by the Ca^{2+} chelating agent EGTA (that exposes the membrane negative phospholipids charges). This action of testosterone was nullified by the PLC inhibitor U73122, blocking the PIP_2 hydrolysis and consequently preserving the highly negative charges of the PIP_2 pool of the membrane.

Glibenclamide and tolbutamide act on the SUR subunit of the channel and are potent inhibitors of the K^+_{ATP} channel activity; on the other hand, diazoxide, like other channel openers, stimulates the activity of the channel, acting on the SUR subunit. The clear-cut action of the sulphonylureas in our experiments presupposes the presence of K^+_{ATP} channels in the Sertoli cells. Furthermore, the blocking action of diazoxide on the testosterone effect strongly supports the participation of the K^+_{ATP} channels in testosterone's action.

Apart from the classical regulation of the K_{ATP}^+ channels by changes in nucleotide concentration, the channels are also modulated by membrane phospholipids such as PIP_2 [20, 15]. Therefore, the level of PIP_2 in the membrane may determine the basal activity of the channel. Thus, the K_{ATP}^+ channel can rapidly transmit extracellular signals (i.e. testosterone) through a receptor-coupled G-protein and PLC pathway, acting via PIP_2 metabolism. Receptor-mediated activation of PLC results in inhibition of K_{ATP}^+ -mediated currents [16]. This effect represents a mechanism of control of cell membrane excitability through phospholipids, which usually act as K_{IR} channel openers [17] and whose effectiveness is proportional to the number of negative charges on the head group in the anionic phospholipids [18].

In our experiments the action of testosterone on the Sertoli cells was nullified by the PLC inhibitor U73122 and by the G-protein inhibitor pertussis toxin, these results implicate the involvement of PLC- PIP_2 hydrolysis in the testosterone effect. PLC stimulation produces a depletion of the PIP_2 pool in the membrane and therefore increases the ATP inhibition of the channel.

The use of the chelating agent EGTA produces a strong hyperpolarization of the Sertoli cell membrane due to the screening of the Ca^{2+} surface charges. This effect can be blocked or even reversed by the presence of polycations, such as $LaCl_3$, that hinder the negative charges. These results are in accordance with the electrostatic interactions that regulate the K_{ATP}^+ channels [18]. Testosterone at a testicular physiological concentration (0.3 μM) also reversed the action of EGTA, an effect that was blocked by the presence of U73122. These results confirm that the action of testosterone results from its influence on the PLC- PIP_2 pathway, resulting in a diminution of the highly negative charges of PIP_2 in the membrane and modifying electrostatic interactions.

The functional receptors for testosterone on the surface of intracellular iAR-free macrophages of the cell line IC-21, reported by Benten *et al.* [21], are coupled to

intracellular Ca^{2+} homeostasis. Moreover, the data reveal that the membrane testosterone receptors belong to the class of membrane receptors that are coupled to phospholipase C (PLC) via a pertussis toxin-sensitive G-protein, because Ca^{2+} release can be blocked by both pertussis toxin and the PLC inhibitor U-73122 [19].

In myotubes testosterone produced fast (< 1 minute) and transient increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with an oscillatory pattern. Signals were blocked by the inhibitor of PLC, U73122. Cyproterone did not affect either the fast Ca^{2+} signal or the increase in IP_3 . Ca^{2+} increases could also be induced by the impermeant testosterone-BSA conjugate and the effect of testosterone was abolished in cells incubated with pertussis toxin. These results are consistent with a fast effect of testosterone, involving a G-protein-linked receptor at the plasma membrane and an IP_3 -mediated Ca^{2+} signal pathway in muscle cells [22].

Activation of PLC causes the enzymatic breakdown of PIP_2 , generating IP_3 and DAG; the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in turn functions as a ubiquitous second messenger with multiple effects [23, 24]. PIP_2 and Ca^{2+} may act conversely on the stability of the cytoskeleton network underneath the plasma membrane [25]. Actin-binding proteins, such as gelsolin, are activated by Ca^{2+} , consequently depolymerizing actin filaments (F-actin). PIP_2 antagonises these reactions to stabilise the actin filaments [15].

The seminiferous epithelium is a very complex tissue and the interrelationship between the Sertoli cells and germ cells movements (for example, the migration of spermatocytes towards the adluminal compartment) is accompanied by extensive restructuring of cell-cell, actin-based adherens junctions between Sertoli cells and germ cells, such as ectoplasmic specialisations [26-27]. All these extremely dynamic processes are basically regulated by FSH and testosterone, acting at different levels of the cellular organisation [1, 28].

The action of testosterone on the PLC-PIP₂ pathway, besides its regulatory effect on the K⁺_{ATP} channels, may have many far reaching consequences. As was stated above, PIP₂ and Ca²⁺ may have opposing effects on cytoskeletal stability facilitating the restructuring of the adherens junctions between the different cells of the seminiferous epithelium, thus enabling the extreme mobility of these cells and the continuous metamorphosis of germ cells (Fig. 8).

Our results point to an interaction of testosterone with specific membrane recognition moieties in the Sertoli cells. For more direct evidence of the presence of the membrane receptor it is necessary to isolate and characterise the testosterone receptor molecule. It is also necessary to isolate the K⁺_{ATP} channels in the Sertoli cell membrane and identify the K_{IR} and SUR subunit types.

Finally, the possibility of testosterone action on K⁺_{ATP} channels in male pancreatic β-cells should be analyzed (29).

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPERGS, CAPES and PROPESQ-UFRGS. The authors are grateful to Prof. João Batista Teixeira da Rocha for the generous gift of ⁴⁵Ca²⁺.

References

1. Walker WH. Nongenomic actions of androgens in Sertoli cells. *Curr Top Dev Biol* 2003; 56: 25-53.
2. Benten WPM, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* 1999; 13: 123-133.
3. Lieberherr M, Grosse B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 7217-7223.

4. Gorczynska E, Handelsman J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 1995; 136: 2052-2059.
5. Lyng FM, Jones GR, Rommerts FFG. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol Reprod* 2000; 63: 736-747.
6. Leite L, Luchi R, von Ledebur EICF, Loss ES, Wassermann GF. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Med Sci Res* 1999; 27: 25-28.
7. Wassermann GF, Monti Bloch L, Grillo ML, Silva FRMB, Loss ES, McConnell LL. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm Metab Res* 1992; 24: 326-328.
8. Miranda MJ, Liedke PER, Leite L, Loss ES, Wassermann GF. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. *Med Sci Res* 1998; 26: 703-706.
9. von Ledebur EICF, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ channels. *Horm Metab Res* 2002; 34: 550-555.
10. Maddocks S, Hargreave TB, Reddie K, Fraser HM, Kerr JB, Sharpe RM. Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of rat, guinea-pig, monkey and human. *Int J Androl* 1993; 16: 272-278.
11. Rommerts FFG. How much androgens is required for maintenance of spermatogenesis? *J Endocr* 1988; 116: 7-9.
12. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta

- cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-426.
13. Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999; 42: 903-919.
 14. Shyng SL, Nichols CG. Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol* 1997; 110: 655-664.
 15. Kakei M. Receptor-operated regulation of ATP-sensitive K⁺ channels via membrane phospholipid metabolism. *Curr Med Chem* 2003; 10: 235-243.
 16. Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* 1998; 282: 1141-1144.
 17. Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* 1998; 282: 1138-1141.
 18. Deutsch N, Matsuoka S, Weiss JN. Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *J Gen Physiol* 1994; 104: 773-800.
 19. Batra S, Sjogren C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci* 1983; 32: 315-319.
 20. Baukrowitz T, Fakler B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5842-5848.
 21. Benten WPM, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3113-3123.
 22. Estrada M, Espinosa A, Müller M, Jaimovich E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2003; 144: 3586-3597.

23. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium – a life and death signal. *Nature* 1998; 395: 645-648.
24. Lavevée N, Rogier CH, Becq F, Joffre M. Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3', 5'-adenosino monophosphates, and Follicle-stimulating hormone on cytosol calcium level in cultured immature rat Sertoli cell. *Biol Reprod* 1999; 61: 343-352.
25. Janmey PA. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol.* 1994; 56:169-191.
26. Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993; 147: 25-96.
27. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-74.
28. Silva FRMB, Leite LD, Wassermann GF. Rapid signal transduction in Sertoli cell. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 425-433.
29. Abate N, Haffner SM, Garg A, Peshock RM, Grundy SM. Sex steroids hormones, upper body obesity, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4522-4527.

Legends

Figure 1. Comparative effect of testosterone, glibenclamide, and tolbutamide on membrane potential (A), and resistance (A insert) of Sertoli cells in the seminiferous tubules (Means±SEM)(n=12). Effect of diazoxide (100 µM) on the testosterone and glibenclamide action on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by entire testes of rat (B). Paired t-test (A) as compared with resting values *(p<0.05). One Way Anova followed by Bonferroni test (B), as compared with the other groups *(p<0.05) (Means±SEM, n=6).

Figure 2. Effect of voltage-dependent calcium channel blocking agents, verapamil (25 µM), nifedipine (0.5 µM), and Ni^{2+} (100 µM) on the testosterone (10 µM) depolarizing action in the Sertoli cells membrane (A). Effect of verapamil (25 µM) on the stimulatory action of testosterone and glibenclamide in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in entered testes cells (B). It was made Paired t-test in A, and One Way Anova followed by Bonferroni post-test in B, as compared with the other groups *(p<0.05). (Means±SEM, n=6).

Figure 3. Effect of U73122 (2 µM) in the actions of testosterone (10 µM) on MP (A), resistance (A insert) and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake (B). It was made paired t-test in A, and t-test in B, as compared with the resting values *(p<0.05). (Means±SEM, n=5).

Figure 4. Response of Sertoli cells to testosterone with or without pertussis toxin (PT) on membrane potential (A) and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake (B). Representative response of Sertoli cells in A. One Way Anova followed by Bonferroni post-test in B, as compared with the others groups * (p<0.05). (Means±SEM, n=4).

Figure 5. Action of spermine on MP and R_0 of Sertoli cells membrane (A). Effect of 1 mM of spermine on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by entire testis (B). It was made paired t-test in A and in the insert; and One Way Anova followed by Bonferroni post-test in B, as compared with the control groups * (p<0.05). (Means±SEM, n=7).

Figure 6. Action of EGTA in the MP of Sertoli cells. Hyperpolarisation effect on the membrane by 500 µM of EGTA (A). Depolarisation of Sertoli cells by the topical application of LaCl_3 pretreated with EGTA (B). It was made paired t-test, as compared with the EGTA treated *(p<0.05); as compared with resting values #(p<0.05). (Means±SEM, n=6).

Figure 7. Effect of the topical application of different concentrations of testosterone in the membrane of Sertoli cells pretreated with EGTA (A). Inhibitory action of U73122 (2 µM) in this effect of testosterone (10 µM) (B). It was made paired t-test,

as compared with the testosterone treated $*(p<0.05)$ (A), as compared with resting $*(p<0.05)$ (B) (Means \pm SEM, n=6).

Figure 8. Hypothetical representation of the mechanism of action of testosterone on the Sertoli cell membrane. ER = endoplasmic reticulum, T = testosterone.

