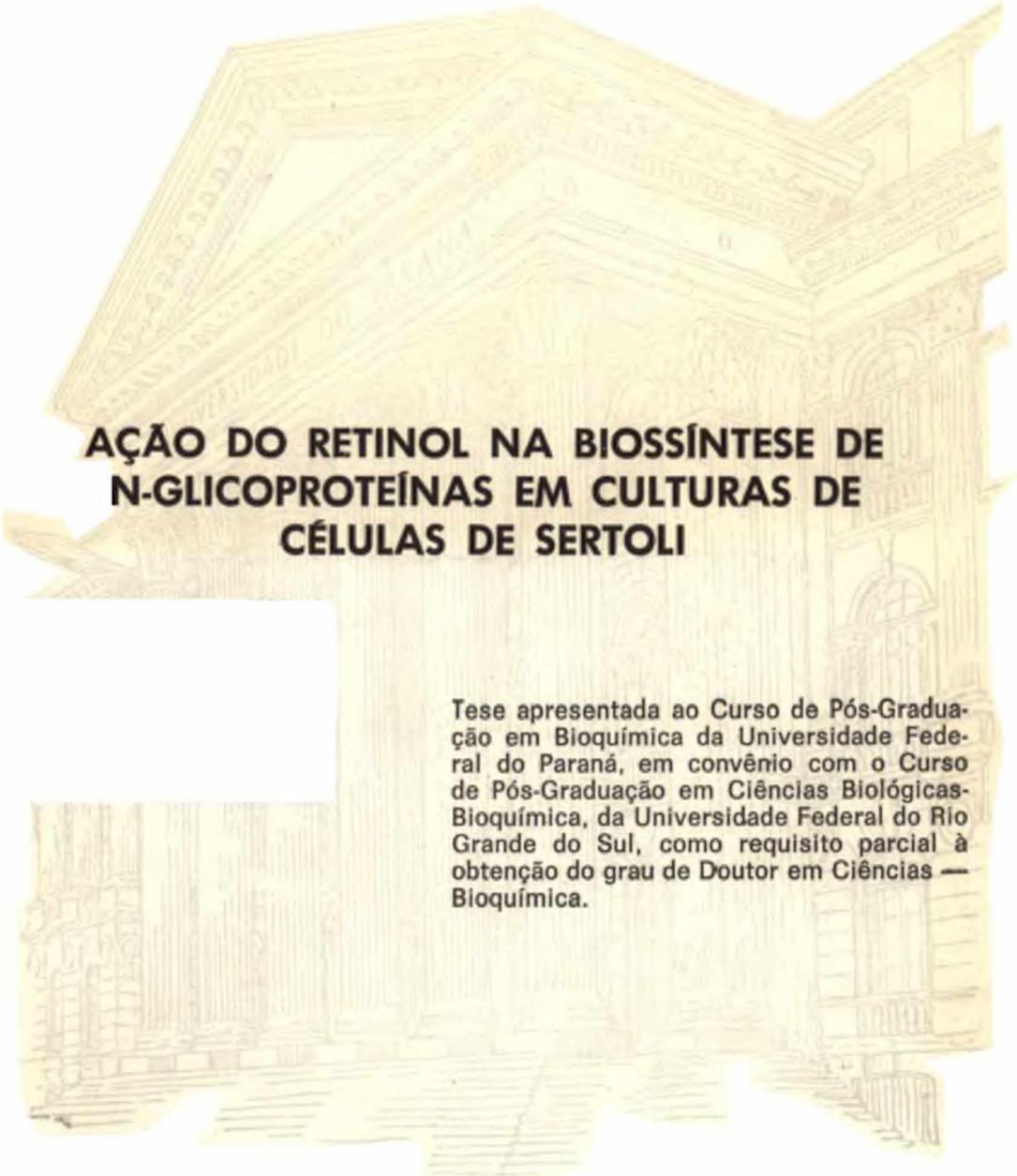


FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA



**AÇÃO DO RETINOL NA BIOSÍNTESE DE  
N-GLICOPROTEÍNAS EM CULTURAS DE  
CÉLULAS DE SERTOLI**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica.

**CURITIBA**

**1992**

FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA

**AÇÃO DO RETINOL NA BIOSÍNTESE DE  
N-GLICOPROTEÍNAS EM CULTURAS DE  
CÉLULAS DE SERTOLI**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica

CURITIBA

1992

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
E  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

AÇÃO DO RETINOL NA BIOSÍNTESE DE  
N-GLICOPROTEÍNAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA

Orientadora  
Profa. Dra. Elena Aida Bernard

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,  
Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Bioquímica.

Curitiba  
1992

FATIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA

AÇÃO DO RETINOL NA BIOSÍNTESE DE  
N-GLICOPROTEÍNAS EM CULTURAS DE  
CELULAS DE SERTOLI

Tese aprovada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor no Curso de  
Pós-Graduação em Bioquímica pela Comissão  
formada pelos Professores:

Orientador: Prof. Dr. Elens Aida Bernard  
UFRGS

Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry  
UFRGS

Prof. Dr. Jose Antunes Rodrigues  
USP

Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann  
UFRGS

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Madalena Baron  
UFPR

Curitiba, 27 de novembro de 1992.

Ao Beto, ao José Mauro e ao  
Fabrício, pela paciência e  
apoio durante os anos em que  
desenvolvi este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- A Professora Elena, por sua dedicação, orientação e amizade, que muito contribuíram para minha formação científica.
  
- Aos companheiros de grupo de pesquisa pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.
  
- Aos amigos do Departamento de Bioquímica, professores, funcionários e alunos, pelo apoio durante a realização desta tese
  
- Ao Professor Hélio Mauro M Maia, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.
  
- À Dra Ana Maria Guimarães, pela correção dos originais.
  
- Ao grupo do Dr. Guilherme Wassermann pelo fornecimento de ratos irradiados.
  
- À Dra Matilde A. Elena pelo auxílio na determinação histológica da atividade de fosfatase alcalina.
  
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade do Paraná por ter oportunizado a realização deste trabalho.
  
- À FINEP, FAPERGS, CNPq e PROPESP-UFRGS pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1 ESTRUTURA DO TESTÍCULO EM MAMÍFEROS	1
I.1.1 Desenvolvimento Testicular	1
I.1.2 O Ciclo do Epitélio Seminífero	4
I.1.3 Regulação da Espermatogênese	7
I.1.4 Células de Sertoli	11
I.2 GLICOPROTEÍNAS	16
I.2.1 Topografia da N-glicosilação de Proteínas	18
I.2.2 Fatores que Afetam o Controle da Glicosilação de Proteínas	23
I.2.3 Glicoproteínas no Testículo	29
I.3 RETINOL	31
I.3.1 Estrutura Química· Origem e Relação Estrutura e Função	32
I.3.2 Metabolismo da Vitamina A	33
I.3.2.1 Absorção: Transporte e Armazenamento	33
I.3.2.2 Captação pelas Células e Metabolismo	35
I.3.3 Retinol nos Testículos	40
I.3.4 Receptores Nucleares para a Vitamina A	48
I.3.5 Retinol e Glicoproteínas	53
I.3.5.1 Efeitos do Retinol Diretamente sobre a Síntese de Glicoproteínas em Células de Sertoli	56
I.4 OBJETIVOS	59
II. MATERIAIS E MÉTODOS	61
II.1 MATERIAIS	61

II.1.1	Soluções Salinas e Meio de Cultura	
	Utilizados	62
II.1.1.1	Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS-1)	62
II.1.1.2	Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS-2)	63
II.1.1.3	Solução Salina Fosfato Tamponada sem Cálcio e Magnésio (CMF-PBS)	63
II.1.1.4	Krebs Ringer Bicarbonato (KRB)	63
II.1.1.5	Meio de Cultura de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)	64
II.2	MÉTODOS	65
II.2.1	Obtenção de Testículos Enriquecidos em Células de Sertoli (SCE)	65
II.2.2	Isolamento de Túbulos Seminíferos SCE	65
II.2.3	Obtenção de Células de Sertoli	65
II.2.4	Cultura Primária de Células de Sertoli	67
II.2.5	Determinação da Pureza das Culturas de Células de Sertoli	67
II.2.5.1	Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina nas Culturas de Células de Sertoli	68
II.2.5.2	Choque Hiposmótico - Eliminação das Células Germinativas	70
II.2.6	Tratamento das Culturas de Células de Sertoli com Retinol	70
II.2.7	Obtenção de Microsomas de Células de Sertoli	71
II.2.8	Incubações com Precursores Radioativos	72
II.2.8.1	Incubações das culturas com [2- <sup>3</sup> H]manose	72
II.2.8.2	Incubações das culturas com [U- <sup>14</sup> C]leucina	74
II.2.8.3	Incubações das culturas com	

[metil- <sup>3</sup> H]timidina .....	74
II.2.8.4 Incubação das culturas com [5- <sup>3</sup> H]uridina .....	75
II.2.8.5 Incubações de microsomas de células de Sertoli com GDP-[ <sup>14</sup> C]manose .....	75
II.2.8.6 Incubações de túbulos seminíferos SCE com [1- <sup>3</sup> H]glicose .....	76
II.2.9 Coleta e Rompimento das Células .....	76
II.2.9.1 Por tripsinização .....	76
II.2.9.2 Por raspagem das células .....	76
II.2.10 Análises do "Pellet" Protéico Delipidado .....	77
II.2.10.1 Hidrólises alcalinas redutoras .....	77
II.2.10.1.1 Suave .....	77
II.2.10.1.2 Forte .....	77
II.2.10.2 Hidrólise ácida total .....	77
II.2.10.3 Determinação de ácidos siálicos .....	78
II.2.10.4 Tratamento com pronase .....	79
II.2.10.5 Tratamento com endo- $\beta$ -N-acetil glicosaminidase H .....	80
II.2.11 Cromatografias .....	80
II.2.11.1 Cromatografias descendentes em papel .....	80
II.2.11.2 Cromatografias em camada delgada .....	81
II.2.12 Determinação de Proteínas .....	81
II.2.13 Determinação de DNA .....	81
II.2.14 Determinação do RNA total .....	81
II.2.15 Determinação da Radioatividade .....	82
II.2.16 Revelação de Glicídios .....	82
II.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	83
III. RESULTADOS .....	84
III.1 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE [2- <sup>3</sup> H]MANOSE EM GLICOPROTEÍNAS E GLICOLÍPIDIOS DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI .....	84

III.1.1	Curvas de Tempo de Incorporação de [2- <sup>3</sup> H]manose	84
II.1.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada dos Glicolipídios Solúveis na Fase Inferior da Partição de Folch e em C/M/H <sub>2</sub> O (1:1:0,3)	87
III.2	CARACTERIZAÇÃO QUANTO A UNIÃO A CADEIA POLIPEPTÍDICA	87
III.3	CARACTERIZAÇÃO QUANTO A COMPOSIÇÃO EM OSES DAS PORÇÕES GLICÍDICAS	89
III.4	RETINOL EM CÉLULAS DE SERTOLI	92
III.4.1	Efeito do Retinol sobre a incorporação de [2- <sup>3</sup> H]manose em Glicolipídios e em glicoproteínas	92
III 4 1.1	Análise por cromatografia em camada delgada dos compostos lipofílicos intermediários na biossíntese de N-glicoproteínas	94
III.4.2	Efeito do tempo de Pré-Incubação com Retinol sobre a Incorporação de [2- <sup>3</sup> H]manose nos glicolipídios e nas Glicoproteínas de células de Sertoli	97
III.4.3	Efeito da Dose de Retinol sobre a Incorporação de [2- <sup>3</sup> H]manose nos Glicolipídios e nas N-Glicoproteínas de Células de Sertoli	97
III.4.4	Análise da Incorporação de [2- <sup>3</sup> H]manose em Células Tratadas ou Não com 10μM de Retinol por 48h -Efeito do Tempo de Incubação com o Açúcar Radioativo	100
III.4.5	Análise dos Oligossacarídios Ligados ao "Pellet" Protéico Delipidado de Células de Sertoli Tratadas ou Não com Retinol	100
III.4.6	Efeito do Retinol sobre a Incorporação de Metil-Timidina ao DNA, de Uridina ao RNA e de	

Leucina a Proteínas	103
III.4.6.1 Efeito da dose de retinol sobre a incorporação de [metil- <sup>3</sup> H]timidina ao DNA em células de Sertoli	103
III.4.6.2 Efeito do tempo de pré-incubação com 10 $\mu$ M de retinol sobre a incorporação de metil-timidina ao DNA de células de Sertoli	106
 III.5 ESTUDO DA BIOSÍNTESE DE N-GLICOPROTEÍNAS E DE SEUS MANOLIPÍDIOS INTERMEDIÁRIOS EM MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE	108
III.5.1 Determinação das Condições para o estudo da Incorporação de Manose a partir de GDP-[ <sup>14</sup> C]manose em Aceptores Endógenos de Frações Microsossomais de Células de Sertoli	108
III.5.1.1 Estabelecimento das Condições para a determinação da Atividade de dolicil-fosfato-manose sintase	108
III.5.1.2 Ação dos ions Mn <sup>+2</sup> e Mg <sup>+2</sup>	109
III.5.2 Estudo do Efeito da Variação da Concentração dos Substratos sobre a Formação de Manolipídios Intermediários e sobre a Biossíntese de N-glicoproteínas	111
III.5.2.1 Curva de concentração de dolicil- -fosfato	111
III.5.2.2 Curva de concentração de GDP- -[ <sup>14</sup> C]manose	111
 III.6 EFEITOS DO RETINOL SOBRE A ROTA DE N-GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE SERTOLI	115
III.6.1 Efeito do Retinol sobre a Atividade de Dolicil-Fosfato-Manose sintase	115
III.6.1.1 Análise por cromatografia em camada delgada dos compostos solúveis na fase	

inferior de Folch derivados da incubação de microsomas de células de Sertoli . . . . .	115
III.6.1.2 Efeito da concentração de dolíclil- -fosfato exógeno sobre a transferência de manose a partir de GDP-[ <sup>14</sup> C]manose para o dolíclil-fosfato - Efeito sobre a atividade de dolíclil-fosfato-manose sintase . . . . .	116
II.6.2 Efeito do Retinol sobre a Síntese do Dolíclil-PP-Oligossacarídeo e de Glicoproteínas	117
IV. DISCUSSÃO . . . . .	120
V. CONCLUSÕES . . . . .	137
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	139

## LISTA DE TABELAS

TABELA I.1	CLASSIFICAÇÃO DAS INTERAÇÕES CÉLULA- -CÉLULA NO TESTÍCULO .....	9
TABELA III.1	TIPO DE UNIÃO A CADEIA PEPTÍDICA .....	89
TABELA III.2	EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO COM 10 $\mu$ M DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE EM GLICOSE E GLICOPROTEÍNAS EM CÉLULAS DE SERTOLI .....	98
TABELA III.3	EFEITO DO RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE [METIL- <sup>3</sup> H]TIMIDINA AO DNA, DE [5,6- <sup>3</sup> H]URIDINA AO RNA E DE [U- <sup>14</sup> C]LEUCINA A PROTEÍNAS DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI .....	104
TABELA III.4	CONTEÚDOS DE DNA, RNA E PROTEÍNAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLE E TRATADAS COM RETINOL .....	104
TABELA III.5	RADIOATIVIDADE PRESENTE NO "POOL" ÁCIDO- -SOLÚVEL, APÓS O TRATAMENTO DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI POR 48H COM DIFERENTES DOSES DE RETINOL .....	106
TABELA III.6	EFEITO DO RETINOL SOBRE A TRANSFERÊNCIA DE MANOSE DE GDP-MANOSE PARA OS COMPOSTOS SOLÚVEIS NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH EM MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI .....	115

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA I.1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DOS TESTÍCULOS EM MAMÍFEROS	2
FIGURA I.2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR	4
FIGURA I.3	MAPA REPRESENTATIVO DOS ESTÁGIOS DA ESPERMATOGÊNESE . . . . .	6
FIGURA I.4	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS COMPONENTES ANATÔMICOS FUNCIONAIS DO TESTÍCULO HUMANO . . . . .	8
FIGURA I.5	REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA MEDIADAS POR FATORES DE CRESCIMENTO NOS TESTÍCULOS ... .	10
FIGURA I.6	REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA RELACIONADAS COM A DIFERENCIAÇÃO CELULAR NOS TESTÍCULOS	10
FIGURA I.7	PRODUTOS DA CÉLULA DE SERTOLI E FATORES QUE INFLUENCIAM A SUA PRODUÇÃO .	12
FIGURA I.8	ESTRUTURA DAS N-GLICOPROTEÍNAS ...	17
FIGURA I.9	ESTRUTURA DO DOLICOL NOS ANIMAIS SUPERIORES .....	18
FIGURA I.10	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DO OLIGOSSACARÍDIO LIPÍDIO NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO . . . . .	20

FIGURA I.11	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSAMENTO DE UMA N-GLICOPROTEÍNA	22
FIGURA I.12	FORMAÇÃO DO DOLICIL-FOSFATO	25
FIGURA I.13	ESTRUTURA QUÍMICA DO RETINOL	32
FIGURA I.14	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DESTINOS DO RETINOL E DO ÁCIDO RETINÓICO EM UMA CÉLULA HIPOTÉTICA DE VERTEBRADO	37
FIGURA I.15	ENVOLVIMENTO DO RETINOL COMO CARREGADOR E DOADOR DE UNIDADES DE MANOSE EM REAÇÕES DE TRANSFERÊNCIA GLICOSÍDICA EM MEMBRANAS BIOLÓGICAS	39
FIGURA I.16	MODELO CINÉTICO PARA A CAPTAÇÃO E O METABOLISMO DO RETINOL NAS CÉLULAS DE SERTOLI	43
FIGURA I.17	MECANISMO PROPOSTO PARA A AÇÃO DOS RETINÓIDES NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	47
FIGURA I.18	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA AÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO SOBRE O GENOMA	51
FIGURA II.1	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS E DE CÉLULAS DE SERTOLI	66
FIGURA II.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA PELO MÉTODO DE GOMORI EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	69
FIGURA II.3	OBTENÇÃO DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	71

FIGURA II.4	PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS LIPÍDICOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE N-GLICOPROTEÍNAS	73
FIGURA III.1	CURVA DE TEMPO DE INCORPORAÇÃO DE [2- <sup>3</sup> H]MANOSE EM GLICOPROTEÍNAS CELULARES E SECRETADAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	85
FIGURA III.2	CURVA DE INCORPORAÇÃO DE [2- <sup>3</sup> H]MANOSE EM GLICOLIPÍDIOS E NO "PELLET" PROTÉICO DELIPIDADO EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	86
FIGURA III.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH	88
FIGURA III.4	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM C/M/H <sub>2</sub> O (1:1:0,3)	88
FIGURA III.5	CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICÍDIOS NEUTROS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO "PELLET" PROTÉICO DELIPIDADO MARCADO COM [1- <sup>3</sup> H]GLICOSE	90
FIGURA III.6	CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICÍDIOS CARREGADOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO "PELLET" PROTÉICO DELIPIDADO MARCADO COM [1- <sup>3</sup> H]GLICOSE	91
FIGURA III.7	EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL (36h, 7µM) SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE EM	

	GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	93
FIGURA III.8	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH, OBTIDOS DE CÉLULAS DE SERTOLI TRATADAS OU NÃO COM RETINOL .	95
FIGURA III.9	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS EM C/M/H <sub>2</sub> O (1·1·0,3), OBTIDOS DE CÉLULAS TRATADAS OU NÃO COM RETINOL	96
FIGURA III.10	EFEITO DA DOSE DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE AOS GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	99
FIGURA III.11	CURVA DE TEMPO DE INCUBAÇÃO COM [2- <sup>3</sup> H]MANOSE EM CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLES OU TRATADAS COM 10μM DE RETINOL POR 48h . . . . .	101
FIGURA III.12	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS PRODUTOS DA ENDOGLICOSIDADE H ... ..	102
FIGURA III.13	INCORPORAÇÃO DE METIL-TIMIDINA AO DNA DE CÉLULAS DE SERTOLI TRATADAS POR 48h COM DIFERENTES DOSES DE RETINOL .... ..	105
FIGURA III.14	EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO COM 10μM DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE METIL-TIMIDINA AO DNA DE CÉLULAS DE SERTOLI . . . . .	107

FIGURA III.15	INCUBAÇÃO DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI PARA O ESTUDO DO EFEITO DOS IONS $Mn^{+2}$ E $Mg^{+2}$ SOBRE A AÇÃO DA DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE	110
FIGURA III.16	CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO (200 $\mu$ g DE PROTEÍNA)	112
FIGURA III.17	CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO (500 $\mu$ g DE PROTEÍNA)	113
FIGURA III.18	CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE GDP-[ $^{14}$ C]MANOSE	114
FIGURA III.19	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO SOLÚVEL NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH EM INCUBAÇÕES DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI	116
FIGURA III.20	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO EXÓGENO SOBRE A ATIVIDADE DE DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE EM MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLE E TRATADAS COM RETINOL	117
FIGURA III.21	AÇÃO DO RETINOL SOBRE A SÍNTESE DE DOLICIL-PP-OLIGOSSACARÍDIO E DE N-GLICOPROTEÍNAS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO EXÓGENO	118

## LISTA DE ABREVIATURAS

Além das abreviaturas rotineiramente utilizadas, como ions metálicos, unidades de tempo e métricas, cabe listar algumas outras empregadas neste trabalho.

ABP	proteína carregadora de andrógenos
ARAT	acil-CoA retinol-acil-transferase
C	clorofórmio
CPM	contas por minuto
CRABP	proteína celular carregadora de ácido retinóico
CRBP	proteína celular carregadora de retinol
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMEM	meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
Dol-P	dolicil-fosfato
Dol-PP-GlcNAC	dolicil-pirofosforil-N-acetil-glicosamina
Dol-PP-oligo	dolicil-pirofosforil-oligossacarídeo
Endo H	endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase H (endoglicosidase H)
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
GDP-Ma	guanosina-difosfato-manose
IGF-1	fator de crescimento semelhante a insulina -1
LRAT	lecitina : retinol-acil-transferase
M	metanol
MIS	substância inibidora do ducto de Muller
mRNA	RNA mensageiro
PBS	solução salina fosfato tamponada
PCA	ácido perclórico
P-Mod-S	proteína das células peritubulares moduladora da célula de Sertoli
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
POPOP	(1,4 di)-5-fenil-2-oxazolil-benzeno

PPO	2,5-difenil-oxazole
PTA	ácido fosfotungstíco
RAR- $\alpha$	receptor nuclear ( $\alpha$ ) para o ácido retinóico
RBP	proteína plasmática carregadora de retinol
RNA	ácido ribonucléico
SFB	soro fetal bovino
SCM (1 e 2)	glicoproteína sulfatada - 1 e 2
SCE	testículos enriquecidos em células de Sertoli
TCA	ácido tri-cloroacético
TGF- $\beta$	fator de crescimento de transformação - $\beta$
TLC	cromatografia em camada delgada
TTR	transtirretina
UDP-GlcNAc	uridina difosfato N-acetilglicosamina
UDP-Gl1	uridina difosfato glicose
VAD	animais deficientes em vitamina A
v/v	volume/volume

## RESUMO

Esta tese pretendeu investigar efeitos do retinol sobre a *N*-glicosilação de proteínas em células de Sertoli. As células de Sertoli desempenham papel importante no suporte e controle da espermatogênese. Além disso, parecem ser células alvo da vitamina A, substância que exerce efeitos modulatórios importantes sobre a espermatogênese. Na primeira fase deste trabalho, esboçaram-se algumas características das glicoproteínas de células de Sertoli. A hidrólise ácida forte de proteínas marcadas com [1-<sup>3</sup>H]glicose indicou a presença de galactose, fucose, manose, *N*-acetil-galactosamina e *N*-acetil-glicosamina. Também foi detectada a presença de ácido *N*-acetil-neuramínico. Cerca de 50% das glicoproteínas das células de Sertoli são *N*-glicosiladas. A seguir, estabeleceu-se em que condições as culturas de células de Sertoli, obtidas de ratos Wistar de 19 dias, incorporavam manose em glicoproteínas e nos glicolipídios intermediários. A análise cromatográfica das frações que continham os glicolipídios indicou a formação de dolícil-fosfato-manose e de dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo. Para determinação dos efeitos do retinol em culturas de células de Sertoli, estas foram pré-incubadas com 10 μM de retinol por 16, 36, 48 e 150h antes da adição do precursor radioativo. O retinol induziu um aumento significativo na incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo em todos os tempos estudados. Também foi detectado um aumento de incorporação de manose em glicoproteínas em 36 e 48h de pré-tratamento com retinol. No estudo do efeito da dose de retinol, o tratamento por 48h com 0,1, 1,0 ou 10,0 μM de retinol não alterou a incorporação de manose no dolícil-fosfato. O tratamento com 10,0 μM de retinol aumentou significativamente a incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-

-oligossacarídeo e em glicoproteínas. O aumento na glicosilação de proteínas, provocado pelo retinol, não foi devido a uma estimulação na síntese protéica o retinol não afetou os conteúdos celulares de DNA, RNA e proteínas. O retinol induziu um aumento significativo na incorporação de [metil-<sup>3</sup>H]timidina no DNA, mas não alterou a incorporação de [5,6-<sup>3</sup>H]uridina no RNA e de [U-<sup>14</sup>C]leucina em proteínas. A síntese de dolícil-fosfato-manose mesmo na presença de dolícil-fosfato exógeno, foi maior nas incubações de microssomas obtidos de células de Sertoli tratadas com retinol do que nas que utilizavam microssomas obtidos de células controle. Estes resultados mostram que o retinol provoca uma estimulação na atividade de dolícil-fosfato-manose sintase.

## ABSTRACT

This work reports studies about the effects of retinol in *N*-glycoprotein synthesis in Sertoli cells cultures. Sertoli cells are secretory cells that play a major role in support and control of spermatogenesis. Indeed, Sertoli cells seem to be the target of vitamin A's important modulatory effects on normal spermatogenesis. Strong acid hydrolysis of proteins labelled with [1-<sup>3</sup>H]glucose indicated the presence of galactose, fucose, mannose, *N*-acetylgalactosamine and *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylneuraminic acid was also detected. Fifty percent of glycoproteins are of the *N*-glycoside type. In order to study the action of retinol on the *N*-glycoprotein synthesis by Sertoli cells it was utilized [2-<sup>3</sup>H]mannose as precursor and the glycolipids intermediates were separated and characterized by TLC. Sertoli cell cultures obtained from 19-days-old rats were preincubated with 10 $\mu$ M retinol for 16, 36, 48 and 150h before adding the radioactive precursor. Retinol induced a statistically significant increase into dolichol-linked oligosaccharides; it also caused an increase in mannose incorporation into glycoproteins at 36 and 48h. A dose response study was conducted by preincubating cultures with 0.1, 1.0 or 10 $\mu$ M retinol for 48h. Retinol did not affect the mannose incorporation into dol-P-man, however retinol 10 $\mu$ M increased mannose incorporation into dol-PP-oligosaccharides and into glycoproteins. The augment in protein glycosilation is not due to retinol action on protein synthesis: retinol had no effect on cellular contents of DNA, RNA and proteins. Retinol induced a significant increase in [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine into DNA, but had no effect on incorporation of [5,6-<sup>3</sup>H]uridine into RNA and of [U-<sup>14</sup>C]leucine into proteins. Dol-P-man synthesis was higher in microsomes of treated cells than in control cells. These results showed that the retinol effect was at least due to stimulation of dolichyl phosphomannose syntase.

TRABALHOS PUBLICADOS EM TEMAS CONEXOS.

DEL PINO, J C ; TRINDADE, V M T., GUMA, F.C.R e BERNARD, E.A Biochemical studies of ovary glycoproteins of the cattle tick *Boophilus microplus* *Insect Biochemistry* v 19, p 657-661, 1989

GUMA, F.C R., GUARAGNA, R , ROSA, N.B S.; MORAES, G G.S.; GAMALLO, J.L.; PERRY, M.L.S e BERNARD, E.A. Glycoprotein biosynthesis by testes of 40-day-old rats subjected to protein malnutrition. *International Journal of Andrology* v 13, p.389-397, 1990.

TRABALHOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO:

GUMA, F C.R. e BERNARD, E.A Effects of retinol on glycoprotein sunthesis in Sertoli cells in culture.

GUMA, F C R. e BERNARD, E.A Effects of retinol on glycoprotein synthesis in Sertoli cells in culture: Dolichyl phosphomannose synthase activation.

- Trabalho Aceito para Publicação com Correções na Medical Science Research

GUMA, F.C R.; MARTINI, L.H. e BERNARD, E.A. Retinol effects in Sertoli cells: [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA.

## I INTRODUÇÃO

### I.1 ESTRUTURA DO TESTÍCULO EM MAMÍFEROS

O testículo dos mamíferos é dividido em duas partes: o interstício e os túbulos seminíferos. No interstício, entre muitos tipos celulares, estão as células de Leydig, responsáveis pela síntese de andrógenos, hormônios que estão envolvidos no desenvolvimento das características sexuais masculinas primárias e secundárias e no processo de espermatogênese. Os túbulos seminíferos, no adulto, são constituídos por uma população não proliferativa de células suporte (células de Sertoli) e por uma população proliferativa, composta pelas células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides).

No processo espermatogénico, as células germinativas, sempre em estreita associação com as células de Sertoli, migram para o lúmen dos túbulos seminíferos, enquanto se transformam de espermatogônias em espermatozóides (FIGURA I 1).

#### I 1.1. Desenvolvimento Testicular:

O desenvolvimento dos testículos em mamíferos é um processo longo e contínuo, que inicia no feto, com a diferenciação sexual das gônadas. O desenvolvimento pós-natal é dividido em três fases: 1) impúbere; 2) pré-púbere; 3) adulta. A duração destas fases difere de espécie para espécie (COUROT e KILGOUR, 1984). Existem características histológicas específicas de cada uma das fases do desenvolvimento dos túbulos seminíferos. No feto e

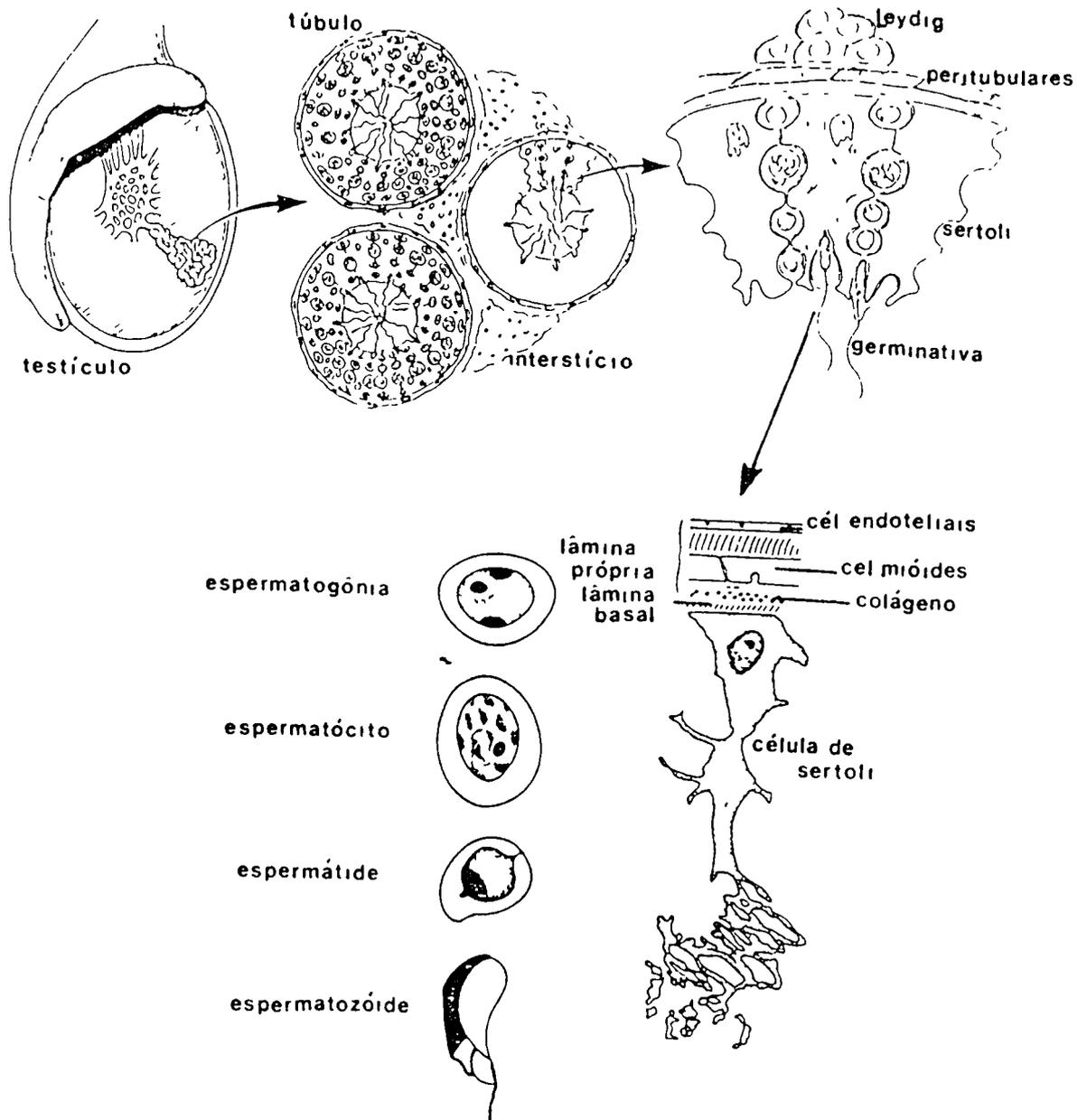


FIGURA I.1 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DOS TESTÍCULOS EM MAMÍFEROS

Os túbulos seminíferos estão representados em maior detalhe. As células germinativas em diferentes estágios do desenvolvimento estão localizadas entre as células de Sertoli e circundadas pelo seu citoplasma. O limite do túbulo é formado pela lâmina basal e pela lâmina própria, subdivididas em diversas camadas.

Reproduzido com modificações de SKINNER (1991) e TOEBOSCH (1990).

em testículos impúberes, os túbulos são povoados por dois tipos celulares: células de suporte, precursoras das células de Sertoli do adulto, e células germinativas primordiais ou gonócitos. Os núcleos das células de suporte se localizam na periferia dos túbulos e o seu citoplasma se direciona para o centro. Nesta fase, os túbulos ainda não têm lúmen. As células germinativas ficam inseridas no citoplasma das células de suporte. O número de células de suporte é muito maior que o de células germinativas, existindo mitoses nas duas populações celulares. A velocidade máxima de proliferação das células de suporte ocorre antes do início da espermatogênese e cessa nas primeiras fases deste processo (COUROT e KILGOUR, 1984).

A fase pré-púbere é caracterizada por um período de rápido crescimento testicular, quando se inicia a espermatogênese. A população celular das gônadas aumenta drasticamente, os gonócitos se transformam em espermatogônias, iniciando as três fases do desenvolvimento das células germinativas. Na *primeira fase*, as espermatogônias indiferenciadas proliferam, dando origem a espermatogônias diferenciadas e a uma nova geração de espermatogônias indiferenciadas. As espermatogônias diferenciadas dão origem aos espermatócitos. Na *segunda fase*, os espermatócitos sofrem divisões meióticas formando espermatídes haplóides. Na *terceira fase*, as espermatídes se diferenciam em espermatozóides em um processo chamado de espermiogênese (CLERMONT, 1972).

Os complexos juncionais que se formam entre células de Sertoli adjacentes dão origem à barreira hemato-testicular, dividindo os túbulos seminíferos em dois compartimentos: o basal, que contém espermatogônias e espermatócitos primários, e o adluminal, que contém espermatócitos e espermatídes (FIGURA I.2). Da passagem seletiva de substâncias através desta barreira e da secreção ativa de compostos produzidos pelas células de Sertoli, provavelmente

resulta o meio ideal para o desenvolvimento das células germinativas (SKINNER, 1991)

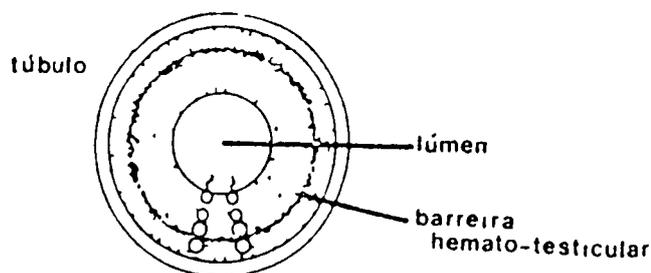


FIGURA I 2 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR

Reproduzido de TOEBOSCH (1990).

As células presentes na primeira fase da espermatogênese estão todas no compartimento basal dos túbulos seminíferos. Durante a primeira fase da meiose, os espermatócitos são transportados através da barreira hemato-testicular e entram no compartimento adluminal (RUSSEL e PETERSON, 1985). As espermátides, haplóides, não se dividem mais, sofrendo um processo de diferenciação via Golgi-, cap-, acrossoma- e uma fase de maturação para se transformarem em espermatozóides (LEBLOND e CLERMONT, 1952 a,b)

#### I 1.2 O Ciclo do epitélio seminífero

A análise da seção transversal de um túbulo seminífero de um rato adulto mostra uma ou duas gerações de espermatogônias, espermatócitos e espermátides, além das células de Sertoli. Os diferentes tipos de células germinativas não ocorrem randomicamente, mas determinados estágios de espermátides estão associados com gerações definidas de espermatócitos e espermatogônias. Em ratos, foram descritos 14 tipos de associações, chamadas de

estágios do epitélio seminífero . Os estágios aparecem em sequência temporal definida . A série completa dos estágios corresponde a um ciclo do epitélio seminífero, que em ratos dura cerca de 13 dias (LEBLOND e CLERMONT, 1952b; CLERMONT, 1972; PARVINEN, 1982). A espermatogênese completa, em ratos, leva aproximadamente 50 dias (CLERMONT, 1972) (FIGURA I.3)

Células de Sertoli e germinativas interagem intensamente, e as propriedades das células de Sertoli variam durante os diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (PARVINEN, 1982).

A ligação máxima do FSH às células de Sertoli ocorre no estágio I, sendo relativamente baixa no estágio VII. A secreção de proteínas pelas células de Sertoli também é estágio-específica. O ativador de plasminogênio é secretado principalmente nos estágios VII e VIII, a secreção da proteína cíclica-2 (CP-2) ocorre principalmente no estágio VI, sendo negligenciável nos outros estágios. A secreção de ABP (proteína carregadora de andrógenos) eleva-se entre os estágios VII e XI, sendo máxima no estágio VII, embora esta proteína seja secretada em quantidades consideráveis nos outros estágios do ciclo (PARVINEN, 1982). A secreção de inibina diminui nos estágios VII e VIII (GONZALES et al, 1989) A influência do estágio do epitélio seminífero sobre a secreção de produtos das células de Sertoli pode indicar a influência de uma determinada proteína para o desenvolvimento de um tipo específico de célula germinativa e/ou efeitos das células germinativas sobre as células de Sertoli (TOEBOSCH, 1990). Estas hipóteses podem apontar o fato de que as células de Sertoli "in vivo" tem uma atividade cíclica dependente de sinais extracelulares.

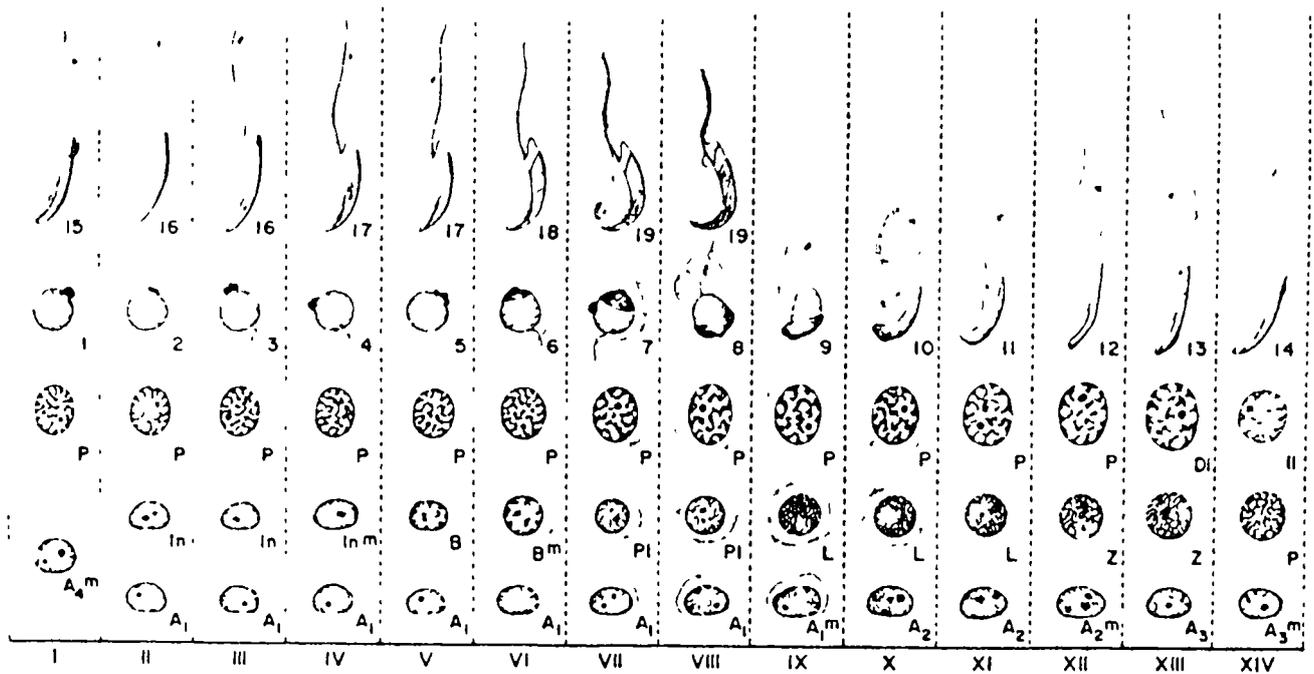


FIGURA I 3 MAPA REPRESENTATIVO DOS ESTÁGIOS DA ESPERMATOGÊNESE

Os números romanos representam os diferentes estágios do epitélio seminífero (I-XIV). As letras indicam os tipos celulares: A, espermatogônia tipo A; In, espermatogônia tipo intermediário; B, espermatogônia tipo B, Pl, espermatócito pré-leptotênico; L, espermatócito leptotênico; Z, espermatócito zigotênico, P, espermatócitos paquitênicos; Di, diacinese; II, espermatócito secundário; 1-19, estágios da espermiogênese.

Reproduzido de PARVINEN (1982).

### I.1.3 Regulação da espermatogênese

Os dois compartimentos testiculares respondem a gonadotrofinas diferentes. As células de Sertoli, nos túbulos seminíferos, respondem ao FSH. As células de Leydig, no interstício, respondem ao LH, produzindo testosterona.

A iniciação da espermatogênese e a sua manutenção são dependentes de FSH e testosterona. As células de Sertoli possuem receptores para estes dois hormônios, sendo geralmente aceito que os efeitos do FSH e da testosterona na espermatogênese são mediados pelas células de Sertoli. O FSH e a testosterona exercem múltiplos efeitos nas células de Sertoli, como por exemplo, a estimulação da produção de proteínas como a ABP e a inibina. A glicoproteína inibina inibe a secreção de FSH pela hipófise, formando um sistema de "feed-back" negativo entre os testículos e a hipófise. Outro importante "feed-back" negativo envolve a inibição da liberação de gonadotrofinas pela testosterona circulante (TOEBOSCH, 1990). A FIGURA I.4 representa esquematicamente o descrito acima.

A habilidade de células interagirem e se comunicarem é um fenômeno biológico desenvolvido com a evolução dos organismos multicelulares. As interações célula-célula podem ser classificadas em três categorias: ambientais, nutricionais e regulatórias (SKINNER, 1991). A TABELA I.1 mostra as interações possíveis entre as principais células testiculares. As mais importantes interações ambientais ocorrem entre células de Sertoli e germinativas e entre células de Sertoli e peritubulares. Entre células de Sertoli e germinativas existe também uma interação nutricional. Interações regulatórias ocorrem entre todos os tipos celulares considerados.

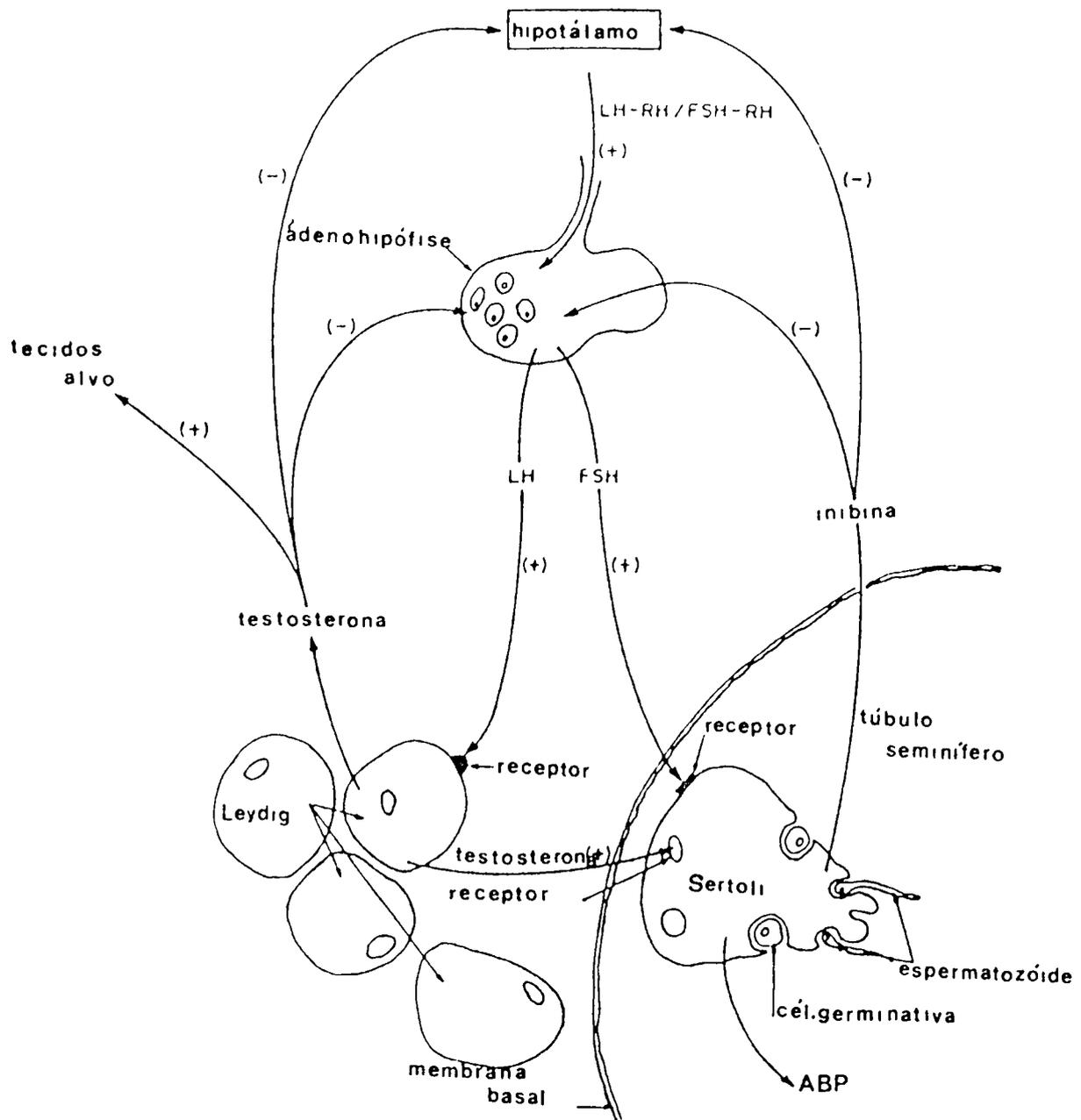


FIGURA I 4      DIAGRAMA      ESQUEMÁTICO      DOS      COMPONENTES  
 ANATÔMICOS      FUNCIONAIS      DO      TESTÍCULO  
 HUMANO

LH-RH/FSH-RH, fatores liberadores das gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; (+) indica efeito estimulatório e (-) indica efeito inibitório do hormônio

Reproduzido de SMITH et al.(1983).

TABELA I 1

CLASSIFICAÇÃO DAS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA NO TESTÍCULO:

Interação	Ambiental	Nutricional	Regulatória
Sertoli/ Germinativa	sim	sim	sim
Peritubular/ Sertoli	sim	não	sim
Sertoli/ Leydig	não	não	sim
Leydig/ Peritubular	não	não	sim

Tabela reproduzida de SKINNER (1991).

Além dos citados, muitos outros hormônios e fatores de crescimento exercem seus efeitos sobre as células de Sertoli, como por exemplo a insulina e IGF-I (insulin-like growth factor) cujos receptores nestas células já foram identificados (BORLAND et al., 1984; OONK e GROOTEGOED, 1987, 1988). Os fatores de crescimento podem atuar como fatores autócrinos e parácrinos regulando as interações entre vários tipos de células testiculares. Uma proposta de regulação está na FIGURA I.5, entretanto deve-se observar que a maioria destas interações requer ainda investigações para demonstrar sua importância fisiológica.

A análise das interações célula-célula no testículo mostra que as ações do sistema endócrino são frequentemente e indiretamente mediadas por interações celulares locais (FIGURA I.6). As células de Leydig respondem ao LH aumentando a produção de andrógenos. A resposta ao LH, no entanto, desencadeia uma cascata de eventos: os andrógenos atuam nas células peritubulares promovendo a produção de P-ModS (proteína reguladora da célula de Sertoli), que por sua vez, atua nas células de Sertoli, influenciando ações essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. O FSH, atuando nas células de Sertoli também produz efeitos indiretos em outras células testiculares, influenciando o desenvolvimento das células germinativas por alterar a

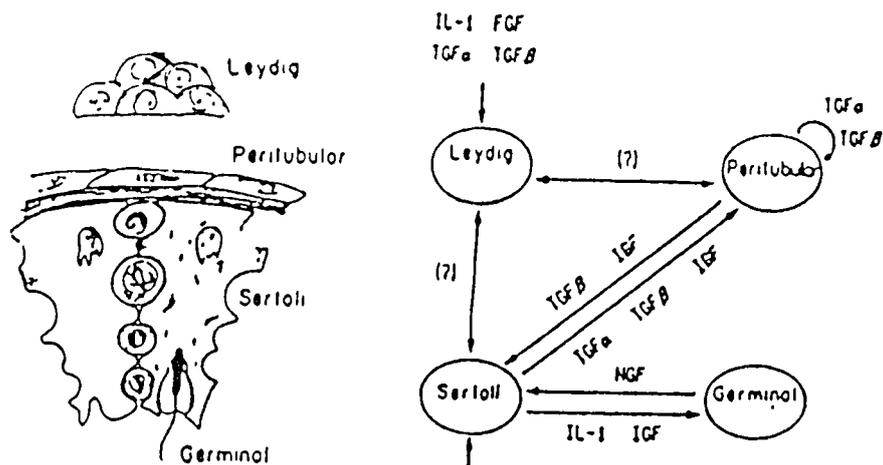


FIGURA I.5 REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA MEDIADAS POR FATORES DE CRESCIMENTO NOS TESTÍCULOS:

IL-1, interleuquina 1; TGF, fator de crescimento de transformação celular; IGF, fator de crescimento semelhante a insulina; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; NGF, fator de crescimento de nervos

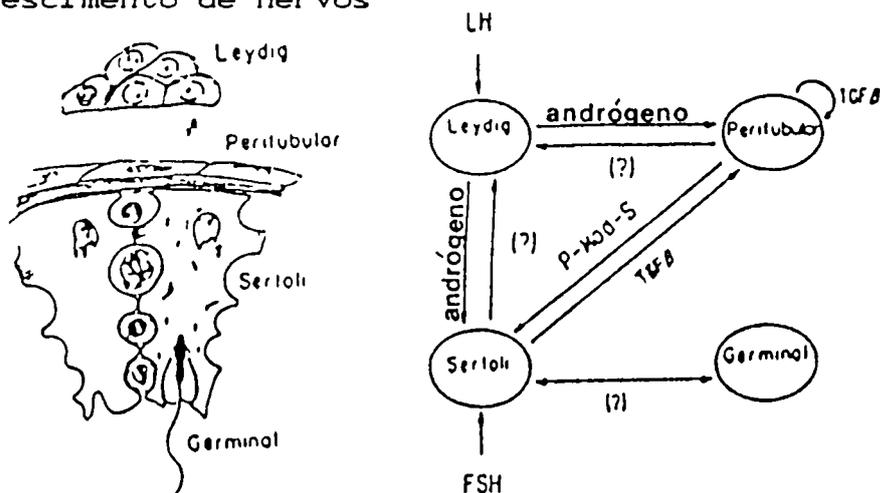


FIGURA I 6 REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA RELACIONADAS COM A DIFERENCIAÇÃO CELULAR NOS TESTÍCULOS:

P-mod-S, proteína moduladora da célula de Sertoli.  
Figuras retiradas de SKINNER (1991).

interação entre as células de Sertoli e as mesmas. As células de Sertoli também parecem produzir fatores FSH-dependentes que podem influenciar as células de Leydig (SKINNER, 1991).

#### I 1 4. Células de Sertoli:

Enrico Sertoli, em 1865, foi o primeiro autor a descrever a existência de uma população de células somáticas no testículo com o possível papel de suporte e nutrição das células germinativas. Sertoli estabeleceu, depois de dissociar o epitélio seminífero com cloreto de mercúrio, que as células de suporte eram células piramidais com ramificações que se estendiam pelo lúmen do túbulo, mantendo estreita associação com as células germinativas (FAWCETT, 1975).

O uso de técnicas de microscopia eletrônica mostrou que a morfologia das células de Sertoli era muito mais complexa. Perto da base, células de Sertoli adjacentes formam junções estreitas (tight junctions) responsáveis pela formação da barreira hemato - testicular. No lado adluminal da barreira, as células de Sertoli possuem projeções (ramificações) que circundam as células germinativas (RUSSEL e PETERSON, 1985).

KERR e DE KRETZER (1975) mostraram que as gotas de gordura presentes no citoplasma das células de Sertoli apresentam variações com o estágio do ciclo espermatogênico. Estudos auto-radiográficos em camundongos demonstraram a existência de variações nos padrões de marcação com [<sup>3</sup>H]uridina e [<sup>3</sup>H]aminoácidos em células de Sertoli dentro de áreas adjacentes ao epitélio seminífero, indicando atividades metabólicas diferentes (KIERSZENBAUM e TRES, 1981) Variações cíclicas, estágio-dependentes, foram observadas na ultra-estrutura das células de Sertoli, refletindo mudanças na atividade da célula necessárias para a manutenção da espermatogênese (KERR, 1988).

Em ratos, as células de Sertoli, se multiplicam durante os períodos fetal e pré-puberal, não proliferando mais aproximadamente a partir dos 16 dias de vida (STEINBERGER e STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982) Durante a fase inicial da espermatogênese, até aproximadamente 16 dias de idade no rato, as células de Sertoli sofrem um processo de amadurecimento, continuando a crescer em tamanho e formando ramificações, tornando-se aptas a exercerem suas funções de suporte e nutrição das células espermatogênicas.

Vários produtos secretórios da célula de Sertoli estão representados na FIGURA I.7. As células de Sertoli produzem metabólitos energéticos, como o lactato, que é usado pelas células germinativas, e uma série de proteínas com funções importantes na espermatogênese

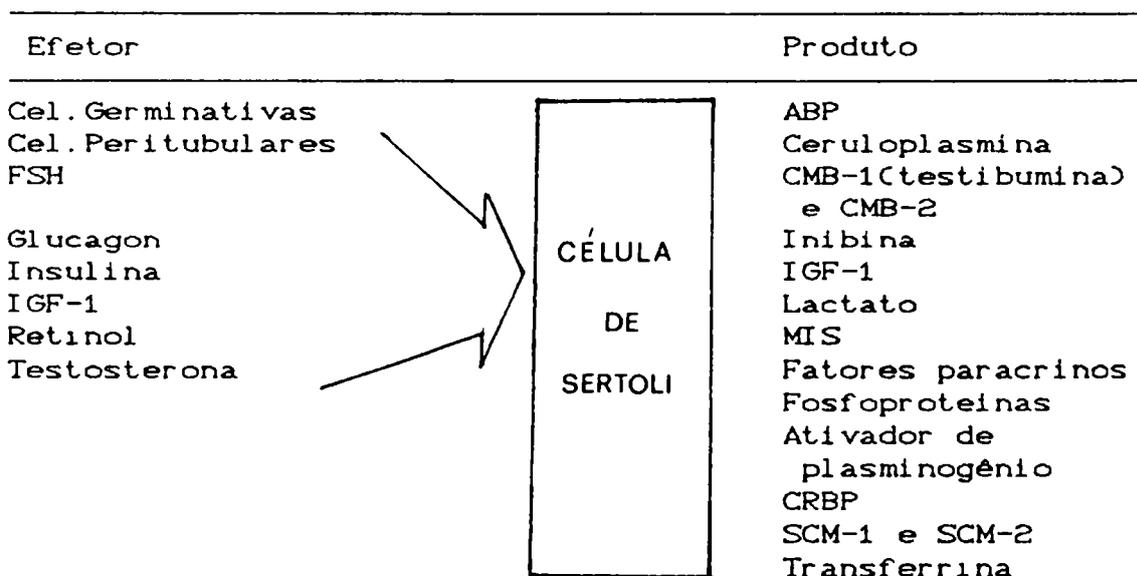


FIGURA I.7 PRODUTOS DA CÉLULA DE SERTOLI E FATORES QUE INFLUENCIAM A SUA PRODUÇÃO

WRIGT et al.(1981) estudaram os produtos de secreção da célula de Sertoli, demonstrando a existência de secreção de proteínas específicas testiculares (encontradas somente no fluido luminal) e de outras proteínas que são encontradas também na circulação geral. A produção e secreção de muitos destes compostos é regulada por diversos fatores hormonais, incluindo FSH e testosterona e por interações entre os diversos tipos celulares presentes no testículo. Esta regulação tem lugar em diversos níveis do processo de produção, na transcrição, na tradução e em modificações pós-translacionais.

O ABP foi um dos primeiros produtos da célula de Sertoli a ser identificado. É geralmente aceito que o FSH e a testosterona estimulam a secreção e a expressão do mRNA do ABP "in vivo" Em culturas de células de Sertoli, o FSH é o principal regulador (PEREZ-INFANTE et al.,1986; JOSEPH et al ,1988).

A transferrina é outro dos produtos da célula de Sertoli, sendo a sua secreção estimulada por FSH, insulina, retinol e testosterona (SKINNER e GRISWOLD, 1982). Um pequeno efeito estimulatório produzido pela testosterona foi descrito por PEREZ-INFANTE et al.(1986) e HUGGENVIK et al.(1987).

A inibina é um membro da família TGF- $\beta$  de fatores de crescimento que inclui outros produtos da célula de Sertoli: a ativina, a substância inibidora do ducto de Müller (MIS) e o próprio TGF- $\beta$ . A inibina é constituída por 2 subunidades, chamadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Existem dois tipos de subunidade  $\beta$  ( $\beta_a$  e  $\beta_b$ ), que formam duas inibinas diferentes. TOEBOSCH et al.(1989) estudaram os efeitos do FSH e da testosterona sobre a produção e secreção de inibina, concluindo que o FSH estimula a produção e a secreção de inibina, enquanto a testosterona parece não ter efeito. As células peritubulares também parecem influenciar a expressão do mRNA da subunidade  $\alpha$  da inibina (TOEBOSCH et al., 1988).

As ativinas (dímeros  $\beta\alpha\beta\alpha$  e  $\beta\alpha\beta\beta$ ) têm atividade estimulatória sobre a liberação de FSH pelas células hipofisárias (TOEBOSCH et al., 1988). O TGF- $\beta$  é constituído por duas subunidades muito semelhantes à cadeia  $\beta$  da inibina e sua ação é semelhante à da ativina (MASSAGUÉ, 1987).

Além do papel no sistema de "feed-back" cérebro-testículo (CULLER e NEGRO-VILAR, 1988), a inibina testicular parece estar envolvida em ações parácrinas no testículo HSUEH et al. (1987) descreveram a ação das inibinas e ativinas na modulação da esteroidogênese pelas células de Leydig.

O transporte intracelular de substâncias produzidas pelas células de Sertoli parece ser essencial para a espermatogênese. Proteínas produzidas pelas células de Sertoli, como já descritas anteriormente, têm efeitos sobre o desenvolvimento das células germinativas. Sítios específicos para ligação do ABP foram encontrados em espermatócitos paquitênicos e, para a transferrina, em espermatócitos e espermátides (STEINBERGER et al., 1984; SYLVESTER e GRISWOLD, 1984). A presença de receptores para a transferrina nas células germinativas e a complexa regulação da secreção de transferrina pelas células de Sertoli sugerem que a transferrina testicular e/ou o ferro sejam importantes no desenvolvimento das células germinativas, principalmente porque a transferrina sérica não pode ser transportada através da barreira hemato-testicular. Outras possíveis funções para a transferrina, como fator de crescimento ou agente protetor, necessitam de maiores investigações (TOEBOSCH, 1990).

FUGASSA et al (1987) demonstraram que a triiodotironina ( $T_3$ ) diminui a produção de ABP por culturas de células de Sertoli, sugerindo uma ação regulatória direta dos hormônios da tireóide sobre a função reprodutiva masculina.

As células peritubulares parecem estimular a secreção

de ABP por culturas de células de Sertoli, tratadas ou não com FSH; existindo uma correlação positiva entre o número de células peritubulares adicionadas as culturas de células de Sertoli e a quantidade de ABP secretada (HUTSON e STOCCO, 1981).

LACROIX e FRITZ (1982) estudaram o controle da síntese e da secreção por células de Sertoli de uma glicoproteína com ação de ativador de plasminogênio, demonstrando o efeito estimulador produzido pelo FSH e pelo dibutiril AMP cíclico. MARZOWSKI, et al.(1985) sugeriram a existência de duas formas de ativador de plasminogênio, sintetizadas por células de Sertoli em cultura, uma secretada e outra que seria uma enzima associada à membrana. A enzima de membrana deve atuar como re-estruturadora de componentes de membrana nas interfaces célula-célula. A secretada atuaria em sítios mais distantes do epitélio seminífero ou teria uma atividade fibrinolítica como os ativadores de plasminogênio séricos

## I 2 GLICOPROTEÍNAS

A formação de proteínas biologicamente ativas envolve muitas etapas, além da síntese da cadeia polipeptídica. Uma das mais complexas e, talvez por isto, uma das mais intensamente estudadas é a glicosilação. Um grande número de proteínas de diversas origens e funções biológicas são conhecidas por conterem carboidratos ligados covalentemente, sendo classificadas como glicoproteínas. Existem duas classes principais de glicoproteínas: as *N*-glicoproteínas, em que a porção carboidrato, iniciada por *N*-acetil-glicosamina, está ligada ao átomo de nitrogênio amida da cadeia lateral de uma asparagina e as *O*-glicoproteínas, nas quais a porção carboidrato, iniciada por uma *N*-acetil-galactosamina, está ligada ao átomo de oxigênio da cadeia lateral de uma serina ou treonina. As *O*-glicoproteínas de fungos e leveduras diferem das dos animais superiores, por apresentarem a porção carboidrato ligada à cadeia polipeptídica através de uma ligação  $\alpha$ -manosil. Existem também glicoproteínas, como o colágeno, que não podem ser classificadas dentro das duas classes principais. No colágeno, a porção glicídica está ligada ao átomo de nitrogênio amina da cadeia lateral de uma lisina por uma ligação  $\beta$ -galactosil.

As *N*-glicoproteínas podem ser divididas em duas classes principais: as complexas que contêm *N*-acetil-glicosamina, manose, galactose, fucose e ácido siálico, e as com alto conteúdo em manose (high mannose) que contêm *N*-acetil-glicosamina e uma quantidade variável de unidades de manose. Os dois tipos têm sempre como núcleo comum o pentassacarídeo mostrado na FIGURA I 8, (STANELONI e LELOIR, 1982).

Após LELOIR et al. (1950) terem descoberto os nucleotídeos-açúcares, iniciaram-se os estudos sobre as glicosil-transferases, enzimas que catalisam a transferência

de unidades de açúcares para glicoproteínas e oligossacarídeos. Esta transferência, em muitos casos, não é feita diretamente do nucleotídeo-açúcar para estes compostos. O glicídio é ligado intermediariamente a um lipídio (ROTHFIELD e ROMEO, 1971; LENNARZ e SCHER, 1972).

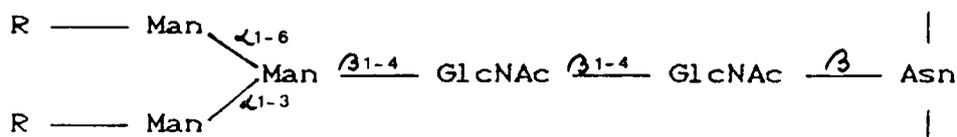


FIGURA I 8. ESTRUTURA DAS N-GLICOPROTEÍNAS

R = (Man)<sub>n</sub> → Alto conteúdo em manose..

R = (Sial) (Gal) GlcNAc → Complexas; os resíduos entre parenteses podem estar ausentes.

A síntese das N-glicoproteínas é iniciada pela formação do oligossacarídeo [Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>], ligado a um carregador lipídico por uma ponte de pirofosfato (STANELONI e LELOIR, 1979). Estes lipídios envolvidos na glicosilação de resíduos de asparagina em proteínas são poli-isoprenóides, pertencentes a classe dos terpenos, que apresentam na porção terminal um álcool primário. Sua estrutura e biossíntese foi discutida por BEYTIA e PORTER (1976). A presença ou não de uma liga dupla na unidade α-isoprênica (do grupo alcoólico) permite classificar estes lipídios em poliprenóis α-insaturados (por exemplo: o undecaprenol) e α-saturados (dolicol). Nos organismos superiores, o número de unidades isoprênicas varia de 18 a 22, sendo a unidade α-isoprênica saturada (FIGURA I.9).

O lipídio intermediário tem como função permitir a síntese de macromoléculas em meio lipofílico (membrana

celular), a partir de um precursor hidrofílico.

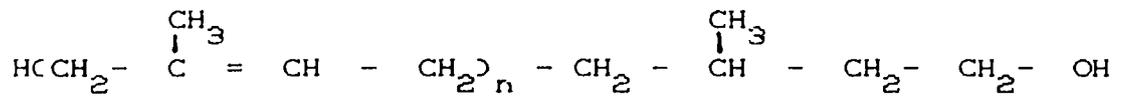


FIGURA I.9 ESTRUTURA DO DOLICOL NOS ANIMAIS SUPERIORES  
 n = 17 - 21 unidades isoprênicas

### I 2 1 Topografia da N-glicosilação de proteínas

A biossíntese da porção oligossacarídica das N-glicoproteínas é feita em várias etapas:

1º) Um lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo é sintetizado pela transferência sequencial de açúcares de um nucleotídeo açúcar ou de um lipídio fosfato monossacarídeo doador para um dolícol fosfato que atua como carregador lipídico.

2º) O oligossacarídeo formado é transferido em bloco para a cadeia polipeptídica nascente

3º) O oligossacarídeo ligado à proteína é processado (perda e adição de açúcares periféricos) por reações que iniciam no retículo endoplasmático e continuam durante seu trânsito pelo complexo de Golgi

A biossíntese do lipídio-PP-oligossacarídeo no retículo endoplasmático rugoso, pelo chamado ciclo do dolícol-fosfato, está esquematicamente ilustrado na FIGURA I.10.

A síntese é iniciada pela reação catalisada pela UDP-N-acetil-glicosamina · dolícol -N- acetil-glicosamina-1-fosfato transferase.



A seguir, são transferidas em seqüência outra unidade de N-acetil-glicosamina e cinco unidades de manose, doadas respectivamente por UDP-N-acetil-glicosamina e GDP-manose. As quatro unidades de manose e as três de glicose, que

entram posteriormente, são doadas por dolícil-fosfato-manose e dolícil-fosfato-glicose, formados a partir de dolícil-fosfato e GDP-manose ou UDP-glicose.

Investigações recentes têm mostrado detalhes sobre a topografia das reações de glicosilação no retículo endoplasmático (LENNARZ, 1982; ROTH, 1987). O oligossacarídeo que é transferido para a proteína nascente no retículo endoplasmático é sintetizado a partir de nucleotídios-açúcares que estão no citoplasma (as nucleotídios-açúcares-sintetases são enzimas citoplasmáticas, COATES et al., 1980). Em trabalhos realizados em fração microsomal de oviduto de galinha, HANOVER e LENNARZ (1978 e 1981) mostraram que a síntese de Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub> não poderia ocorrer no lado citosólico da membrana do retículo. PEREZ e HIRSCHBERG (1985) demonstraram que UDP-GlcNAc pode ser translocado na membrana do retículo por um carregador protéico, em um sistema que envolve a saída de UMP do lúmen reticular. Na mesmo trabalho, os autores mostram que o transporte de UDP-glicose pode ser feito pelo mesmo tipo de sistema, mas não o de GDP-manose.

Estes dados e mais os trabalhos de SNIDER et al. (1980); SNIDER e ROBBINS (1982) e de PEREZ e HIRSCHBERG (1986) levaram a formulação da hipótese apresentada na FIGURA I.10, pela qual a síntese do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo ocorreria nas duas faces da membrana do retículo (citoplasmática e luminal). O Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub> formado na face luminal é translocado para a face citosólica da membrana, onde cinco unidades de manose são adicionadas, transferidas diretamente de GDP-manose (SNIDER e ROGERS, 1984). Os mesmos autores propuseram que a adição das próximas quatro unidades de manose e das três unidades de glicose se daria na face luminal do retículo, implicando então a translocação do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo (Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>) e de dolícil-fosfato-manose e dolícil-fosfato-glicose da face

citossólica para a face luminal

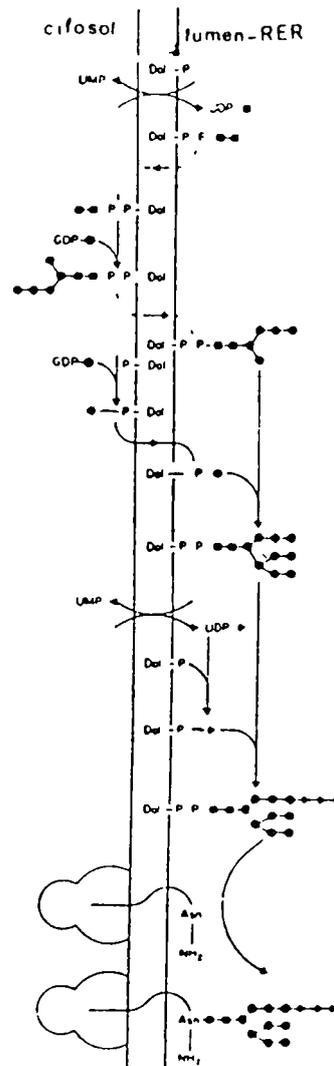


FIGURA I.10 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DO OLIGOSSACARÍDIO LIPÍDIO NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO

As etapas indicadas por linhas cheias já foram experimentalmente comprovadas.

►, glicose; ●, manose, ■, N-acetilglicosamina.

Retirado de ROTH, 1987.

O lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo completo (Dol-PP- -GlcNac<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>9</sub>) se formaria na luz do retículo, onde seria transferido para a proteína nascente por uma oligossacarídeo-transferase associada à membrana do retículo endoplasmático rugoso

A glicosilação dos resíduos asparagina de uma proteína acontece sempre na sequência peptídica Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto Pro e Asp (MARSHALL, 1972) Segundo KRONQUIST e LENNARZ (1978), este não seria o único fator determinante da glicosilação, pois somente a terça parte dos sítios possíveis são glicosilados. Ainda no retículo endoplasmático, a glicoproteína começa a ser processada, perdendo as três glicoses. A remoção da primeira glicose, feita pela glicosidase I (ELTING, 1980), pode acontecer, ainda, com a cadeia polipeptídica associada ao ribossoma (ATKINSON e LEE, 1984). A remoção de manoses também deve começar no retículo endoplasmático, como demonstrado por GODELAINE et al.(1981). Após, a proteína seria transferida para o componente cis do complexo de Golgi, por vesículas de transferência. Nos diferentes componentes do complexo de Golgi (cis, medial, trans) estão as enzimas responsáveis pela continuação do processamento das N-glicoproteínas (LENNARZ, 1982; SPIRO e SPIRO, 1982; SCHACHTER, 1986). Um exemplo desse processamento é dado pela FIGURA I 11

Após o processamento, as diferentes glicoproteínas, dependendo de sinais codificados na sua estrutura tridimensional, são enviadas para os lisossomas, para os grânulos de secreção ou para a membrana plasmática (SCHACHTER, 1986)

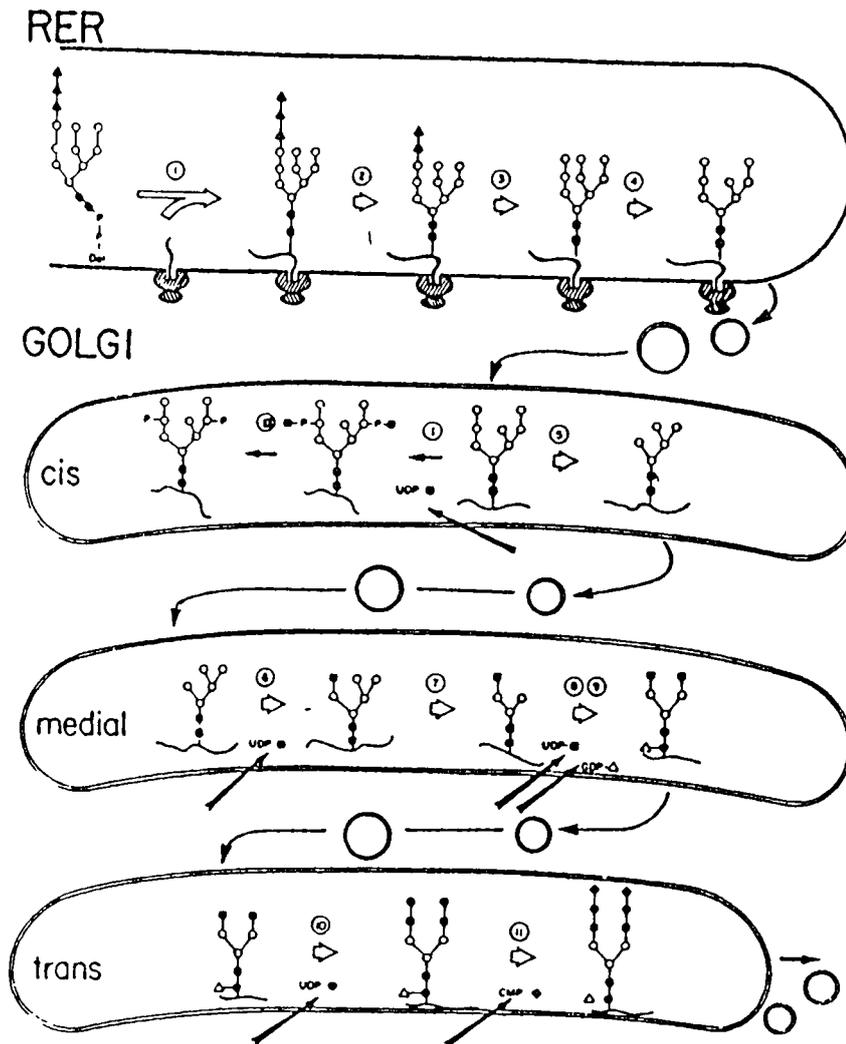


FIGURA I 11 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSAMENTO DE UMA N-GLICOPROTEÍNA

(1) Transferência do  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  do dol-PP-oligossacarídeo para a cadeia polipeptídica nascente; (2)  $\alpha$ -glicosidase I; (3)  $\alpha$ -glicosidase II; (4)  $\alpha 2$ -manosidase do retículo endoplasmático rugoso (RER); (5)  $\alpha$ -manosidase I; (6) GlcNAc-transferase I; (7)  $\alpha$ -manosidase II; (8) GlcNAc-transferase II; (9)  $\alpha\beta$ -fucosiltransferase; (10) Galtransferase; (11) sialiltransferase; (I) N-acetilglicosaminil fosfotransferase (hidrolases destinadas para os lisossomas); (II) N-acetilglicosamina-1-fosfodiester  $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase, que expõe os resíduos de manose- $\beta$ -fosfato, (movimento das hidrolases para os lisossomas). O transporte dos nucleotídeos açúcares para o lúmem está indicado por setas. ■, GlcNAc; O, Man; ▲, Glc; △, Fuc; ●, Gal; ◆ ácido siálico. Retirado de SCHACHTER, 1980.

### I.2.2. Fatores que afetam o controle da glicosilação de proteínas

A informação genética chega ao sistema de glicosilação indiretamente, não existindo informação transmitida por modelos como na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas. Os gens codificam, por exemplo, a cadeia polipeptídica a ser glicosilada, as glicosil-transferases, a disponibilidade de substratos e cofatores e a construção do sistema de endomembranas, responsável pela biossíntese. Diferentemente das ligações entre dois aminoácidos na cadeia polipeptídica, as ligações entre duas unidades monossacarídicas podem ser de diversos tipos ( $\alpha$  e  $\beta$ , entre o carbono anomérico de um açúcar e C-2, 3, 4 ou 6 do outro). Ainda podem existir no oligossacarídeo cadeias ramificadas bastante complexas. O resultado final mostra que a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas é muito mais precisa que a montagem de um carboidrato complexo, que, sendo mais livre para variações, permite a existência do fenômeno da microheterogeneidade (SCHACHTER, 1986).

A regulação de algumas enzimas da rota de biossíntese pode ser crítica no controle da glicosilação. A análise dos esquemas das FIGURAS I.10 e I.11, pode sugerir vários pontos potenciais de regulação.

Diferentes estudos tem mostrado que alterações nos níveis de dolicol e dolicol-P regulam a velocidade da biossíntese de glicoproteínas (LUCAS e LEVIN, 1977; HARFORD e WAECHTER, 1977 e 1980; LUCAS e NEVARY, 1978; CARSON, et al., 1981). Em muitos estudos "in vitro", a adição de dolicol-P estimula substancialmente a glicosilação (SPIRO e SPIRO, 1986; PAN e ELBEIN, 1990). MILLS e ADAMANY (1978) demonstraram que a inibição da hidroximetil-glutaril CoA redutase pode bloquear a síntese do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo.

O controle dos níveis de dolicol-fosfato, através da regulação da atividade da CTP-dolicol-quinase, foi descrito

em oviduto de galinha (BURTON et al.,1981) e em embrião de ouriço do mar (ROSSIGNOL et al.,1981). BERKOWITZ e NYQUIST (1986) demonstraram que a atividade da dolicol quinase em testículos de ratos cresce dos 21 aos 24 dias de idade, com subsequente declínio até aos níveis encontrados no animal adulto

Na FIGURA I.12 estão representados os caminhos de síntese e "turnover" do dolícil-fosfato. Sua biossíntese a partir de acetil-coenzima A, a fosforilação pela reação da dolicol-quinase (reação 1) e a sua regeneração após a transferência do oligossacarídeo para a proteína (reação 2). A biossíntese, a partir de acetil-CoA, segue a mesma rota da síntese de colesterol até a formação de farnesil pirofosfato. Neste ponto, ocorre uma bifurcação. enquanto grande parte do fluxo de carbonos segue para a produção de colesterol, uma pequena porção se direciona para a formação de dolícil.

Uma cis-prenil transferase de cadeia longa catalisa a união de 14-17 unidades de isopreno (isopentenil pirofosfato) a uma molécula de farnesil pirofosfato gerando um poliprenil-pirofosfato e posteriormente dolícil-fosfato. Entretanto, a seqüência de reações pelas quais o intermediário  $\alpha$ -insaturado é convertido em dolícil-fosfato não é conhecida (KELLER, 1987). A reação da cis-prenil transferase tem sido indicada como uma das possíveis etapas regulatórias da síntese do dolícil. (KELLER et al ,1979; KELLER, 1987; JAMES e KANDUTSCH, 1980)

Todos os tecidos são capazes de sintetizar dolícil, variando a relação entre a atividade da síntese "de novo" e da "de salvação" (reações 1 e 2). No fígado de ratos, por exemplo, a contribuição da síntese "de salvação" parece ser relativamente menos importante (KELLER, 1987).

Um caminho alternativo de síntese foi encontrado em oviduto de galinha (GRANGE e ADAIR, 1977), em fígado de galinha (WELLNER e LUCAS, 1979) e em túbulos seminíferos de

rato (BABA et al., 1987; ALLEN e WARD, 1987; CHEN et al., 1989) Nesses casos, foi descrita existência de uma atividade de 2,3-deidrodolicil-difosfato sintase, exemplificada pela reação 3 da FIGURA I.12.

O mecanismo preciso da regulação dos níveis de dolícil-fosfato não está bem determinado. ALLEN e WARD (1987) sugeriram que o estudo de células em diferenciação pode levar à identificação dos controles do ciclo de dolicol e de sua real importância na *N*-glicosilação de proteínas

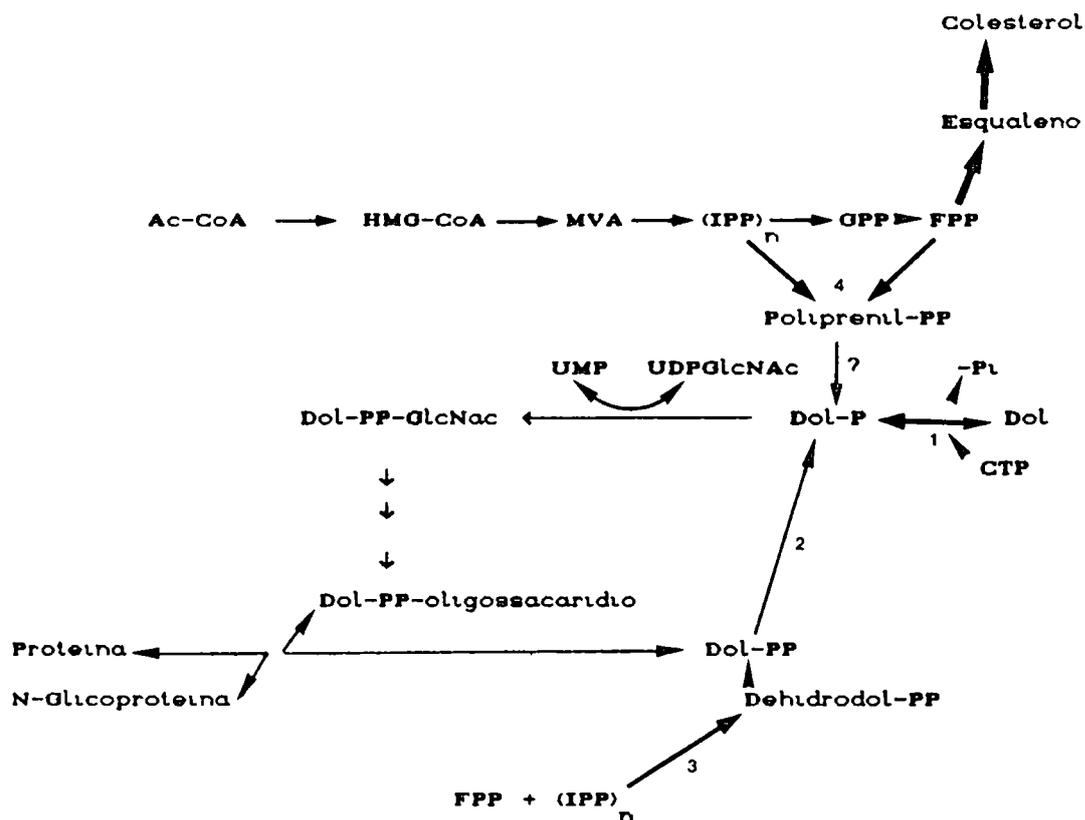


FIGURA I.12 FORMAÇÃO DE DOLÍCIL-FOSFATO:

1- Dolicol-quinase; 2-Dolícil-PP-fosfatase;  
3- 2,3-deidrodolicil-difosfato sintase; 4- cis-prenil transferase; n, 14-17 unidades de IPP

Ac-CoA, acetil CoA; HMG-CoA, hidroximetil-glutaril CoA; MVA, mevalonato; IPP, isopentenil-pirofosfato; GPP, geranyl-pirofosfato; FPP, farnesil-pirofosfato; Dol-OH, dolicol; Dol-P, dolícil-fosfato; Dol-PP, dolícil-pirofosfato; Dol-PP-GlcNac, dolícil-pirofosfato-*N*-acetil-glicosamina; deidrodol-PP, deidrodolicil-difosfato.

CHEN et al.(1989) mostraram que a atividade da 2,3-deidrodolicil-difosfato sintase em homogenados de túbulos seminíferos de ratos pré-púberes muda em função da idade do animal. Os autores sugerem que estas mudanças devam ser importantes na regulação da disponibilidade de dolícil-P para a síntese de *N*-glicoproteínas durante a fase inicial da espermatogênese

Outra etapa limitante na glicosilação é a transferência do oligossacarídeo para a proteína nascente (ALLEN e WARD, 1987). A importância da presença dos resíduos de glicose no lipídio-PP-oligossacarídeo para a atividade da oligossacarídeo-transferase foi descrito por SPIRO et al (1979) e MURPHY e SPIRO (1981) em preparações microsossomais de tireóide.

A formação de dol-PP-GlcNAc, primeira etapa da síntese do lipídio-PP-oligossacarídeo, parece ser outro ponto de controle. A ativação da *N*-acetil-glicosamunil transferase por dolícil-fosfato-manose foi demonstrada em retina de embriões de pintos por KEAN (1982, 1983, 1985).

Já estudos feitos em células tratadas com puomicina mostraram que a acumulação do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo, causada pela inibição da biossíntese protéica ou da glicosilação de proteínas, gera a acumulação de um intermediário (talvez o próprio lipídio-PP-oligossacarídeo), que inibe a biossíntese do lipídio-PP-oligossacarídeo (PAN e ELBEIN, 1990). GRANT e LENNARZ (1983) sugeriram que o GTP pode ser este composto, pois GTP inibe a transferência de manose de GDP-manose para o lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo. SPIRO e SPIRO (1986), trabalhando com microsossomas de tireóide, demonstraram que o GTP é inibidor da atividade de dolícil-fosfato-manose sintase responsável pela síntese de dolícil-fosfato-manose.

A associação das glicosil-transferases com os fosfolípidios presentes na membrana do retículo

endoplasmático também tem sido descrita como fator de modulação da atividade destas enzimas. A ativação da manosil-transferase II, que catalisa a transferência direta de manose do GDP-manose para o oligossacarídeo, na presença de fosfatidil-etanolamina (insaturada) foi demonstrada por JENSEN e SCHUTZBACH (1982) CHALIFOUR e SPIRO (1988) demonstraram que a atividade e a orientação na membrana do retículo endoplasmático rugoso da oligossacarídeo-transferase é dependente de sua interação específica com fosfatidil-colina.

Os efeitos de diversos hormônios e da vitamina A na síntese do lipídio-PP-oligossacarídeo, na sua transferência para a proteína e no seu processamento, têm sido descritos em diversos sistemas celulares. No caso dos efeitos de hormônios sexuais em tecidos alvo, por exemplo o tratamento com estrógenos aumenta de 3 a 4 vezes a atividade da oligossacarídeo-transferase em oviduto de galinha (SINGH e LUCAS, 1981). Estes mesmos hormônios aumentam de 10 a 15 vezes a atividade desta enzima durante a diferenciação cervical em coelhos (CHILTON et al., 1988). DUTT et al. (1986) demonstraram, em útero de camundongo, que a *N*-glicosilação de proteínas é estimulada por esteróides. Em tecido epididimal de ratos, IUSEN et al. (1984) provaram que as atividades das glicosil- e manosil-transferases são dependentes de andrógenos. As atividades destas enzimas diminuem aproximadamente 76% com a castração. Também a dexametasona estimula a síntese de dolícil-fosfato-manose em microsomas isolados de células HeLa (RAMACHANDRAN e MELNYKOVICH, 1986).

Os efeitos das gonadotrofinas sobre a *N*-glicosilação podem ser exemplificados pelo efeito ativador da tireotropina (TSH) sobre várias glicosil-transferases e sobre a oligossacarídeo-transferase de células de tireóide de porco, demonstrado por FRANC et al. (1984) e pelo trabalho de BERNARD e WASSERMANN (1982) em ratos imaturos. Nesse

estudo foi apresentado um efeito estimulatório do FSH injetado "in vivo", sobre a incorporação "in vitro" de [<sup>3</sup>H]manose a glicoproteínas de testículos de ratos irradiados ainda no útero materno (enriquecidos em células de Sertoli) e de manose e glicosamina em testículos de ratos normais.

A estimulação provocada por FSH ou dibutilil AMP cíclico da incorporação de fucose a glicoproteínas foi demonstrada por GALDIERI e ZANI (1981). Estes resultados não esclarecem se o aumento da radioatividade incorporada é devido a um aumento da síntese da glicoproteína ou a um aumento de glicosilação de cadeias pré-existentes.

As ações da vitamina A sobre a *N*-glicosilação podem ser exemplificadas pelas observações de DE LUCA (1977) em fígado de ratos deficientes em vitamina A. Nesses a quantidade de [<sup>14</sup>C] manose ligada a proteínas é 79% menor que em fígados de ratos normais. O autor sugeriu que existe um bloqueio no processamento do oligossacarídeo nos ratos deficientes. Também MORRÉ et al.(1988) mostraram que, em animais que recebem um excesso de vitamina A na dieta, existem alterações nas glicoproteínas, que se movem através do complexo de Golgi para a superfície celular ou para os lisossomas

Por sua vez, PLOTKIN e WOLF (1980), medindo a atividade da galactosil-transferase em células epiteliais de traquéia de ratos, demonstraram que a atividade que está diminuída em células de ratos deficientes em vitamina A é restabelecida pela pré-incubação por 30 min das frações microsossomais destas células com retinol. A ativação por retinol e retinil-palmitato de uma galactosil-transferase de fígado de rato foi apresentada por CREEK e MORRÉ (1980). O tratamento com ácido retinóico aumenta a atividade de uma sialil-transferase em células da linhagem S91-C2 de melanoma (DEUTSCH e LOTAN, 1983).

O envolvimento do retinol no processo secretório de

proteínas em células de fígado de rato foi demonstrado por NOWACK et al.(1987) No trabalho, os autores evidenciaram a participação do retinol na formação de vesículas de transição no retículo endoplasmático, que teriam como função levar material para a face cis do complexo de Golgi.

### I.2.3 Glicoproteínas no Testículo:

Vários autores têm descrito a importância de glicoproteínas na função testicular. As alterações existentes nos níveis de secreção das diferentes glicoproteínas produzidas pelas células de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero já foram descritas anteriormente (item I.1.2.). GURAGNA et al.(1986) descreveram uma inibição na biossíntese de glicoproteínas em testículos de ratos de 20 dias submetidos a hiponutrição protéica, em que esses animais apresentavam uma menor atividade da dolícil-fosfato-manose sintase. GUMA et al (1990) relacionaram esta inibição da biossíntese de glicoproteínas nos ratos hiponutridos com o atraso no processo espermatogênico encontrado nestes ratos.

Muitas das proteínas descritas como produtos das células de Sertoli no item I.1.4. são glicoproteínas, sendo reconhecidamente importantes para a função testicular. A proteína ligadora de andrógenos (ABP) (FRITZ et al., 1974; TINDALL e MEANS, 1976; HAGENAS et al., 1975) constitui 1% do total das glicoproteínas secretadas pelas células de Sertoli, sendo funcionalmente importante no transporte de andrógenos para o epidídimo ou como reservatório destes hormônios (SKINNER et al., 1989). STEINBERGER et al.(1984) descreveram a existência de sítios específicos para o ABP em espermátócitos paquitênicos.

O ativador de plasminogênio pode estar envolvido no processo de re-estruturação da barreira hemato-testicular, durante o movimento de células germinativas do lado basal

para o compartimento adluminal do túbulo seminífero e na liberação de espermátides maduras pelas células de Sertoli (LACROIX et al , 1977)

A transferrina testicular, uma glicoproteína com o peso molecular de aproximadamente 80 kD, que liga 2 átomos de  $Fe^{+3}$ , é o maior produto de secreção das células de Sertoli (7-15% do total das glicoproteínas secretadas). A ligação e o transporte de ferro são as funções mais importantes da transferrina, mas não se pode excluir a possibilidade da transferrina atuar como um fator de crescimento local (SKINNER e GRISWOLD, 1980; EKBLON et al., 1983).

A ceruloplasmina está envolvida no transporte de cobre e atua juntamente com a transferrina, estimulando a divisão e o crescimento de células de Sertoli obtidas de ratos de 10 a 13 dias de idade (MATHER et al., 1982). A proteína inibidora do ducto de Muller, responsável pela regressão dos ductos de Muller em fetos machos, secretada por células de Sertoli fetais, parece ser também uma glicoproteína (PICARD e JOSSO, 1980).

As glicoproteínas sulfatadas (SCM-1 e SCM-2) são responsáveis pelo transporte de lipídios essenciais para o desenvolvimento das células germinativas (SKINNER et al., 1989).

### I.3. RETINOL

Desde o reconhecimento da vitamina A como fator de crescimento, através do trabalho de MC COLLUM e DAVIS (1915) e mais tarde pelo estabelecimento de suas funções no processo visual (WALD, 1935), a elucidação de seu mecanismo de ação tem sido um grande desafio.

A maioria dos primeiros trabalhos realizados se constituíam em monitoramentos das mudanças causadas em animais de experimentação pela deficiência ou excesso de vitamina A. Estes trabalhos demonstraram que a vitamina A é essencial para o crescimento de todos os vertebrados e para a prevenção da cegueira noturna. Além disto, a vitamina A tem sido reconhecida como fator importante na diferenciação dos tecidos epiteliais, na manutenção da capacidade reprodutiva e na produção de glicoproteínas (LOTAN, 1980). Também tem sido demonstrado que muitos derivados da vitamina A podem prevenir o desenvolvimento de vários tipos de câncer epitelial (SPORN et al., 1976).

Estudos feitos "in vivo" têm ajudado muito na determinação de vários efeitos da deficiência ou do excesso de vitamina A nos tecidos e, algumas vezes, até em níveis celulares. Entretanto, a interpretação deste tipo de resultado é dificultada pela impossibilidade de se distinguir entre efeitos primários e efeitos secundários (ou específicos de inespecíficos). Este problema pode ser resolvido, em parte, pelo desenvolvimento de técnicas "in vitro". O estudo dos efeitos dos retinóides em culturas de tecidos tem ajudado no entendimento de muitos aspectos das alterações na fisiologia celular e na expressão fenotípica provocados por retinóides (LOTAN, 1980).

### I.3.1. Estrutura química, origem e relação estrutura e função

A vitamina A (retinol) encontrada nos tecidos animais é um isoprenóide que contém um anel de 6 carbonos e uma cadeia lateral de 11 carbonos (FIGURA I.13), sendo derivada dos carotenóides. Os carotenóides, também chamados de pró-vitaminas, são largamente distribuídos nos vegetais, sendo convertidos a retinol por reações enzimáticas na mucosa intestinal e no fígado. O  $\beta$ -caroteno é uma molécula simétrica, que clivada gera 2 moléculas de retinol (FIGURA I.13) , (CDE LUCA , 1977).

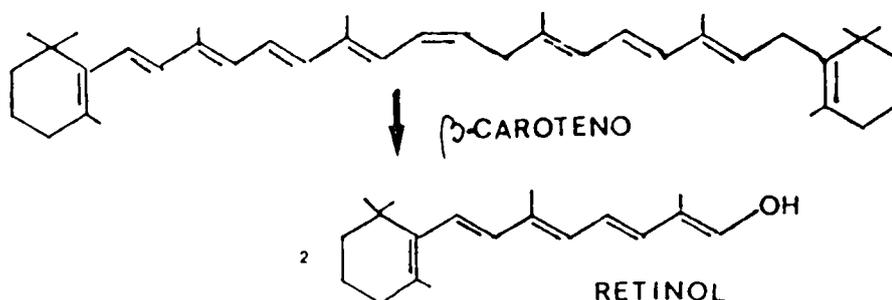


FIGURA I 13 ESTRUTURA QUÍMICA DO RETINOL

A atividade da vitamina A em mamíferos pode ser exercida por uma série de substâncias. A substância "mãe" é o all-trans-retinol; por oxidação, são gerados o all-trans-retinal (forma aldeídica da vitamina) e o ácido retinóico (forma ácida da vitamina). Os derivados com atividade de vitamina A podem apresentar modificações químicas no anel, na cadeia lateral ou no grupo terminal da molécula do retinol

LOTAN (1980) classificou como retinóide (análogo à

vitamina A), toda a substância capaz de restabelecer o crescimento normal em animais submetidos a dietas deficientes em vitamina A SPORN et al.(1976) analisaram a atividade potencial de diversos retinóides, verificando que muitos retinóides sintéticos que têm potente atividade no controle da diferenciação de tecidos epiteliais "in vivo" ou na reversão de lesões pré-malignas têm pequena capacidade de promover o crescimento de animais deficientes em vitamina A. Este estudo mostrou que novos critérios deveriam ser desenvolvidos para correlacionar estrutura e atividade, como também para o estabelecimento dos parâmetros moleculares responsáveis pelos possíveis efeitos tóxicos dos retinóides.

Analisando as atividades relativas de diferentes retinóides, LOTAN (1980) propôs a existência de uma correlação entre a atividade e a afinidade de ligação com uma proteína ligadora celular, sugerindo que a ação da vitamina seria mediada pela ligação com a proteína carregadora citoplasmática, Já CHYTIL e ONG (1978) lembrando que a resposta celular pode ser dependente de muitos outros fatores, como a presença de receptores celulares, propõem que a presença de uma proteína ligadora deve ser um requerimento, não necessariamente suficiente.

### I.3.2 Metabolismo da vitamina A

#### I.3.2.1 Absorção, transporte e armazenamento

A vitamina A existe na dieta na forma de retinil-ésteres ou de  $\beta$ -caroteno. Os ésteres são hidrolisados por esterases específicas e o retinol absorvido pelas células da mucosa intestinal. O  $\beta$ -caroteno é primeiramente absorvido e então enzimaticamente clivado em 2 moléculas de retinal que são reduzidas a retinol. Após a absorção intestinal, o retinol é esterificado com um ácido graxo de cadeia longa (geralmente o ácido palmítico) e transportado como retinil-

-éster nas quilomicras pela linfa até a circulação sanguínea, de onde é captado e armazenado pelo fígado (LOTAN, 1980).

A mobilização e o transporte da vitamina A, a partir dos estoques hepáticos, requer hidrólise dos retinil-ésteres e conjugação do retinol livre com uma proteína carregadora (RBP), produzida pelo fígado. A holoproteína, normalmente associada (na proporção de 1.1) com uma pré-albumina chamada transtirretina (TTR), é liberada para a circulação, transportando o retinol até aos tecidos alvo (GRISWOLD, et al ,1989) DIXON e GOODMAN (1987a) demonstraram que a suplementação do meio de cultura de hepatócitos com aminoácidos e dexametasona mantém a produção e a secreção normais de RBP por vários dias. Os autores também mostraram que em hepatócitos normais, com ampla disponibilidade de retinol intra-celular, a adição de retinol exógeno não parece influenciar o metabolismo e secreção de RBP por estas células. Em hepatócitos isolados de ratos deficientes em vitamina A, a adição de retinol estimula a secreção de RBP pelas células (DIXON e GOODMAN, 1987b). Pela análise da expressão dos gens de proteínas envolvidas no transporte de retinol, PEROZZI et al.(1991) provaram que os níveis hepáticos de mRNA da RBP não são afetados pela deficiência ou pelo excesso de vitamina A.

O ácido retinóico é encontrado em pequenas quantidades na dieta, possui atividade de vitamina A na promoção do crescimento (LOTAN, 1980), mas não pode substituir o requerimento de retinol na visão (DOWLING e WALD, 1960) e na reprodução (LOTAN, 1980), provavelmente por não poder ser reduzido "in vivo" à retinal ou retinol (DOWLING e WALD, 1960) O ácido retinóico é transportado no sangue associado à albumina. Por isto, é plausível assumir que análogos sintéticos sejam também transportados associados à albumina.

Muitos estudos têm mostrado que o ácido retinóico pode ser armazenado em quantidades apreciáveis em alguns órgãos,

mas, ao contrário do retinol, é rapidamente metabolizado e excretado (LOTAN, 1980). Observações similares têm sido feitas sobre alguns análogos sintéticos

SZUTS e HAROSI (1991) investigaram a solubilidade em soluções aquosas dos três retinóides mais comuns (retinol, retinal e o ácido retinóico), encontrando uma solubilidade em água de em torno de  $0.1\mu\text{M}$ . Embora relativamente baixa, esta solubilização seria fisiologicamente significativa e explicaria resultados anteriormente obtidos que descrevem o movimento de retinóides através de fases aquosas durante a transferência intervesicular na ausência de proteínas ligadoras. Esta difusão não complexada de retinóides pode ser importante no transporte dentro de distâncias subcelulares.

### I 3.2 2. Captação pelas células e metabolismo

A natureza da função da RBP no transporte de retinol até as células não está completamente esclarecida. FUTTERMAN e HELLER (1972) mostraram que a associação do retinol com a RBP protege o retinol da oxidação. Não está esclarecido, entretanto, se a RBP serve para facilitar a captação de retinol pelas células.

RANDOLPH e ROSS (1991), estudando a captação e esterificação do retinol em células das linhagens MCF-7 e HepG2, demonstraram que a forma com que o retinol é oferecido a estas células (disperso no meio de cultura, ligado à RBP ou ao complexo RBP-TTR) não é qualitativamente importante para o processo. Seus resultados e os de SHINGLETON et al.(1989a), que estudaram a captação de retinol por culturas de células, sugerem que a ligação do retinol na RBP ou RBP-TTR retarda a velocidade da captação pelas células, em vez de acelerá-la . Os resultados de RANDOLPH e ROSS (1991) e de SHINGLETON et al.(1989a) são consistentes com a teoria de que o retinol é captado pelas células depois de sua dissociação da RBP e difusão na fase

aquosa, postulada por NOY e XU (1990). Isto explicaria o fato de que, em iguais concentrações, a velocidade inicial de captação é maior para o retinol disperso no meio, intermediária para o complexado com RBP e ainda menor para o complexo RBP-TTR-retinol

Tem sido postulada a existência de um receptor específico na superfície celular para o complexo circulatório de transporte (retinol-RBP-TTR) (GOODMAN, 1984). A captação do retinol "in vitro" foi estudada em diversos sistemas celulares, sendo um processo rápido e saturável (RASK e PETERSON, 1976; HELLER, 1975).

A existência de várias proteínas celulares ligadoras de retinóides sugere que uma variedade de estruturas derivadas do retinol possam interagir com as células de uma forma biologicamente significativa (CHYTIL e ONG, 1979). CHYTIL e ONG (1984) descreveram duas proteínas ligadoras intracelulares de retinóides, a CRBP (proteína carregadora de retinol) e a CRABP (proteína carregadora de ácido retinóico). A função destas proteínas não está bem estabelecida, mas tem sido sugerido que estariam envolvidas no transporte dos retinóides até ao núcleo celular. ONG et al. (1988) descreveram o complexo CRBP-retinol como sendo o substrato preferencial para a formação de retinil ésteres. A incubação de células das linhagens MCF-7 e HepG2 com oleato e [<sup>3</sup>H]retinol resulta em um aumento rápido e correlacionado das velocidades de captação e esterificação do retinol (RANDOLPH e ROSS, 1991).

SANI et al. (1991) descreveram a existência de uma nova proteína ligadora de retinóides (RetBP), que liga tanto retinol como ácido retinóico e alguns derivados, porém sua função ainda não está esclarecida. Na verdade, pouco é conhecido sobre a captação do ácido retinóico, embora LOTAN (1980) proponha que possam existir trocas de ácido retinóico entre a albumina e a RBP.

Após a entrada na célula, o retinol e o ácido retinóico

podem participar de várias reações metabólicas. Na FIGURA I 14 estão representadas de algumas dessas reações.

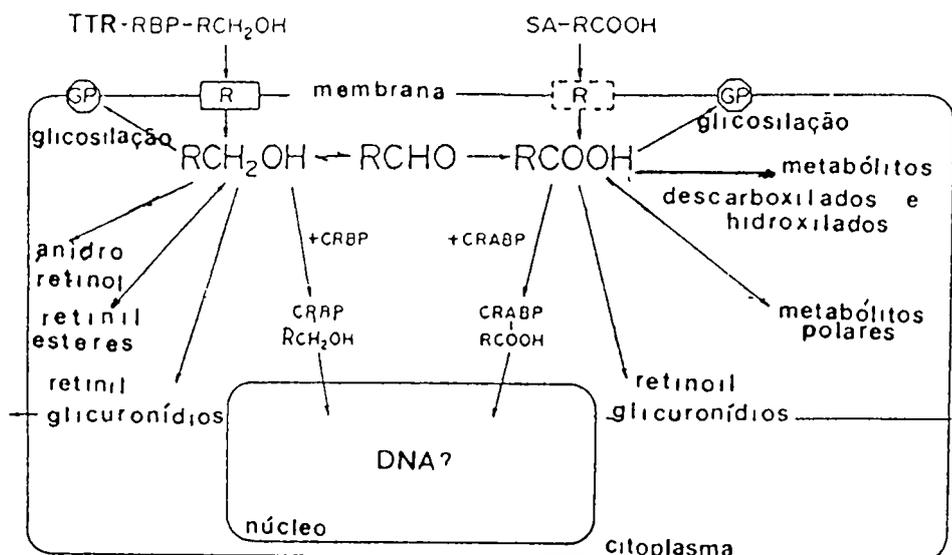


FIGURA I.14 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DESTINOS DO RETINOL E DO ÁCIDO RETINÓICO EM UMA CÉLULA HIPOTÉTICA DE VERTEBRADO

R, receptor de membrana, SA, soro albumina, GP, glicoproteína.

Retirado de LOTAN, 1980.

O grupo alcoólico primário do retinol pode sofrer oxidação reversível até retinal por uma álcool desidrogenase. O retinal pode ser irreversivelmente oxidado a ácido retinóico. Tanto o retinol quanto o ácido retinóico podem ser convertidos a glicuronídeos por ação de uma glicuronídeo transferase na presença de UDP-ácido glicurônico, estes compostos são a maior forma de excreção dos retinóides. Ésteres do retinol com ácidos graxos, são a forma de armazenamento em muitos tecidos, podendo ser hidrolisados tanto por esterases específicas como inespecíficas

RANDOLPH et al.(1991) examinaram a esterificação do retinol em microsomas de fígado e de glândula mamária em lactação de ratos e determinaram a existência de duas atividades enzimáticas envolvidas na esterificação. O retinol complexado com a CRBP ou disperso em solvente foi esterificado por uma enzima independente de acil-CoA, sensível a PMSF, chamada de LRAT (Lecitina:retinol acil-transferase); o retinol disperso em solvente também foi esterificado por outra enzima dependente de acil CoA e resistente ao PMSF, chamada de ARAT (acil-CoA: retinol acil-transferase). A análise dos Km e das Vmax das duas enzimas, nos dois tecidos, mostrou que a esterificação do retinol deve ser regulada por mecanismos diferentes no fígado e na glândula mamária.

Isomerases transformam o retinol e o ácido retinóico em 11-cis e 13-cis análogos. O isômero 11-cis é importante na formação da rodopsina. Também podem ocorrer reações de descarboxilação e desacilação, alguns destes metabólitos sendo excretados (LOTAN, 1980).

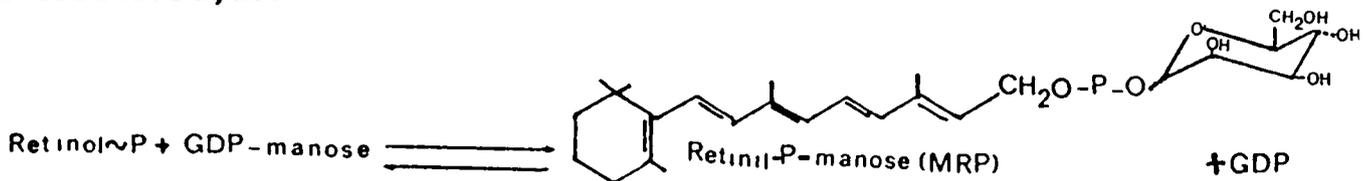
O retinol e o ácido retinóico também podem participar de reações de transferência glicosídica para a formação de glicoconjugados (LOTAN, 1980). A FIGURA I.15 mostra como o retinol atua como carregador de açúcares em reações de glicosilação de proteínas. Diferentemente da glicosilação

mediada por dolicol, que envolve a formação de um oligossacarídeo ligado ao lipídio, sendo posteriormente transferido para a proteína, o retinol parece doar monossacarídeos durante o processamento de uma glicoproteína (CREEK et al., 1983).

A- Fosforilação:



B-Glicosilação:



C-Transferência Glicosídica:

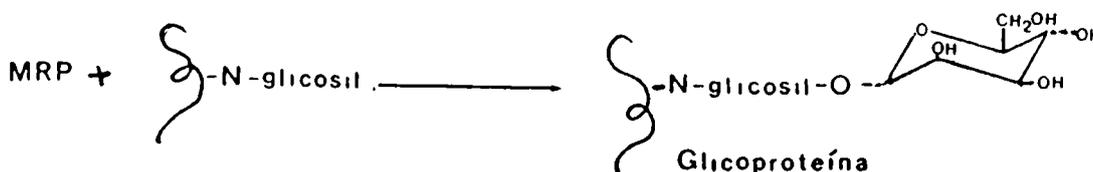


FIGURA I 15 ENVOLVIMENTO DO RETINOL COMO CARREGADOR E DOADOR DE UNIDADES DE MANOSE EM REAÇÕES DE TRANSFERÊNCIAS GLICOSÍDICAS EM MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Modificado de DE LUCA (1977).

### I.3 3 Retinol nos testículos

Como foi apontado anteriormente (no item I 3.), a vitamina A, na forma de retinol, é essencial para a manutenção da espermatogênese em mamíferos (THOMPSON, et al , 1964; MITRAMOND, et al., 1979). A administração de ácido retinóico a animais deficientes em vitamina A (VAD) restabelece as funções vitais, mas somente o retinol e seus esterios podem restabelecer a função testicular e a visão (THOMPSON, et al., 1964; LOTAN , 1980).

As mudanças citológicas que ocorrem nos testículos de ratos como consequência da deficiência em vitamina A foram descritas por MITRAMOND et al.(1979). Os autores submeteram animais de 30 dias de idade à dieta deficiente em vitamina A até a interrupção do crescimento, a qual sinaliza o estabelecimento da deficiência após a mobilização total dos estoques hepáticos. O acompanhamento das mudanças citológicas foi feito do 1º ao 20º dia após os animais terem parado de crescer . No 20º dia, o número de espermatogônias nos túbulos era cerca de 1/4 do detectado no início do experimento. O número de espermatídes era praticamente zero no 10º dia e o de espermatócitos decrescia rapidamente entre o 5º e o 12º dia, sendo que no 20º dia poucos espermatócitos foram encontrados.

SOBHON et al.(1979) analisando a ultra-estrutura de túbulos seminíferos de ratos VAD, demonstraram que partes do citoplasma das células de Sertoli são liberadas junto com as células germinativas imaturas, causando uma diminuição do tamanho das células de Sertoli e uma perda de espessura do epitélio seminífero. Em adição, aumentam as inclusões elétron-densas no citoplasma destas células, que parecem ser lisossomas em vários estágios de atividade. Os autores propõem que estes lisossomas estariam envolvidos na absorção de células germinativas mortas e na degradação de partes do citoplasma das próprias células de Sertoli.

Todos os tipos celulares presentes nos testículos,

incluindo células de Leydig, células germinativas, células mióides peritubulares e as células de Sertoli, são candidatos em potencial a sítios de ação do retinol. As células de Sertoli têm sido o maior alvo de estudo, por serem elas que provêm o suporte físico e bioquímico para a diferenciação das células germinativas.

RAJGURU et al.(1982) provaram que, nos testículos, o retinol pode ser encontrado nos macrófagos do tecido intersticial, nas gotas de gordura das células de Sertoli e associado ao complexo de Golgi de espermatídes. A CRBP foi encontrada tanto no interstício como nos túbulos seminíferos. Vários trabalhos tem demonstrado que as células de Sertoli apresentam níveis relativamente altos de CRBP e muito baixos de CRABP, enquanto que a situação é invertida nas células germinativas em meiose (HUGGENVIK e GRISWOLD, 1981; PORTER et al., 1985; GRISWOLD et al., 1989). As células de Sertoli também apresentam maior quantidade do mRNA para a CRBP, cujos níveis apresentam variações cíclicas durante o ciclo do epitélio seminífero (RAJAN et al.,1990).

ESKILD et al.(1991) determinaram a distribuição dos mRNA para a CRBP, CRABP e RAR $\alpha$  (receptor nuclear para o ácido retinóico) em testículos de ratos. Concluíram que a expressão do mRNA da CRBP está restrita às células de Sertoli e às peritubulares. O mRNA da CRABP foi encontrado nas células germinativas e, em baixo nível, nas células de Leydig. A expressão do mRNA para o RAR $\alpha$  aparece tanto nas células somáticas como nas células germinativas pós-meióticas.

As células de Sertoli em cultura captam retinol do complexo retinol-RBP-TTR do plasma e rapidamente o convertem em retinil-ésteres. Esta captação é dependente de tempo e temperatura. A constante de transporte, para a captação específica a partir de RBP, foi de 3.0 $\mu$ M, sugerindo que mudanças nos níveis normais de retinol circulante (aproximadamente 2.0 $\mu$ M) afetam diretamente a velocidade de

acumulação celular de retinol. Inibidores metabólicos (azida sódica e 2-deoxiglicose) não atuam na acumulação de retinol, indicando que o retinol nas células de Sertoli não é captado por endocitose do complexo de transporte. Estes dados mostram que a captação do retinol em células de Sertoli envolve o reconhecimento do complexo retinol-RBP pela superfície celular com subsequente internalização do retinol, mas não da RBP (SHINGLETON et al., 1989a).

Após 32h de tratamento das culturas de células de Sertoli com [<sup>3</sup>H] retinol-RBP-TTR, GRISWOLD et al. (1989) encontraram 83% da marca radioativa em retinil-ésteres, sendo cerca de 64% dos mesmos representados por retinil-palmitato. Quando [<sup>3</sup>H]retinol livre foi adicionado a culturas de células de Sertoli, a marca radioativa não só apareceu em retinil-ésteres, como grande proporção foi encontrada em compostos polares não identificados (BISHOP e GRISWOLD, 1987).

A concentração de retinil-ésteres em culturas de células de Sertoli está na mesma ordem de grandeza da encontrada em culturas de hepatócitos, sendo significativamente maior que em outras células testiculares. Com base nesta comparação e em estudos que demonstram a existência de uma atividade de acil-CoA. retinol acil-transferase (ARAT) em células de Sertoli, BISHOP e GRISWOLD (1987) e GRISWOLD et al. (1989) sugerem que as células de Sertoli são capazes de esterificar retinol a partir de concentrações fisiológicas de retinol circulante.

BISHOP e GRISWOLD (1987) propuseram também a existência de um modelo cinético para a captação e o metabolismo do retinol em células de Sertoli (FIGURA I.16).

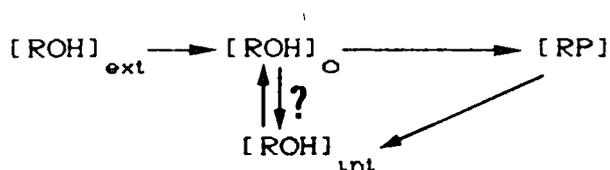


FIGURA I 18 MODELO CINÉTICO PARA A CAPTAÇÃO E O METABOLISMO DO RETINOL NAS CÉLULAS DE SERTOLI

ROH, retinol; RP, retinil-palmitato.

- Retirado de BISHOP e GRISWOLD (1987).

Neste modelo, a incorporação do retinol extracelular ( $[ROH]_{ext}$ ) elevaria o "pool" celular ( $[ROH]_o$ ) que pode servir tanto como precursor de retinil-ésteres como pode liberar retinol para um "pool" mais estável ( $[ROH]_{int}$ ). Estes "pools" intracelulares de retinol devem existir em um estado de quase equilíbrio, em que retinil-palmitato pode ser hidrolisado para repor perdas de retinol, causadas por oxidações, transporte intercelular ou por outros processos metabólicos. As células de Sertoli dos ratos VAD (que não têm retinol endógeno) metabolizam todo o retinol exógeno, primeiramente, a retinil-ésteres. Isto indica que não existe um equilíbrio dinâmico entre o retinol celular e os retinil-ésteres (BISHOP e GRISWOLD, 1987).

SHINGLETON et al.(1989b) propuseram a existência de mais uma atividade enzimática capaz de esterificar retinol em culturas de células de Sertoli, além da ARAT. Estudando a captação e o metabolismo do retinol em culturas de células de Sertoli obtidas de ratos de 20 dias, demonstraram que as células sintetizam retinil-ésteres através de uma atividade de lecitina:retinol acil-transferase (LRAT). Mostraram, pela análise das propriedades das duas atividades enzimáticas, que a LRAT é fisiologicamente mais importante em células de

Sertoli que a ARAT.

A análise dos níveis dos mRNA de algumas proteínas específicas das células de Sertoli em ratos VAD mostrou uma queda de 25% nos níveis do mRNA da transferrina. Os níveis do mRNA da glicoproteína sulfatada 2 (SCM-2) aumentam durante a fase inicial da deficiência, voltando ao normal, ou sendo ligeiramente mais baixos, quando a deficiência se torna severa (HUGLY e GRISWOLD, 1987). A administração de ácido retinóico pela dieta não restabelece os níveis destes mRNA, porém o retinol administrado da mesma maneira tem esta capacidade. O restabelecimento da espermatogênese em ratos VAD acontece de forma sincronizada. Testículos que normalmente apresentam os 14 estágios do ciclo do epitélio seminífero apresentam apenas 2 ou 3 destes estágios e a liberação do espermatozóide vai ocorrer em todos os túbulos a cada 12.8 dias.

Quando o retinol ou o ácido retinóico são injetados diretamente nos túbulos seminíferos de ratos VAD, os níveis do mRNA da transferrina aumentam uma hora após a injeção de qualquer um dos retinóides. Entretanto, o ácido retinóico, mesmo injetado diretamente nos testículos, não restabelece a espermatogênese (GRISWOLD et al., 1989). Estes mesmos autores mostraram evidências de que o ácido retinóico na dieta poderia provocar o aumento no número de espermátócitos pré-leptotênicos. HANEJI et al. (1982) provaram que o ácido retinóico também parece estimular mitoses e diferenciação de espermatogônias em explantes de testículos de ratos criptoquídicos.

VAN PELT e ROOJI (1991) demonstraram que injeções de 5mg de ácido retinóico são capazes de induzir a proliferação e a diferenciação de espermatogônias tipo A e que injeções repetidas garantem o desenvolvimento de células espermatogênicas até espermátides alongadas.

O recente descobrimento de receptores nucleares para o ácido retinóico nas células de Sertoli e em espermátides

redonda demonstra que o ácido retinóico deve atuar como regulador gênico nestas células (ESKILD et al., 1991). Com essa descoberta, os autores postularam o conceito de exclusividade do retinol na manutenção da espermatogênese.

Nos testículos, as células de Sertoli formam a barreira hemato-testicular, que bloqueia a transferência direta de constituintes do sangue para as células germinativas; com isso, as células do compartimento adluminal se tornam totalmente dependentes das células de Sertoli para o seu desenvolvimento (FAWCET, 1975).

Pelos fatos já descritos, verifica-se que, no metabolismo das células de Sertoli, o retinol é rapidamente captado e esterificado. O requerimento de retinol para a espermatogênese pode ser meramente um problema de transporte do retinol dentro das células de Sertoli, pois esta célula só possui, segundo ESKILD et al. (1991) CRBP e não CRABP. Entretanto, outros autores, como KATO et al. (1982) e PORTER et al. (1985) detectaram a presença de pequenas quantidades de CRABP nas células de Sertoli. NAPOLI e RACE (1987) demonstraram que as células de Sertoli têm capacidade de oxidar o retinol a ácido retinóico, apontando a possibilidade do retinol ser captado, oxidado e, assim atuar nos receptores nucleares de ácido retinóico.

GRISWOLD et al. (1989) propuseram um modelo de mecanismo de ação para o retinol nos túbulos seminíferos. Neste modelo (FIGURA I.17), que os próprios autores chamam de incompleto e simplista, o retinol captado pelas células de Sertoli é primeiramente esterificado e depois transferido para as células germinativas ou liberado para outras funções na própria célula.

A impossibilidade de o ácido retinóico servir de substrato para a esterificação tem sido também apontada com a razão mais provável da sua ineficiência na manutenção da espermatogênese (BISHOP e GRISWOLD, 1987; GRISWOLD et al., 1989). Também não está bem estabelecido o mecanismo

pelo qual o retinol é transportado das células de Sertoli para as germinativas. Sabe-se apenas que provavelmente, os retinil-ésteres estejam envolvidos neste processo (BISHOP e GRISWOLD, 1987)

Mudanças endócrinas importantes têm sido verificadas no estudo de ratos VAD. Os níveis de FSH aumentam com a degeneração do epitélio germinativo, permanecendo anormalmente altos mesmo depois da reposição da vitamina A e da retomada da espermatogênese com recuperação da função normal das células de Sertoli. Esse fato sugere que o mecanismo pelo qual a deficiência de retinol rompe a regulação da secreção de FSH é muito mais complexo do que um simples "feedback" produzido pela inibina (HUANG et al., 1983 e 1989). Os níveis de LH permanecem normais, mas os níveis de testosterona nos ratos VAD caem para menos de 50% do normal. Em ratos mantidos com ácido retinóico, a testosterona permanece em níveis normais. Com o aumento da deficiência em vitamina A as junções entre as células de Sertoli (tight junctions) são rompidas concomitantemente com a regressão das células germinativas (GRISWOLD et al., 1989).

CHAUDHARY et al. (1989), estudando a ação do retinol e do ácido retinóico sobre a esteroidogênese em células de Leydig, concluíram que ambos os retinóides estimulam a produção de testosterona. Este efeito direto sobre as células de Leydig demonstrou um possível papel regulador dos retinóides sobre a função desta célula.

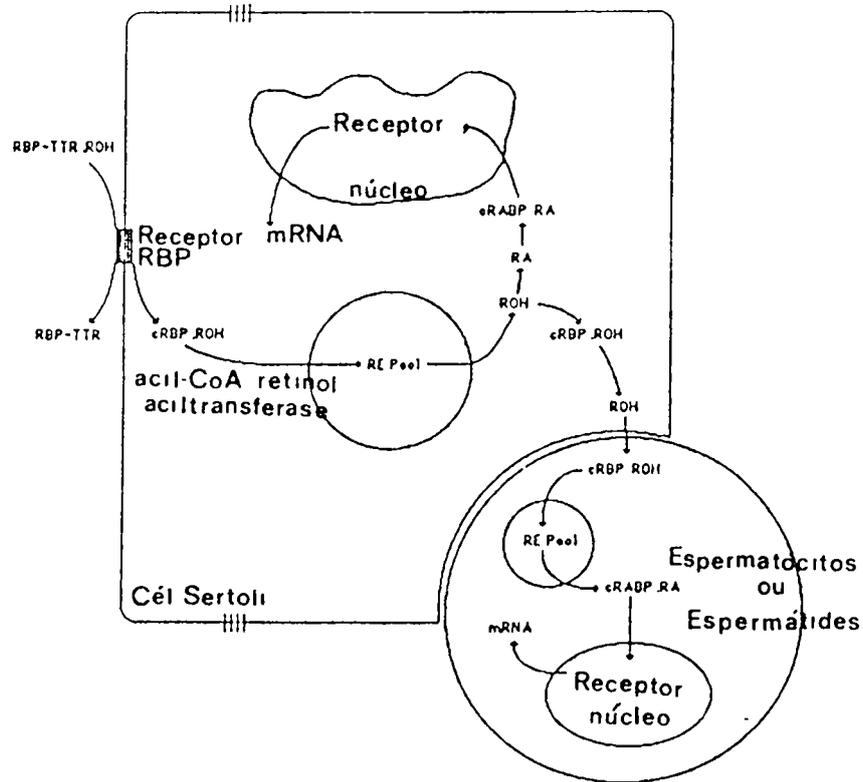


FIGURA I 17 MECANISMO PROPOSTO PARA A AÇÃO DOS RETINÓIDES NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

O retinol (ROH), na forma de ROH-RBP-TTR, é liberado para receptores específicos na membrana basal das células de Sertoli. O ROH é captado, esterificado e estocado em gotas de gordura. O retinol livre ou o ácido retinóico (RA) não reagem com as proteínas ligadoras celulares. O retinol, liberado por hidrólise dos ésteres armazenados (RE-pool), pode ter diversos destinos: ser metabolizado a RA e, através do receptor nuclear, ativar genes específicos nas células de Sertoli; ser transferido para espermatócitos e espermatídes redondas onde é captado e metabolizado a ácido retinóico ou estocado como retinil ésteres. O ácido retinóico pode também atuar a nível de receptores nucleares em células da série germinativa. Os ésteres de retinol servem como fonte de retinóides para o espermatozóide durante a maturação.

CRABP - proteína celular carregadora de RA; CRBP - proteína celular carregadora de ROH.

-Retirado de GRISWOLD et al. (1989).

#### I.3 4 Receptores nucleares para a vitamina A

A existência em oviduto de galinha de um receptor nuclear para o retinol, que também ligaria retinil acetato e retinil palmitato mas não ácido retinóico, foi descrita por DAS et al (1978). Neste trabalho, os autores sugeriram que o retinol poderia ser chamado de hormônio co-esteróide

A partir de estudos que demonstraram que a diferenciação induzida por ácido retinóico de células F9 do teratocarcinoma de camundongos era acompanhada por um aumento na transcrição de genes específicos e da descoberta da localização nuclear do ácido retinóico, GREEN e CHAMBON (1986) sugeriram que, semelhantemente aos hormônios esteróides, o ácido retinóico poderia mediar a transcrição gênica via receptores nucleares específicos.

GIGUERE et al.(1987), ao descreverem o receptor para o ácido retinóico, apontaram para o fato de que a existência de uma família de genes responsáveis pela síntese dos recaptadores implicaria na necessidade de mais de uma proteína receptora relacionada. Essas proteínas ligadoras (receptores), quando combinadas com seu ligante específico, têm a propriedade de se unir a sequências regulatórias específicas do DNA e, em última análise, aumentar ou diminuir a síntese de proteínas específicas

Estudos fisiológicos têm mostrado que tanto o ácido retinóico como o retinol exercem potentes efeitos na diferenciação celular e que esses efeitos, frequentemente, não estão relacionados. Tais fatos podem indicar que um dos produtos gênicos, citados por GIGUERE et al. (1987), seja um receptor específico para o retinol ou para outro membro da família dos retinóides.

ESKILD et al (1991) não descartaram a possibilidade da existência nas células de Sertoli de um receptor nuclear específico para o retinol, responsável pelas ações da vitamina no controle da espermatogênese.

Outra surpresa encontrada no estudo dos receptores

para retinóides está na sua semelhança com os receptores de hormônios da tireóide. Essa semelhança surpreende pelas diferenças estruturais existentes entre os hormônios da tireóide (derivados da tirosina) e dos retinóides (derivados do ácido mevalônico). A observação de que moléculas quimicamente distintas possam interagir em receptores com estruturas análogas deve refletir um modo de ação semelhante (GIGUERE et al., 1987).

Estas descobertas mostram que o mecanismo de ação do ácido retinóico (derivado da vitamina A) é bastante semelhante ao dos hormônios esteróides e ao da tiroxina, envolvendo a ativação de genes específicos. A partir delas, no entender de muitos pesquisadores, os retinóides deveriam ser colocados na categoria dos hormônios que regulam o crescimento, a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário (GIGUERE et al., 1987; PETKOVICH et al., 1987; DARMON, 1990 e WOLF, 1990).

Ao contrário dos hormônios clássicos, os retinóides não são sintetizados em um órgão endócrino específico, mas são produzidos em diversos tecidos pela transformação metabólica da vitamina A (retinol) e dos carotenóides presentes na dieta (DARMON, 1990). WOLF (1990) sugere que o fígado que contém grandes estoques de vitamina A, na forma de retinil-ésteres, poderia ser considerado como órgão endócrino.

PETKOVICH et al. (1987) propõem que a CRABP possa funcionar como uma lançadeira que liberaria o ácido retinóico para o seu receptor nuclear. Esta proposição está baseada na relação existente em alguns tipos celulares, entre os níveis de CRABP e a responsividade ao ácido retinóico. A existência de uma família de genes relacionados com os receptores de ácido retinóico pode representar uma situação análoga à dos hormônios da tireóide, na qual dois receptores celulares parecem ligar o mesmo hormônio. Outra possibilidade seria a existência de

ligantes diferentes, um deles sendo por exemplo, o retinol. A existência de uma proteína ligadora de retinol (CRBP) e a sua importância para muitas células epiteliais, como as germinativas nos testículos que degeneram mesmo em presença de ácido retinóico, garantem, segundo os autores, a validade desta hipótese.

HASHIMOTO (1991), estudando os ácidos retinobenzóicos, derivados sintéticos do ácido retinóico, determinou que, pelo menos dois destes compostos não precisam da ligação com a CRBP para exercer suas funções como retinóides.

No genoma humano, foram descritos três genes para a RAR (proteína receptora do ácido retinóico) o  $\alpha$ , o  $\beta$  e o  $\gamma$ . A similaridade entre as três sequências de aminoácidos está entre 94 a 97% para a região de ligação ao DNA e entre 84 e 90% na região de ligação ao hormônio. A transcrição dos três tipos de RAR no embrião e no adulto é uniforme, na cartilagem e na pele predomina a transcrição de  $\gamma$ ,  $\beta$  no sistema nervoso e  $\alpha$  predomina nas células hematopoiéticas (DARMON, 1990).

Algumas das ações do ácido retinóico sobre o genoma, descritas por WOLF (1990), estão representadas pela FIGURA I 18 A estimulação em sinergismo com o T<sub>3</sub>, da transcrição do gen do hormônio do crescimento em culturas de células hipofisárias, provavelmente ocorre pela atuação cooperativa da T<sub>3</sub>R (proteína receptora do T<sub>3</sub>) e da RAR sobre o gen do hormônio de crescimento. Outra proteína que também é afetada pelo ácido retinóico é a laminina. Os três tipos de RAR podem estimular a transcrição do mRNA da laminina.

Em resumo, duas proteínas que estão envolvidas diretamente com funções conhecidas da vitamina A, o hormônio do crescimento, que, junto com os hormônios da tireóide, regula o crescimento e a laminina, que é importante nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, são reguladas pela ligação das RAR às regiões promotoras dos respectivos genes (WOLF, 1990).

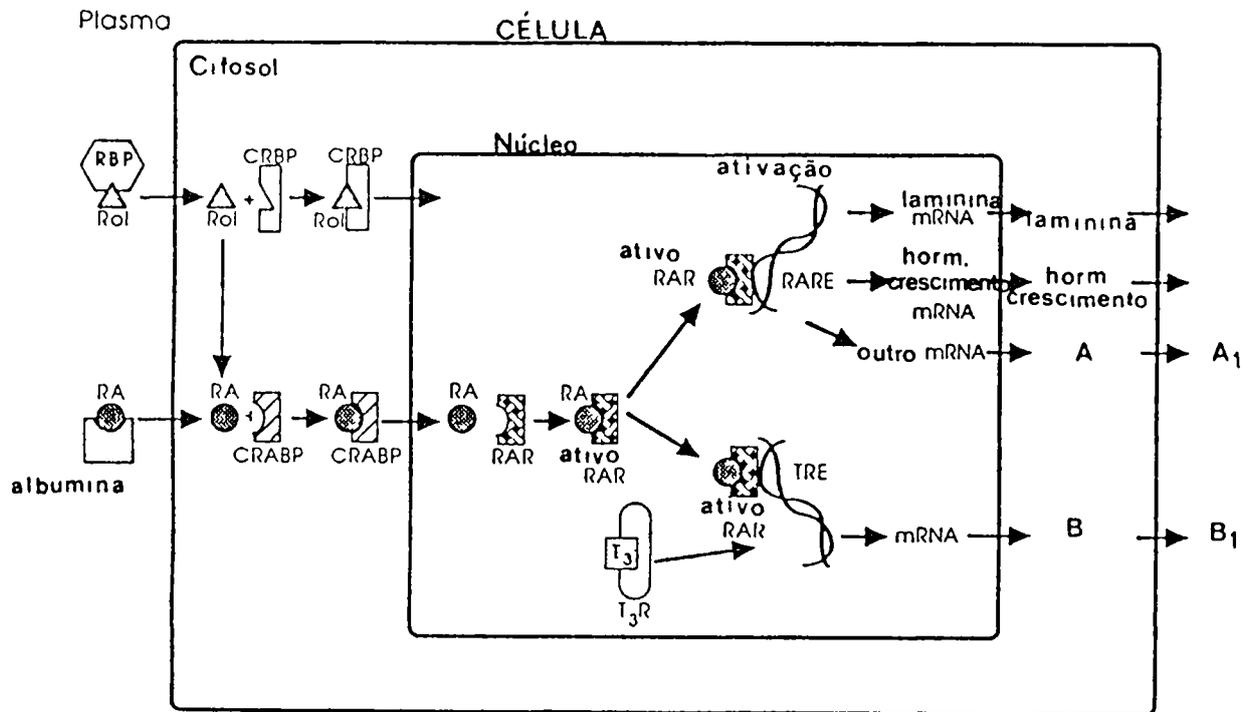


FIGURA I 18 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA AÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO SOBRE O GENOMA

RBP, proteína plasmática ligadora de retinol; Roi, retinol; RA, ácido retinóico; CRBP, proteína celular ligadora de Roi; CRABP, proteína plasmática ligadora de RA; RAR, receptor para RA, RARE, elemento responsivo ao ácido retinóico (parte da região promotora do gen que aumenta transcrição após a ligação de RA-RAR); TRE, elemento responsivo ao  $T_3$ ;  $T_3$ , tiroxina;  $T_3R$ , receptor para a tiroxina. A, outras proteínas responsáveis ao RA;  $A_1$ , resposta biológica alterada; B, proteínas responsáveis aos hormônios da tireóide;  $B_1$ , resposta metabólica alterada  
Retirado de WOLF (1990).

GLASS et al.(1989), discutindo a interação entre os receptores do ácido retinóico e os dos hormônios da tireóide, fazem o seguinte comentário: "A observação de que os hormônios da tireóide e o ácido retinóico podem interagir funcionalmente levanta a possibilidade de interação também com outros membros da superfamília dos hormônios esteróides, resultando num novo padrão de regulação gênica."

MANGELSDORF et al (1990) descreveram uma proteína receptora para o ácido retinóico, chamada RXR $\alpha$  que não faria parte da subfamília das RAR anteriormente descritas. A maior expressão da proteína RXR $\alpha$  foi encontrada em células de fígado de mamíferos. Os autores sugerem a existência de um sistema regulatório paralelo, pelo qual os retinóides também poderiam exercer controle da transcrição gênica.

ESKILD et al (1991) encontraram altos níveis de RAR $\alpha$  em células de Sertoli, em espermátides redondas e em uma linhagem tumoral de células de Leydig; as células peritubulares também apresentam, embora em níveis muito baixos, receptores tipo RAR $\alpha$ .

A existência de cofatores nucleares que mediarão as ações (ativando ou inibindo) de substâncias que atuam através de receptores da superfamília dos esteróides (hormônios esteróides, tiroideos e retinóides) levanta a possibilidade da existência de um controle que determinaria a hierarquia da resposta celular a vários ligantes (HASHIMOTO, 1991).

### I 3 5 Retinol e Glicoproteínas

DE LUCA, em 1977, em uma extensa revisão sobre o papel da vitamina A nas reações de glicosilação em membranas de mamíferos, concluiu que o envolvimento da vitamina A, na formação de retinil-fosfato-manose e de retinil-fosfato-galactose, estava bem estabelecido. Sugeriu também que, pelo menos no fígado, a transferência de manose a partir de retinil-fosfato-manose era feita diretamente para a proteína e não para intermediários lipídicos, como no caso do dolícil-fosfato-manose.

Muitos trabalhos têm sido feitos para estudar as características da biossíntese do retinil-fosfato-manose. DE LUCA et al. (1979) determinaram que o retinil-fosfato-manose representava de 20 a 40% dos manolipídios celulares. SHIDOJI e DE LUCA (1981) mostraram que as enzimas em microsomas de fígado de rato catalisam a transferência de manose de GDP-manose para retinil-fosfato com alta eficiência em ausência de detergentes. A demonstração de que, no retículo endoplasmático de células de fígado de rato, existiam dois sistemas de manosilação, um retinil-fosfato dependente e outro dolícil-fosfato dependente foi feita por CREEK et al. (1983). No mesmo trabalho, os autores também mostraram que o retinil-fosfato deve atuar a nível de processamento nas mesmas glicoproteínas construídas pela rota do dolícil. Argumentaram que o tratamento com tunicamicina inibe cerca de 60% da manosilação de aceptores endógenos tanto por retinil-fosfato-manose quanto por dolícil-fosfato-manose.

A habilidade de fosfolipídios extraídos de microsomas e da esfingomielina restabelecerem a síntese de retinil-fosfato-manose por membranas previamente tratadas com fosfolipase C, descrita por SHIDOJI et al. (1983), sugere que os fosfolipídios de membrana são necessários para esta atividade.

CREEK e MORRE (1980) determinaram o efeito do retinol sobre a atividade de uma galactosil-transferase associada à

retinol. O FSH foi o único dos hormônios que provocou sozinho estimulação da secreção de transferrina. A insulina estimula a resposta das células de Sertoli ao FSH, à testosterona, à combinação de FSH e testosterona e à combinação de FSH, testosterona e retinol de forma constante, em aproximadamente 200%. Em culturas tratadas com retinol, em presença de insulina, a estimulação em relação as células controle foi de mais de 300%. Os autores também mostraram que o ácido retinóico estimula a secreção de transferrina mais efetivamente que o retinol.

KARL e GRISWOLD (1980) demonstraram que a insulina e a vitamina A atuam independente e sinergisticamente para estimular a secreção de ABP em culturas de células de Sertoli.

Os resultados obtidos por SKINNER et al. (1989) indicam que agentes regulatórios que atuam via mecanismos de transdução de sinais mediados por AMP cíclico, devem provavelmente regular, de maneira similar, a produção de ABP e transferrina por células de Sertoli. No mesmo trabalho, os autores mostram que o retinol provoca o aumento dos níveis dos mRNA da transferrina e do ABP. Embora o retinol, a insulina e o FSH possam estimular a expressão dos genes da transferrina e do ABP, uma combinação destes agentes é necessária para a obtenção da estimulação máxima. A ação do retinol e da insulina sobre os níveis dos mRNA e sobre a síntese de transferrina e ABP indica que deve existir outro mecanismo de regulação independente de AMP cíclico. Logo, a estimulação máxima da expressão dos genes da transferrina e do ABP parecem requerer uma ação combinada de mais de um tipo de sinal de transdução.

HUGLY e GRISWOLD (1987) demonstraram que o aumento dos níveis do mRNA da transferrina em células de Sertoli provocado por retinol, seria devido a uma estimulação da transcrição do gen da transferrina, e não a uma inibição no seu "turnover".

O tratamento com retinol de culturas de células de Sertoli provocou um efeito estimulatório sobre a síntese e secreção de glicoproteínas manosiladas (GALDIERI e MONACO, 1983). O estudo apontou um aumento de 3 vezes na incorporação de manose a glicoproteínas celulares, depois da adição de retinol, sem que tenha havido uma variação qualitativa no seu perfil eletroforético. Já ao analisar a atividade secretória das células de Sertoli, os autores verificaram que dois dos produtos de secreção estavam seletivamente aumentados. Os pesos moleculares destes peptídeos correspondem aos do ABP e do ativador de plasminogênio.

GALDIERI e NISTICO (1986) descreveram a modificação provocada pelo tratamento com retinol na composição dos glicopeptídeos presentes em culturas de células de Sertoli. Confirmando resultados anteriores (GALDIERI e MONACO, 1983), os autores mostraram que o retinol aumentou a incorporação de manose e glicosamina em glicoconjugados celulares. Cromatografias de afinidade, em concanavalina A e em aglutinina de germe de trigo, mostraram que células de Sertoli cultivadas em presença de retinol apresentavam maior percentagem de glicopeptídeos do tipo "high mannose" (alto conteúdo em manose) que as células controle.

Os resultados de GALDIERI e MONACO (1983) também indicaram que o retinol induz um aumento na incorporação de manose nos lipídios solúveis em metanol.

#### I 4 OBJETIVOS

Em função do exposto, observa-se a importância do retinol e das glicoproteínas na função testicular normal. Muito se tem descrito sobre a participação indispensável do retinol na espermatogênese em mamíferos, porém pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares responsáveis por sua ação. O envolvimento do retinol nas reações de glicosilação de proteínas também é muito estudado a nível de sua atuação direta nas reações de transferência glicosídica, mas pouco se sabe ou apenas se sugerem possibilidades sobre seu desempenho na modulação da atividade das enzimas da rota de glicosilação de proteínas.

Considerando a função central das células de Sertoli na fisiologia dos testículos, o fato de serem o alvo mais provável da ação do retinol nesse órgão e os efeitos estimulatórios do retinol sobre a biossíntese e secreção de glicoproteínas em células de Sertoli, já descritos por vários autores, o presente estudo se propõe a elucidar em que passo(s) da biossíntese de *N*-glicoproteínas o retinol atuaria e qual ou quais seriam os possíveis mecanismos moleculares de sua ação.

Para atingir tais objetivos, serão seguidos os seguintes passos:

- 1- Caracterização das classes de glicoproteínas existentes em células de Sertoli.
- 2- Análise das diferentes etapas biossintéticas das *N*-glicoproteínas em culturas de células de Sertoli (formação de dolícil-P-manose, de dolícil-PP-oligossacarídeo e a transferência do oligossacarídeo para a proteína), utilizando [2-<sup>3</sup>H]manose como precursor radioativo.
- 3- Investigação dos efeitos do retinol sobre a biossíntese de *N*-glicoproteínas em culturas de células de Sertoli,

estudando a formação dos intermediários lipídicos.

4- Investigação da possibilidade da atuação do retinol nos diferentes níveis da síntese das cadeias polipeptídicas passíveis de serem glicosiladas.

5- Incubando com GDP-[<sup>14</sup>C]manose frações microsossomais obtidas de células de Sertoli controle e pré-tratadas com retinol, estabelecer a(s) enzima(s) da rota de N-glicosilação cuja atividade seria modificada pelo tratamento com a vitamina A.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. MATERIAIS

- 1-)  $\underline{\underline{D}}$ -[2- $^3\text{H}$ ] manose, atividade específica: 18,3 Ci/mmol;  
[metil- $^3\text{H}$ ] timidina, atividade específica: 2,0 Ci/mmol;  
[5,8- $^3\text{H}$ ] uridina, atividade específica: 5,0 Ci/mmol;  
GDP-[ $^{14}\text{C}$ ] manose, atividade específica: 282 mCi/mmol  
(Amershan International).
- 2-)  $\underline{\underline{D}}$ -[1- $^3\text{H}$ ] glicose, atividade específica: 15 mCi/mmol;  
[U- $^{14}\text{C}$ ] leucina, atividade específica: 344 mCi/mmol  
(New England Nuclear).
- 3-) Colagenase Tipo I; inibidor de tripsina (Soy Bean);  
all-trans-retinol; DNA Tipo I; Dowex 50W-X2 ( $\text{H}^+$ ) 400  
mesh; Dolicil fosfato; DMEM (Dulbecco's Modified  
Eagle's medium); kanamicina (Sigma).
- 4-) Pronase (Calbiochem).
- 5-) Endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase H (Miles Laboratories).
- 6-) Tripsina 1/250 (Difco).
- 7-) Soro Fetal Bovino (testado para micoplasma) (Cultilab).
- 8-) Placas de Sílica Gel (Merck).
- 9-) RNA- poli (A) (preparado e gentilmente doado pelo  
Centro de Biotecnologia- UFRGS).
- 10-) Dowex 50W-X8 ( $\text{H}^+$ ) 20-50 mesh; Dowex 1-X8 (Formiato)  
20-50 mesh (Baker Analysed Reagent).

Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza "pró-análise" (PA).

Todo material (vidraria, pipetas, filtros, etc) utilizado nas culturas de células era lavado com Extran alcalino (Merck), enxaguado exaustivamente com água da torneira e por imersão em água destilada (5 vezes em água destilada comum e 2 vezes em água destilada em vidro).

A vidraria (copos, tubos de ensaio, pipetas Pasteur, etc) e o material cirúrgico eram esterilizados por autoclavagem a 121°C e 1 atm por 40 minutos e, posteriormente, mantidos em estufa seca a 120°C até o momento do uso. Os filtros com membranas de 0,2 µm eram autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

As soluções salinas, enzimas e meios de culturas eram esterilizados por filtração por membranas de 0,2µm. A esterilidade de todas as soluções era testada, por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana pelo menos 24h antes do uso.

Os meios de cultura, soluções salinas e soluções de enzimas eram preparados com água tridestilada em vidro, sendo que a última destilação era feita sempre no dia de utilização.

Os pH dos meios, das soluções salinas e das soluções de enzimas eram acertados com NaOH 0,1N, preparado com água tridestilada.

## II 1 1 Soluções Salinas e Meio de Cultura Utilizados

### II 1.1.1. Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS-1)

Utilizada no preparo da colagenase, do inibidor de tripsina e para lavagens das células durante a cultura.

---

CaCl <sub>2</sub>	1,29 mM
KCl	5,36 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,10 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,65 mM
NaCl	136,9mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27 mM
glicose	6,10 mM
.....	.....
pH 7,4	

---

## II 1 1 2 Solução Salina Fosfato Tamponada(PBS-2)

Utilizada na lavagem das células após as incubações e nas homogeneizações

---

NaCl	136,9mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,10 mM

pH 7,4

---

## II 1 1 3 Solução Salina Fosfato Tamponada sem Cálcio e Magnésio (CMF-PBS)

Utilizada para o preparo da solução de tripsina

---

NaCl	136,9mM
KCl	5,36 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,10 mM
Glicose	6,10 mM

---

O pH da solução de tripsina era acertado em 7,8 com NaOH 0,1N

## II 1 1.4 Krebs Ringer Bicarbonato (KRB)

Utilizada na incubação de túbulos seminíferos SCE

---

NaCl	118 mM
KCl	4,61mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19mM
MgSO <sub>4</sub>	0,76mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,0mM
Glicose	5,0 mM

---

A solução era gaseificada com carbogênio (O<sub>2</sub> CO<sub>2</sub>, 95:5, v/v) até que fosse atingido pH 7,4.

II.1 1.5 Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco  
(DMEM)

Componente	g/l
L-Arginina. HCl	0,084
L-Cisteína 2HCl	0,0626
L-Glutamina	0,584
Glicina	0,030
L-Histidina HCl.H <sub>2</sub> O	0,042
L-Isoleucina	0,105
L-Leucina	0,105
L-Lisina HCl	0,146
L-Metionina	0,030
L-Fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042
L-Treonina	0,095
L-Triptofânio	0,016
L-Tirosina. 2Na. 2H <sub>2</sub> O	0,1038
L-Valina	0,094
Cloreto de Colina	0,004
Ácido Fólico	0,004
myo-Inositol	0,0072
Niacinamida	0,004
Ácido D-Pantotênico	0,004
Piridoxal. HCl	0,004
Riboflavina	0,0004
Tiamina HCl	0,004
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,265
(NO <sub>3</sub> )Fe. 9H <sub>2</sub> O	0,0001
MgSO <sub>4</sub>	0,09767
KCl	0,400
NaCl	6,400
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,109
<u>D</u> -Glicose	1,000
Vermelho de Fenol	0,0159
Piruvato de Sódio	0,110
NaHCO <sub>3</sub>	3,700

O pH do meio foi acertado em 7,4 com HCl 1N ou NaOH 1N.

## II.2. MÉTODOS

### II.2.1 Obtenção de testículos enriquecidos em células de Sertoli (SCE)

Fêmeas prenhas de ratos Wistar, entre o 18<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia de gestação, recebiam uma dose de 100 Rads de radiação de cobalto. Esta irradiação provoca a degeneração dos gonócitos e não afeta as células de suporte (Sertoli) e células de Leydig (MEANS et al., 1976).

Através deste procedimento, obtêm-se ratos com túbulos seminíferos proporcionalmente enriquecidos em células de Sertoli, pois são desprovidos das células da série germinativa.

### II.2.2 Isolamento de túbulos seminíferos SCE

Para o isolamento de túbulos seminíferos, testículos de ratos Wistar SCE, dissecados da túnica albugínea eram submetidos à digestão com tripsina como descrito na FIGURA II.1.

### II.2.3 Obtenção de células de Sertoli

As células de Sertoli foram obtidas de ratos Wistar (cepa do IB-UFRGS), de acordo com DORRINGTON et al. (1975), (FIGURA II.1). Os animais foram mortos por asfixia com éter, lavados com sabão germicida e banhados em álcool iodado. Os testículos foram retirados em condições estéreis (capela de fluxo laminar), dissecados da túnica albugínea e fragmentados com bisturi.

Os tratamentos enzimáticos com tripsina e colagenase eram acompanhados de agitação, e as trocas de soluções entre um procedimento e outro, de sucessivas aspirações com pipeta Pasteur para ajudar a liberação das células.

Ao término deste processo, as células eram suspendidas em volume conhecido de meio de cultura. Uma alíquota era retirada para contagem em hemocitômetro com azul de tripan

para determinar a percentagem de viabilidade.

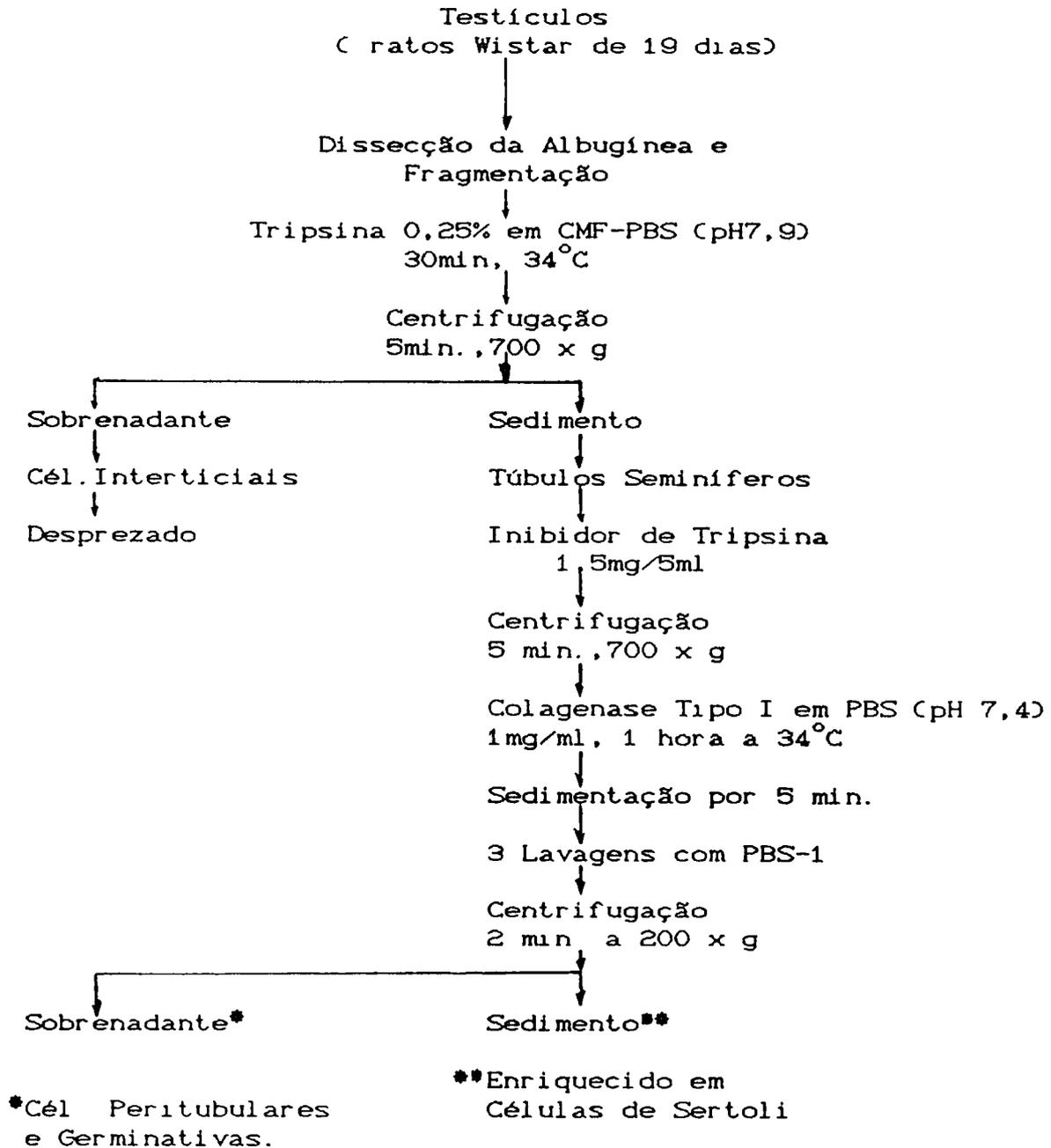


FIGURA II.1 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS E DE CÉLULAS DE SERTOLI:

Sendo as culturas de células de Sertoli primárias, os experimentos eram realizados com culturas de células obtidas de 1 ou mais ninhadas de ratos Wistar de 19 dias. Esta característica pode explicar a variabilidade encontrada nos resultados obtidos nos controles. Essa variabilidade, no entanto, não interfere na reprodutibilidade das diferenças experimentais detectadas.

#### II.2.4 Cultura primária de células de Sertoli

As células foram sempre semeadas em substrato plástico, aproximadamente na densidade de  $2.4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, e cultivadas por 24h em meio DMEM com 1% de SBF. Após, as culturas eram lavadas com PBS-1 e cultivadas por mais 24h em meio DMEM sem SBF. As culturas eram mantidas a 34°C em atmosfera normal (5% CO<sub>2</sub>, 95% de ar).

Os tratamentos com retinol eram iniciados somente após essas 48h de cultura.

#### II 2 5. Determinação da pureza das culturas de células de Sertoli

Em culturas enriquecidas de células de Sertoli, os possíveis tipos celulares contaminantes são as células germinativas e as peritubulares. O isolamento das células por tratamento com tripsina e colagenase produz agregados celulares que contêm aproximadamente 70% de células de Sertoli (TUNG et al., 1984). Após a incubação em plástico por 2 ou mais dias esta percentagem aumenta para mais 90%, porque a maioria das células germinativas contaminantes são retiradas pelas lavagens e trocas de meio das culturas. A presença de 1% de SFB apenas nas primeiras 24h de cultura, reduz a possibilidade de proliferação das células peritubulares contaminantes (TUNG et al., 1984).

## II.2 5 1. Determinação da atividade de fosfatase alcalina nas culturas - Detecção de células peritubulares

A percentagem de células peritubulares presentes nas culturas foi determinada pela coloração histoquímica da atividade de fosfatase alcalina, considerada um marcador de células peritubulares em culturas (CHAPIN et al., 1987)

As culturas foram fixadas com paraformaldeído 4%, 1h a 4°C, lavadas com tampão  $\beta$ - glicerofosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 e coradas pela técnica de Gomori para a fosfatase alcalina (CHAPIN et al., 1987)

Para determinação da percentagem de contaminação por células peritubulares, eram escolhidas aleatoriamente 5 campos para contagem das células em cada cultura examinada, sendo contadas em média 100 células por cultura e determinada a percentagem de células com atividade de fosfatase alcalina (peritubulares). O índice de contaminação encontrado ficou sempre entre 3 e 4%

### Coloração Histoquímica para a Fosfatase Alcalina de Gomori

---

#### Meio de incubação:

$\beta$ - glicerofosfato de sódio 0.1M	5 ml
CaCl <sub>2</sub> 2%	20 ml
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%	10 gotas
Barbital sódico	0.5 g
H <sub>2</sub> O desionizada	q. s p 50 ml

---

Filtrar e incubar as culturas a 37°C por 2h.

---

#### Revelação da atividade:

Lavar 1 min com H<sub>2</sub>O desionizada  
Sal de cobalto (cloreto ou sulfato) 1% - 5min  
Lavar com H<sub>2</sub>O destilada  
Sulfeto de amônio 5%  
Lavar com H<sub>2</sub>O destilada

---

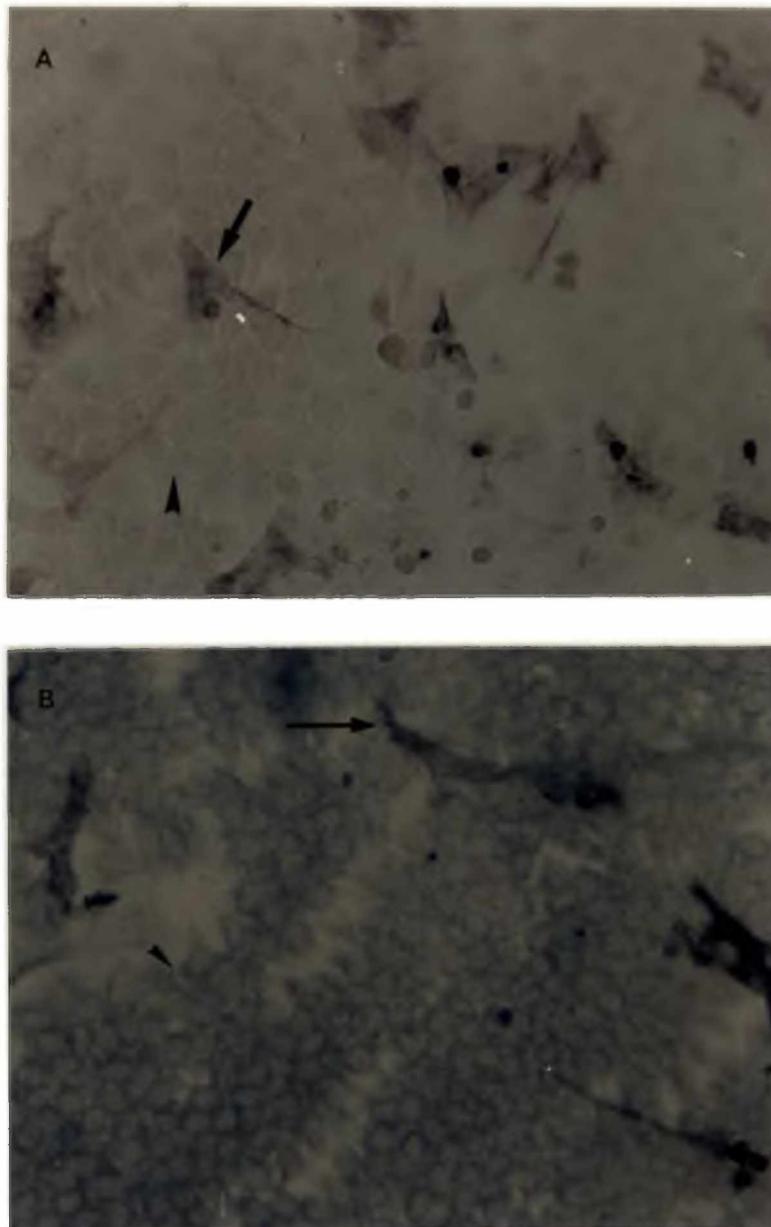


FIGURA II.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA PELO MÉTODO DE GOMORI EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI:

- Fixação e coloração realizadas 5 dias após a sementeira.
- A; culturas coradas para fosfatase alcalina (x160)
- B; culturas coradas para fosfatase alcalina e Sudan Negro (x160)
- As setas mostram as células peritubulares positivas para fosfatase alcalina; as cabeças de seta mostram as células de Sertoli negativas para fosfatase alcalina.

## II 2 5 2 Choque Hiposmótico - eliminação das células germinativas

A remoção das células germinativas que poderiam ainda estar associadas às células de Sertoli era feita por uma modificação proposta por OONK e GROOTEGOED (1987) do método descrito por GALDIERI et al.(1981). Esta técnica baseia-se na maior labilidade ao contato com meios hiposmóticos das células germinativas em relação às células de Sertoli.

No segundo dia de cultura, as células eram postas em contato por 1min com meio de cultura diluído 1.9 (v/v) com água tridestilada. Após, o meio era retirado e as culturas lavadas 2 vezes com meio não diluído. As culturas eram deixadas em meio sem SFB pelo menos 24h para recuperação, antes do início de qualquer tratamento.

Vários experimentos preliminares foram realizados, testando efeitos conhecidos do FSH e da insulina em células de Sertoli, comparando culturas tratadas por choque hiposmótico com outras não tratadas. Ambos os tipos de cultura responderam aos hormônios como esperado, não existindo diferenças significativas nos resultados. Por estes resultados iniciais e tentando diminuir ao máximo o manuseio das culturas, que aumentava o índice de contaminação bacteriana, resolveu-se dispensar o choque hiposmótico nos experimentos que compõem esta tese.

## II 2 6 Tratamento das culturas de células de Sertoli com retinol

O tratamento das culturas com retinol era iniciado sempre após 48h de cultura, como foi indicado em II.2.4. O retinol era adicionado ao meio de cultura dissolvido em etanol, estando as doses e os tempos de tratamento descritos em cada experimento. A concentração final do solvente no meio de cultura era sempre menor que 0.1%. As culturas controle recebiam a mesma quantidade do solvente.

Todo o manuseio feito com o retinol, desde a pesagem,

o preparo de soluções , sua adição aos meios de cultura era feito sem incidência direta de luz

## II 2 7 Obtenção de microssomas de células de Sertoli

Os microssomas de células de Sertoli-controle ou tratadas com retinol (48h com 10 $\mu$ M de retinol), eram obtidos pela técnica descrita por SARKAR e MOORKEJEA (1984), (FIGURA II 3).

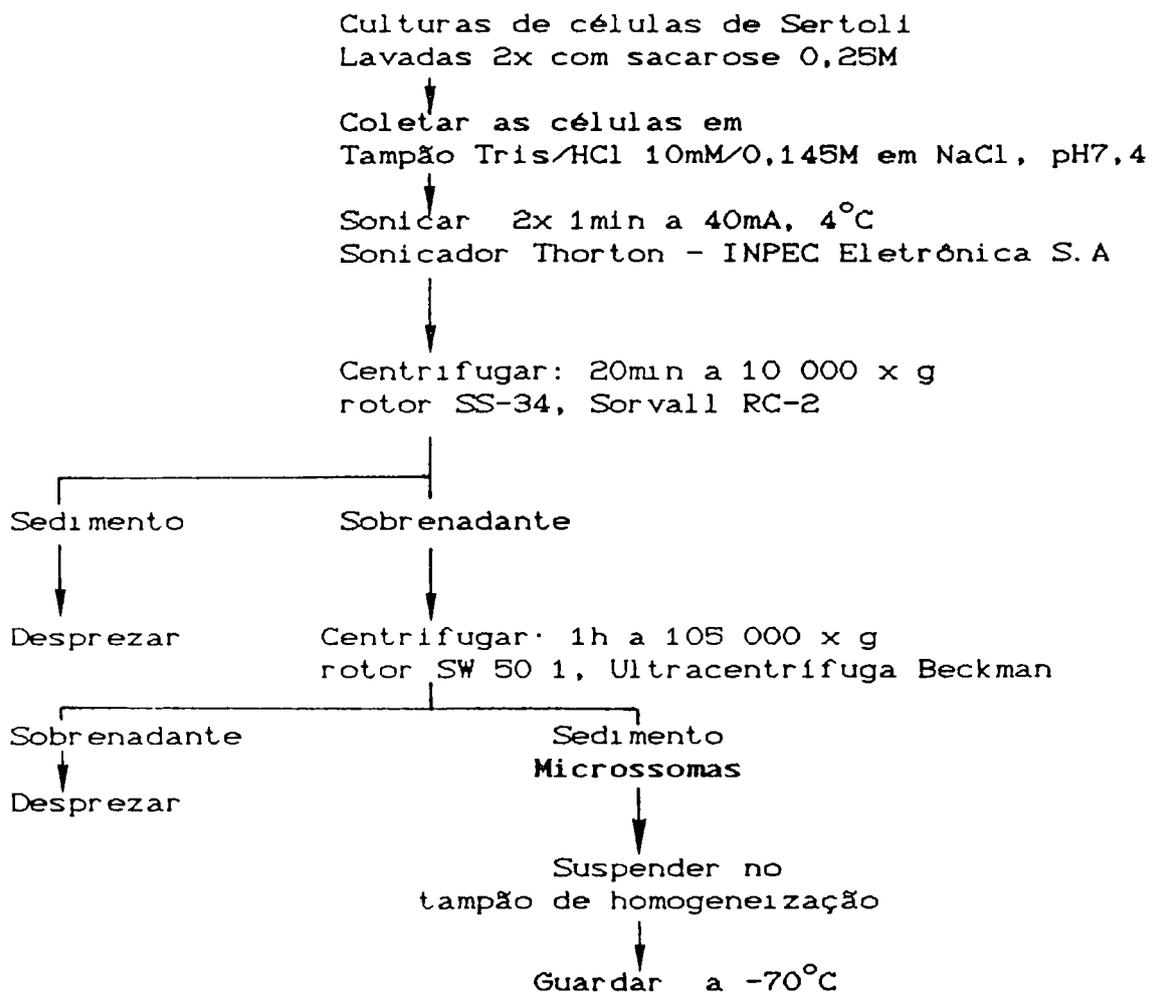


FIGURA II 3. OBTENÇÃO DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

A maior dificuldade desta técnica residia no baixo rendimento: 1mg de proteína microsomal era obtida de 4 garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, semeadas com 30x10<sup>6</sup> células cada. Para a obtenção desta quantidade de células (120x10<sup>6</sup> células), eram necessários pelo menos 12 ratos de 19 dias. Em um experimento com células-controles e tratadas com retinol (3 garrafas de 75cm<sup>2</sup> controles e 3 tratadas), a quantidade de proteína microsomal obtida era ao redor de 0.7mg para cada grupo e eram necessários, no mínimo, 15 ratos de 19 dias

## II 2 8 Incubações com precursores radioativos

### II 2 8 1 Incubações com [2-<sup>3</sup>H]manose

As células pré-incubadas ou não com retinol eram incubadas por tempos indicados em cada experimento com 10μCi/ml de [2-<sup>3</sup>H]manose.

Depois da incubação, o meio de cultura era retirado e as proteínas secretadas precipitadas por adição de TCA/PTA (concentração final 10% de TCA e 1% de PTA), como descrito por BERNARD e WASSERMANN (1982). Os precipitados eram coletados em filtros de fibra de vidro Whatman GF/A. Os filtros eram lavados 3 vezes com 20ml de TCA 5%, 3 vezes com 20ml de H<sub>2</sub>O destilada e 3 vezes com 20ml de uma mistura de etanol/éter etílico (1:1, v/v) Secavam-se os filtros em estufa a 100°C e contava-se a radioatividade.

Para medir a incorporação em glicoproteínas celulares e nos glicolipídios intermediários, as células eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas e sonicadas (2 x 30seg, 40mA) em PBS-2 Uma alíquota era retirada para a dosagem de proteínas Os glicolipídios eram extraídos utilizando-se a partição de Folch (FOLCH et al., 1957) (FIGURA II.4) A radioatividade incorporada nas glicoproteínas celulares era medida no pellet protéico delipidado dissolvido em ácido fórmico (GUMA et al , 1990)

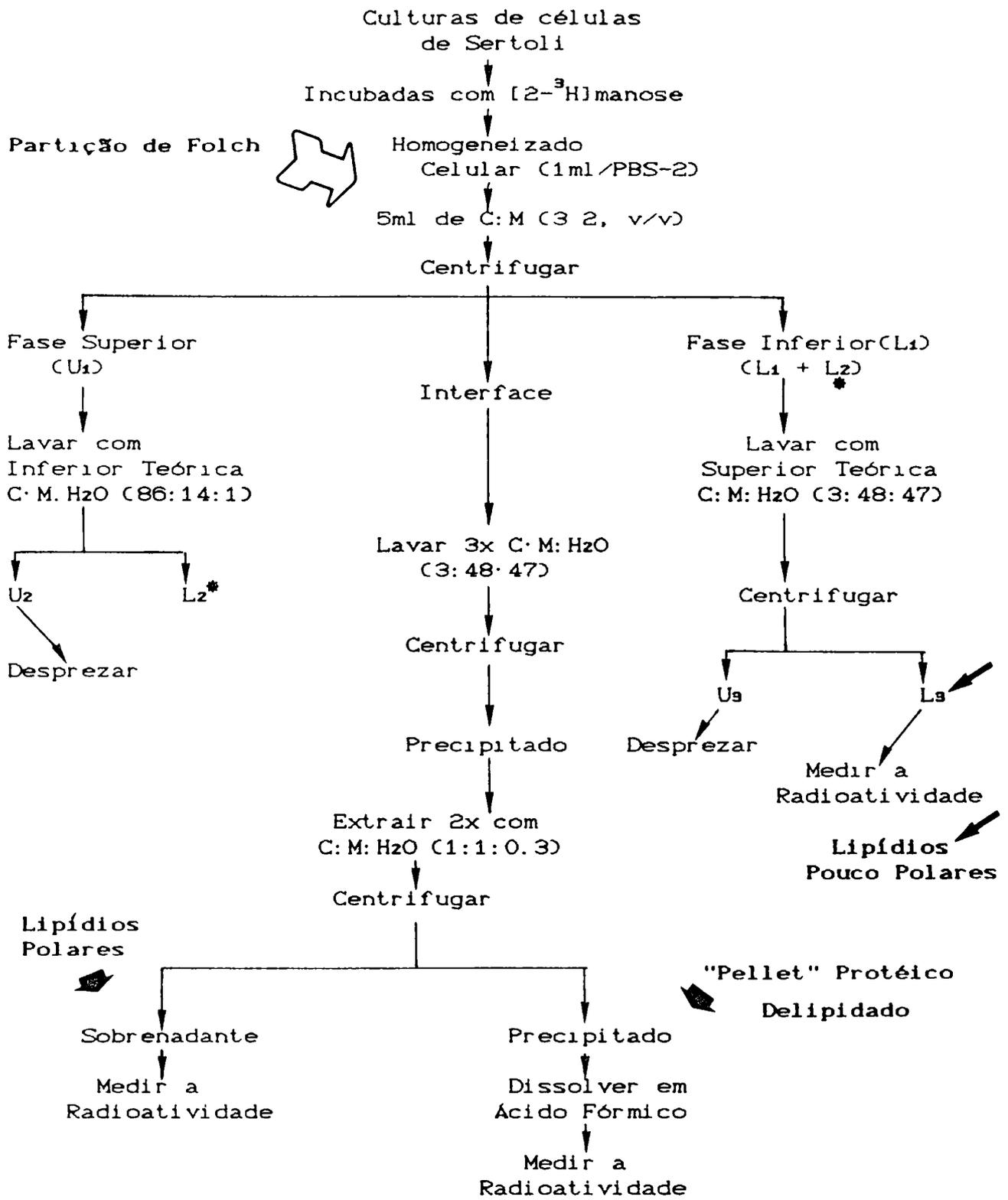


FIGURA II.4 PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS LIPÍDICOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE N-GLICOPROTEÍNAS

Na curva de tempo de incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose (FIGURA III 1 do capítulo III) a incorporação de radioatividade a proteínas celulares foi medida com descrito em II 2.8 2

#### II.2.8 2 Incubações com [U-<sup>14</sup>C]leucina

Células pré-incubadas ou não com retinol (10 μM por 48h) eram incubadas por 3h com 0,4 μCi/ml de [U-<sup>14</sup>C]leucina. Após a incubação, a incorporação em proteínas secretadas era medida com descrita em II.2 8 1. Para a medida da incorporação em proteínas celulares as culturas eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas e sonicadas como já indicado. Uma alíquota do homogeneizado era retirada para dosagem de proteínas. As proteínas celulares eram precipitadas com TCA (concentração final 10%). Os precipitados eram lavados 2 vezes com TCA 10% e hidrolisados por 15min a 100°C em TCA 10%, coletados em filtros de fibra de vidro Whatman GF/A e processados como descrito em II 2 8 1

#### II 2.8 3. Incubação das culturas com [metil-<sup>3</sup>H]timidina

Células de Sertoli pré-incubadas ou não com retinol (tempos e doses decritos em cada experimento) eram incubadas com 5 μCi/ml de [metil-<sup>3</sup>H]timidina. Depois da incubação, as células eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas e sonicadas em PBS-2. O DNA era precipitado pela adição de PCA (concentração final 0,2M) e hidrolisado em PCA 0,5M (15min a 100°C). Uma alíquota era retirada para dosagem colorimétrica do DNA e o restante usado para determinação da radioatividade por cintilação líquida.

O sobrenadante da precipitação com PCA 0,2M do homogeneizado celular era liofilizado, dissolvido em água e a radioatividade presente medida para determinação da radioatividade dentro da célula e não incorporada ao DNA (AZHAR et al ,1978)

#### II 2.8 4 Incubação das Culturas com [5,6-<sup>3</sup>H] uridina

Células-controle ou tratadas com 10 $\mu$ M de retinol por 48h eram incubadas por 3h com 5 $\mu$ Ci/ml de [5,6-<sup>3</sup>H] uridina. Depois da incubação, o meio era retirado e as culturas lavadas 3 vezes com PBS-2, raspadas e sonicadas. O RNA era precipitado do homogeneizado, extraído e hidrolisado como descrito no item II.2.14. Uma alíquota era retirada para leitura a 260nm e outra para medida da radioatividade por cintilação líquida.

#### II 2.8 5 Incubações de microsomas de células de Sertoli com GDP- [<sup>14</sup>C]manose

Microsomas obtidos de células-controle ou tratadas com retinol (10 $\mu$ M por 48h) eram incubados no sistema descrito por IUSEN et al (1984), modificado para microsomas de células de Sertoli.

Sistema de incubação para determinação da atividade de dolícil-fosfato-manose sintase:

---

	Concentração
Sacarose	150mM
Tampão Tris/Maleato pH 7.7	77 mM
Mercapto Etanol	92 mM
EDTA	3 mM
XCl <sub>2</sub>	8.9mM
Triton X-100	0.05%
Material enzimático	200 ou 500 $\mu$ g de proteína
GDP-[ <sup>14</sup> C]manose	85 a 510 pmoles
Volume total	100 $\mu$ l

---

X = Mg<sup>+2</sup> ou Mn<sup>+2</sup> ou os dois em quantidades equimolares.

As incubações eram realizadas sempre a 34°C por 10min. A reação era finalizada pela adição de 500 $\mu$ l de C:M (3:2, v/v), seguindo-se os procedimentos descritos na FIGURA II 4.

Quando as incubações eram feitas em presença de dolícil-fosfato exógeno, a solução de dolícil-fosfato era

evaporada junto com 10 $\mu$ l de Mg-EDTA (preparado por neutralização do ácido etileno-diamino-tetracético com MgO), já no tubo de reação sob vácuo a temperatura ambiente (BEHRENS eLELOIR, 1970) Os controles receberam somente Mg-EDTA. O dolícil-fosfato seco era dissolvido com a adição da mistura de incubação sem o material enzimático O material enzimático era adicionado depois da solubilização, e a reação era sempre iniciada com a adição do nucleotídeo-açúcar radioativo.

## II 2 8 6 Incubação de túbulos seminíferos SCE com [1-<sup>3</sup>H] glicose

Túbulos seminíferos obtidos de 4 testículos de ratos de 19 dias foram incubados em 1.5ml de KRB com 5 $\mu$ Ci de [1-<sup>3</sup>H]glicose por 1h a 37°C. Após a incubação, os túbulos foram submetidos à partição de Folch como descrito na FIGURA II 4 O "pellet" protéico delipidado resultante foi usado nas hidrólises alcalinas e na hidrólise ácida total.

## II 2 9 Coleta e rompimento das células

### II 2 9 1 Por tripsinização

Nos experimentos preliminares, as células eram coletadas por tratamento das culturas com tripsina 0.25% / EDTA 0 5mM em CMF-PBS como descrito por HAM e MCKEEHAN (1979) Após a liberação das células ( $\pm$  5min), a reação era inibida por adição de meio de cultura com 10% de SBF. As células eram lavadas 3 vezes com PBS-2, suspendidas e sonicadas (2 x 30seg, 40mA) em PBS-2.

### II 2 9 2 Por raspagem das células

Com o objetivo de evitar possíveis perdas de porções glicídicas de proteínas de membrana, causadas pela tripsinização, passou-se a coletar as células por raspagens das culturas do substrato plástico com um bastão com ponta de borracha (rubber policeman) Neste procedimento, as

culturas eram lavadas 3 vezes com PBS-2 gelado, raspadas e sonicadas (2 x 30seg, 40mA) também em PBS-2.

## II 2 10 Análises do "pellet" protéico delipidado

### II 2 10 1. Hidrólises alcalinas redutoras

II 2 10 1 1 Suave - O "pellet" protéico delipidado foi submetido à hidrólise em presença de hidróxido de sódio 0,1N e boroidreto de sódio 0,1M, a temperatura ambiente, durante 24h (GOLD e HAHN, 1978)

O material hidrolisado era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. Acrescentava-se TCA até se obter concentração final entre 5 e 10%. Após centrifugação, o precipitado era dissolvido em ácido fórmico e a radioatividade incorporada contada. O sobrenadante era lavado três vezes com éter sulfúrico saturado com água. Após evaporação, a radioatividade era contada.

II 2 10 1 2. Forte - O "pellet" protéico delipidado foi submetido à hidrólise em presença de hidróxido de sódio 2N e boroidreto de sódio 1M em ampola fechada com atmosfera inerte, a 100°C durante 8h (GOLD e HAHN, 1978).

O material hidrolisado era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. Acrescentava-se TCA até se obter concentração final entre 5 e 10%. Após centrifugação, o precipitado era dissolvido em ácido fórmico e a radioatividade contada por cintilação líquida. O sobrenadante era lavado três vezes com éter sulfúrico saturado com água. Após evaporação, a radioatividade era contada.

### II.2 10 2. Hidrólise ácida total

O "pellet" protéico delipidado foi submetido a hidrólise em presença de ácido trifluor-acético 2N em ampola fechada com atmosfera inerte, a 120°C durante 1h (GOLD e HAHN, 1976).

O material hidrolisado passava-se em Dowex 50-X8 (H<sup>+</sup>)

20-50 mesh e Dowex 1-X8 (H-COO<sup>-</sup>) 20-50 mesh. As colunas eram acopladas de forma que o eluato da Dowex 50-X8(H<sup>+</sup>) passava na Dowex 1-X8 (formiato), ambas as colunas eram lavadas com 5 volumes de água destilada. O material não ligado nas colunas era constituído de compostos neutros.

Os compostos que permaneceram ligados na coluna contendo Dowex 50-X8 eram eluídos com 4 volumes de ácido clorídrico 2N, sendo constituídos de compostos carregados positivamente (SPIRO, 1966)

Os compostos neutros eram analisados em cromatografia descendente em papel, no sistema de solvente A (II 2 11 1 )

Os compostos carregados eram analisados em cromatografia descendente em papel no sistema B (II.2.11 1).

A resina Dowex 1-X8 (formiato) foi preparada a partir da resina forma Cl<sup>-</sup> por passagem de formiato de sódio até reação negativa para cloretos (com AgNO<sub>3</sub>), a seguir, a resina foi lavada exaustivamente com água destilada

### II 2 10 3 Determinação de ácidos siálicos

A determinação da presença de ácido N-acetil-neuramínico foi feita no "pellet" protéico delipídado obtido de 2 culturas de células de Sertoli com 5 x 10<sup>6</sup> células cada.

O "pellet" foi hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N por 1h a 80°C segundo SPIRO (1966). Estas condições não causam destruição significativa dos ácidos siálicos depois de sua liberação

Depois da hidrólise, os ácidos siálicos foram separados das glicoproteínas restantes por adsorção, em uma coluna de Dowex 1-X8, 20-50 mesh (formiato). O hidrolisado diluído com água destilada até que a concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fosse 0,02N ou menos foi aplicado à coluna e a seguir a coluna foi lavada com 10 volumes de ácido fórmico 0,3N. O eluato foi liofilizado. O material liofilizado foi ressuscitado em água destilada e uma alíquota usada para determinação colorimétrica pelo método do ácido tiobarbitúrico (WARREN,

1959)

Os ácidos siálicos foram analisados por cromatografia em camada delgada (HPTLC) no solvente G (PURO, 1969; TAO e SWEELEY, 1970)

#### II 2 10 4. Tratamento com pronase

O "pellet" protéico delipidado foi submetido à digestão proteolítica com pronase, segundo HERCOVICS et al (1980).

Pré-incubação da enzima:

---

Tampão Tris/HCl, pH7,8	50mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Pronase	1 %
.....	

2h, 37°C

---

A digestão enzimática foi feita em "pellets" protéicos delipidados ( $\pm$  1 mg de proteína) obtidos de culturas controle e tratadas com retinol (10 $\mu$ M por 48h) e incubadas com 30uCl/ml de [2-<sup>3</sup>H]manose por 3h. Os "pellets" protéicos foram tratados por 72h a 37°C com pronase pré-incubada, inicialmente, com uma solução a 0.3% (no mesmo tampão de pré-incubação) Após 24h, eram adicionados mais 100 $\mu$ l de pronase pré-incubada e após 48h, mais 50 $\mu$ l. A digestão foi realizada sob tolueno

A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5min da mistura de incubação Uma aliquota foi retirada para medida da radioatividade total presente nos "pellets".

O material tratado com pronase era acidificado (até pH3.0) e passado em colunas de Dowex 50-X2(H<sup>+</sup>) 400 mesh e Dowex 1-X8 (H-COO<sup>-</sup>) 20-50 mesh, segundo GODELAINE et al (1981)

As colunas eram acopladas como descrito em II.2.10 2. A coluna de Dowex 50-X2 foi eluída com 4 volumes de NH<sub>4</sub>OH 1,5N e a de Dowex 1-X8 com ácido fórmico 3N.

O material eluído das colunas foi liofilizado e submetido a digestão enzimática com endoglicosidase-H

## II 2 10 5 Tratamento com endo- $\beta$ -N-acetil-glicosaminidase H

O tratamento com endoglicosidase H dos glicopeptídios produzidos pelo tratamento com pronase foi feito segundo CHALIFOUR e SPIRO (1984)

### Sistema de incubação da endo- $\beta$ -N-acetil-glicosaminidase H

---

Tampão Citrato de sódio, 0,2M, pH5.2	200 $\mu$ l
Soro albumina bovina	25 $\mu$ g
Endo- $\beta$ -N-acetilglicosaminidase H	10 mU

48h, 37°C sob tolueno.

---

A reação foi inativada por aquecimento a 100°C por 3min. Uma alíquota foi retirada para medida da radioatividade e os oligossacarídios produzidos pela ação da endoglicosidase H separados pelo mesmo sistema de colunas de Dowex, usado no item II.2.10.4, e analisados em cromatografia em camada delgada no sistema de solventes F (II 2 11.2).

## II 2 11 Cromatografias

### II.2 11 1 Cromatografias descendentes em papel

Foram feitas em papel Whatman 1 nos seguintes eluentes:

Solvente A: n-butanol: piridina: água (6:4:3, v/v), (BEHRENS e LELOIR, 1970).

Solvente B: sistema descrito por FISCHER e NEBEL (1955) solvente de eluição (colocado na canaleta superior da cuba piridina: acetato de etila: ácido acético: água (5 5 3 1, v/v); sistema de saturação colocado na parte inferior da cuba piridina: acetato de etila: água (11:40 6).

## II 2 11 2. Cromatografias em camada delgada

Foram realizadas em placas de alumínio com sílica gel (Merck) com 0 20mm de espessura.

Solventes C: clorofórmio metanol. água (65 25 4, v/v), (BEHRENS e LELOIR, 1970)

Solventes D: clorofórmio metanol. água (45 35 6, v/v), (CREEK et al., 1983)

Solvente E: n-propanol: água (70 30, v/v), (QUESADA-ALLUE, 1980)

Solvente F: n-propanol: ácido acético: água (3 3 2, v/v), 42h de corrida Na parte superior da placa era costurado uma tira de papel Whatman 3 Usou-se como padrões um hidrolisado de amilose, manose, maltose e rafinose (CHALIFOUR e SPIRO, 1984).

Solvente G:(para HPTLC), n-propanol água: NH<sub>4</sub>OH (6 2 7, v/v), (PURO, 1969; TAO e SWEELEY, 1970)

## II 2 12 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas nos homogeneizados celulares era medida de acordo com LOWRY et al.(1951), usando soro albumina como padrão.

## II 2 13 Determinação de DNA

O DNA era precipitado dos homogeneizados celulares por adição de PCA (concentração final 0,2M). Hidrolisado em PCA 0,5M e dosado pelo método de BURTON (1956), usando DNA tipo I como padrão

## II 2 14 Determinação do RNA Total

O RNA era extraído dos homogeneizados celulares após precipitação com PCA (concentração final 0,35M). Hidrolisado em KOH 0,35M (segundo LAMB et al., 1982). A concentração era determinada por leitura de uma alíquota a 260nm, usando-se como padrão um RNA poli A.

## II 2 15 Determinação da Radioatividade

As determinações quantitativas da radioatividade eram medidas em um espectrômetro de cintilação líquida LKB, modelo 1209 - RackBeta

Nos extratos em clorofórmio/metanol secos sob nitrogênio e nas proteínas precipitadas dos meios de cultura e de homogeneizados celulares, coletadas em filtros de fibra de vidro (GF/A Whatman), a radioatividade era medida em um líquido de cintilação à base de tolueno

Nos "pellets" protéicos solubilizados em ácido fórmico e nas outras amostras aquosas, a radioatividade era medida em Aquasol 2 (New England Nuclear) ou em um líquido de cintilação a base de Triton X-100 / tolueno

As cromatografias em papel eram cortadas em segmentos de 1cm de comprimento e contadas em líquido de cintilação à base de tolueno

As cromatografias em camada delgada eram raspadas de cm/cm e contadas em líquido de cintilação a base de tolueno

### Composição dos Líquidos de Cintilação

---

#### 1-) Tolueno:

---

POPOP	50mg
PPO	4 g
Tolueno	1 l

---

#### 2-) Triton-Tolueno

---

POPOP	125mg
PPO	8 5 g
Triton X-100	500ml
Tolueno	1l

---

## II 2 16 Revelação dos glicídios:

Os padrões de glicídios nas cromatografias em papel foram revelados com reagente de nitrato de prata (TREVELYAN, 1950) Nas cromatografias em camada delgada, os

padrões de glicídios foram revelados por aquecimento a 250°C por 10min (ALPERIN et al , 1983)

### II 3 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls (SNEDECOR e COCHRAN, 1978).

Quando apropriado foi utilizado o teste t de Student (SNEDECOR e COCHRAN, 1978).

### III RESULTADOS

Nesta tese foram utilizadas incubações "in vitro" de túbulos seminíferos SCE, de culturas células de Sertoli e de microssomas isolados dessas culturas. Os diferentes tipos de material biológico foram obtidos como descrito no capítulo II.

#### III 1 ANALISE DA INCORPORAÇÃO DE [2-<sup>3</sup>H]MANOSE EM GLICOPROTEÍNAS E GLICOLIPÍDIOS DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

##### II.1.1 Curvas de tempo de incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose

Células de Sertoli de ratos de 19 dias, cultivadas e submetidas a choque hiposmótico como descrito no capítulo II, foram incubadas com 7  $\mu$ Ci/ml de [2-<sup>3</sup>H]manose por 90, 180 e 360 minutos. A FIGURA III 1 mostra a curva de tempo de incorporação de manose a glicoproteínas celulares e secretadas. Verificou-se que a incorporação de manose radioativa a glicoproteínas celulares foi crescente até 360 minutos, atingindo um "plateau" em 180 minutos em proteínas secretadas.

Em outro experimento, analisou-se a cinética da incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose aos glicolipídios intermediários na biossíntese de N-glicoproteínas (FIGURAS III 2, A e B) e ao "pellet" protéico delipídado (FIGURA III.2, C). Para tal, células de Sertoli cultivadas por 5 dias foram incubadas com manose radioativa durante os mesmos tempos usados no experimento anterior. Os glicolipídios foram extraídos como descrito no capítulo anterior. Verificou-se que a incorporação nos compostos lipofílicos solúveis na fase inferior da partição de Folch aumenta até 360 minutos. Nos compostos solúveis em clorofórmio/metanol/água (1:1:0.3) e no "pellet" protéico delipídado, existe uma

fase inicial de incorporação mais lenta, aumentando a seguir. Isto sugere uma cinética de precursor produto.

A semelhança encontrada entre a cinética de incorporação de manose em proteínas celulares mostrada na FIGURA III.1 (culturas que sofreram choque hiposmótico) com a mostrada na FIGURA III 2,(C), "pellet" protéico delipidado de culturas que não sofreram choque, demonstra que não existem diferenças significativas no comportamento dos dois tipos de cultura, como foi descrito no capítulo II.

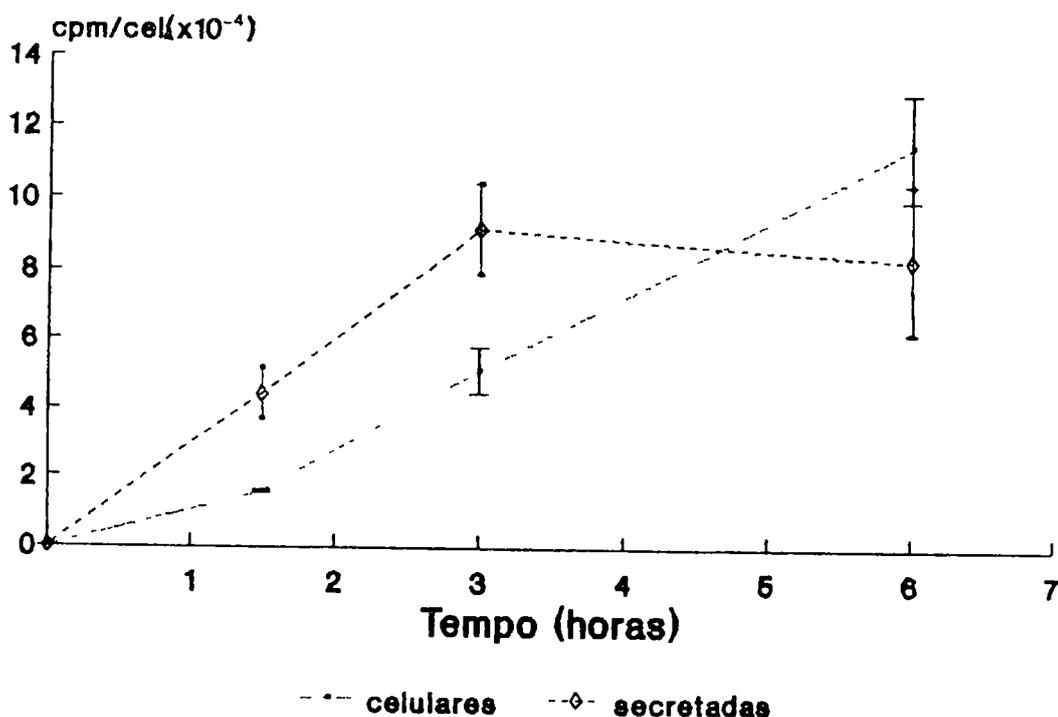


FIGURA III 1 CURVA DE TEMPO DE INCORPORAÇÃO DE [2-<sup>3</sup>H]MANOSE EM GLICOPROTEÍNAS CELULARES E SECRETADAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

- Cada ponto da curva representa a média  $\pm$  EPM de 4 culturas de células da mesma preparação celular. As proteínas secretadas foram obtidas por precipitação com TCA/PTA (concentração final 10% em TCA, 0,5% em PTA) das proteínas existentes no meio de cultura após o término das incubações. As proteínas celulares foram obtidas por precipitação com TCA (concentração final 10%), do homogeneizado das células coletadas por tripsinização após o término das incubações.

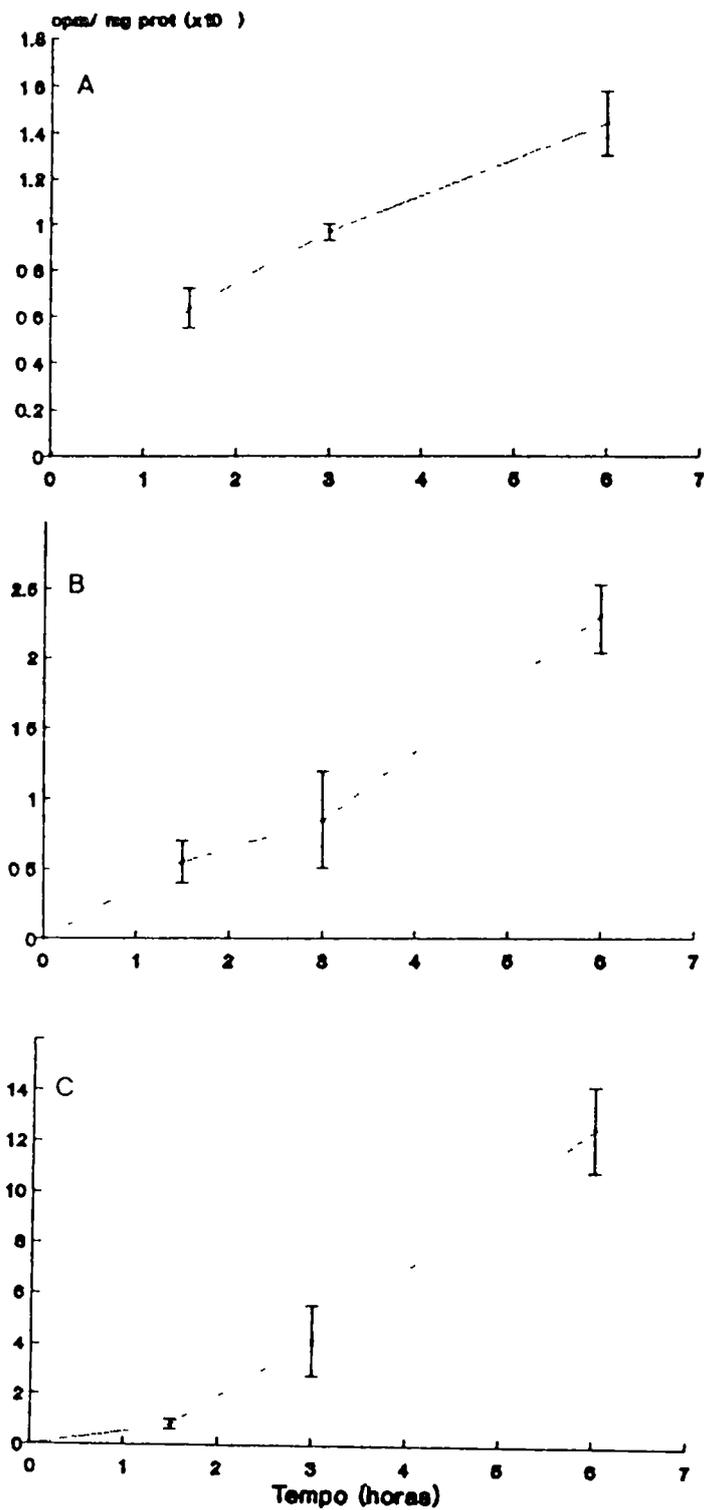


FIGURA III 2 CURVA DE INCORPORAÇÃO DE  $12\text{-}^3\text{H}$ IMANOSE EM GLICOLIPÍDIOS E NO "PELLET" PROTÉICO DELIPIDADO EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

2A - Compostos solúveis na fase inferior de Folch; 2B - Compostos solúveis em C M H<sub>2</sub>O (1:1:0,3); 2C - Pellet protéico delipidado  
 - Cada ponto das curvas representa a média  $\pm$  EPM de 3 culturas de uma mesma preparação celular

III 1 2 Análise por cromatografia em camada delgada (sílica gel) dos glicolipídios solúveis na fase inferior da partição de Folch e em clorofórmio/metanol/água (1:1:0,3)

Levando em conta os resultados apresentados nas FIGURAS III 1 e III 2, foram incubadas culturas de células de Sertoli por 3h com  $7\mu\text{Ci/ml}$  de  $[2\text{-}^3\text{H}]$ manose. Este tempo intermediário de incubação foi escolhido por já apresentar uma boa marcação com o açúcar radioativo e por permitir que o processamento dos experimentos fosse completado no mesmo dia da incubação das culturas.

O material solúvel na fase inferior de Folch foi aplicado em cromatografia em camada delgada, no solvente C. Observa-se na FIGURA III 3 que 30% da radioatividade aplicada corre em um pico com mobilidade semelhante a do padrão de dolícil-fosfato-manose. A maior parte da radioatividade corre com a frente do solvente e corresponde aos lipídios neutros também solúveis na fase inferior de Folch, como descrito por DEL PINO et al (1989).

Na FIGURA III 4, está representada uma cromatografia em camada delgada (sílica gel) dos compostos solúveis em clorofórmio/metanol/água (1:1:0,3). Aproximadamente 90% da radioatividade aparece em um único pico com a mesma mobilidade do dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo.

III 2 Caracterização quanto à união à cadeia polipeptídica

Pela dificuldade de juntar material protéico suficiente para os estudos descritos nos itens III.2 e III.3 a partir de culturas de células de Sertoli, foram utilizados túbulos seminíferos SCE que são enriquecidos em células de Sertoli.

A determinação do percentual de N- e O-glicoproteínas foi obtida utilizando-se a característica de labilidade das O-glicoproteínas a condições alcalinas suaves.

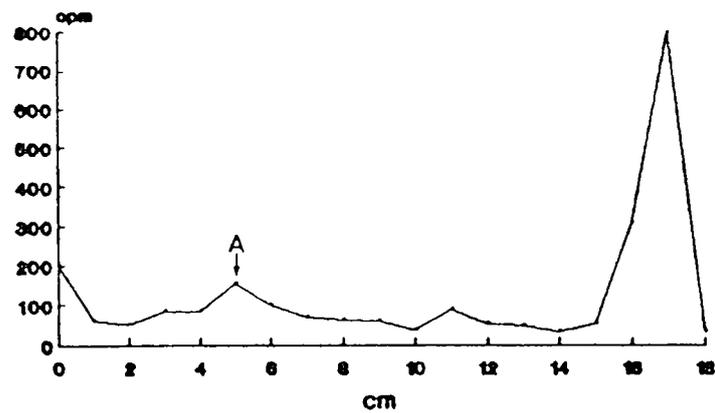


FIGURA III 3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO SOLÚVEL NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH  
 A - dolícil-fosfato-manose (Padrão)  
 Sistema de solventes C

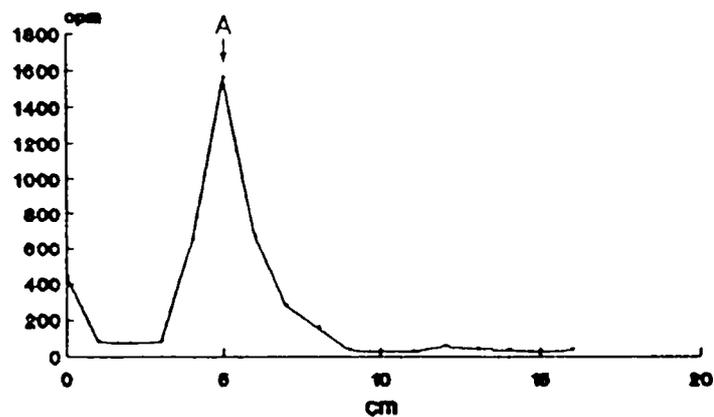


FIGURA III 4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO/METANOL/ÁGUA (1:1:0,3)  
 A - dolícil-pirofosforil-oligossacárido (Padrão)  
 Sistema de solventes E

O "pellet" protéico delipidado (marcado com [1-<sup>3</sup>H]glicose) de tubulos seminíferos SCE foi submetido à hidrólise alcalina suave redutora (0,1N NaOH e 0,1M NaBH<sub>4</sub>-24h a temperatura ambiente), obtendo-se 46% de hidrólise. Por hidrólise alcalina forte redutora (2N NaOH-1M NaBH<sub>4</sub>- 8h a 100°C), obteve-se 96% de hidrólise, o que revela a existência de igual quantidade de N- e de O-glicoproteínas

TABELA III 1

Tipo de união a cadeia peptídica	Hidrólise alcalina suave	Hidrólise alcalina forte
O-glicoproteínas	46%	
N- + O-glicoproteínas		96%

### III 3. Caracterização quanto à composição em oses das porções glicídicas

Com a finalidade de conhecer quais os glicídios que fazem parte da estrutura das glicoproteínas, foi realizada uma hidrólise ácida total com ácido trifluor-acético nas condições descritas no capítulo anterior. Neste experimento utilizam-se "pellets" protéicos delipidados contendo glicoproteínas marcadas com [1-<sup>3</sup>H] glicose, obtendo-se 95% de hidrólise. Os glicídios neutros e carregados presentes no hidrolisado foram separados em colunas de troca iônica.

A análise dos glicídios neutros foi feita em cromatografia descendente em papel no solvente A. A comparação com os padrões revelou a presença de galactose, manose e fucose (FIGURA III.5).

Os glicídios carregados foram analisados por cromatografia descendente em papel no sistema de Fischer e

Nebel (1955) A comparação com os padrões revelou a presença de glicosamina e galactosamina (FIGURA III 6).

Como nas condições de hidrólise ácida total, os ácidos siálicos são destruídos, em experimento separado, descrito no capítulo II, foram dosados os ácidos siálicos no "pellet" protéico delipidado de culturas de células de Sertoli, sendo determinada a existência de 0,067nmoles de ácidos siálicos por  $10^6$  células. A análise por TLC revelou a presença de ácido *N*-acetil-neuramínico nas glicoproteínas de células de Sertoli

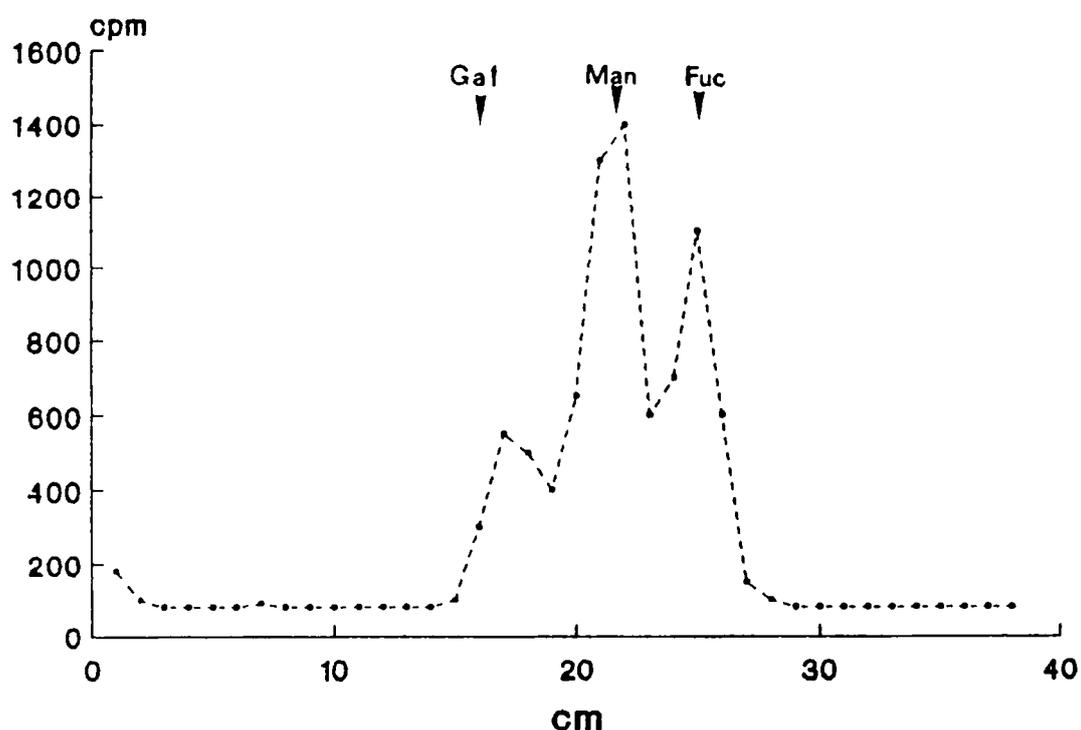


FIGURA III 5 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICÍDIOS NEUTROS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO "PELLET" PROTEICO DELIPIDADO MARCADO COM  $[1-^3\text{H}]$ GLICOSE

Sistema de solventes A

Man = manose; Gal = galactose; Fuc = fucose (Padrões).

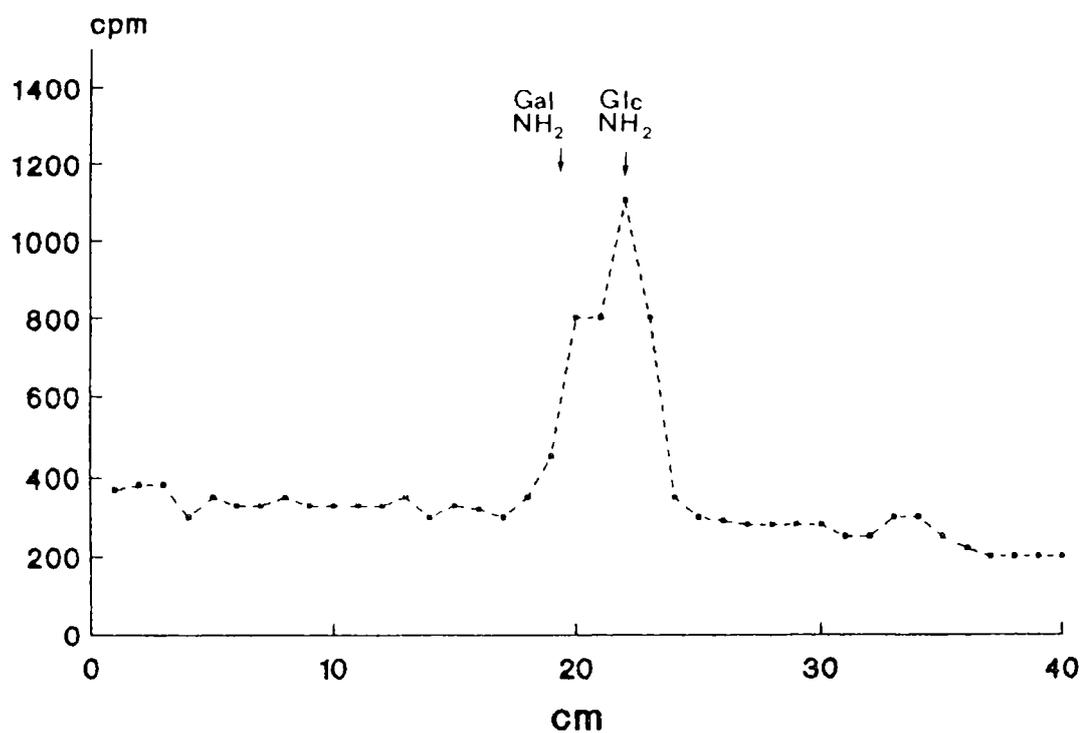


FIGURA III 6 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICÍDIOS CARREGADOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO "PELLET" PROTÉICO DELIPIDADO MARCADO COM [1-<sup>3</sup>H]GLICOSE

Sistema de solventes B

GalNH<sub>2</sub> = galactosamina, GlcNH<sub>2</sub> = glicosamina (Padrões).

### III 4 RETINOL EM CÉLULAS DE SERTOLI

Tendo como base os efeitos descritos para o retinol na manutenção da espermatogênese e sobre as reações de glicosilação de proteínas em diversos tipos celulares, inclusive em células de Sertoli, resolveu-se estudar os efeitos do retinol sobre a incorporação de [2-<sup>3</sup>H] manose em *N*-glicoproteínas e nos glicolipídios intermediários

#### III 4 1 Efeito do retinol sobre a incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose em glicolipídios e em glicoproteínas

Em um primeiro experimento, trataram-se culturas de células de Sertoli por 36h com 7 $\mu$ M de retinol. Após, as culturas foram incubadas por 3h com 50 $\mu$ Ci/ml de [2-<sup>3</sup>H]manose. Os resultados encontrados mostraram um aumento significativo na incorporação de manose ao dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo, ao "pellet" protéico delipidado e às proteínas secretadas. Na fração dos glicolipídios solúveis na fase inferior de Folch não houve diferença significativa entre a incorporação nos controles e no grupo tratado com retinol (FIGURA III 7).

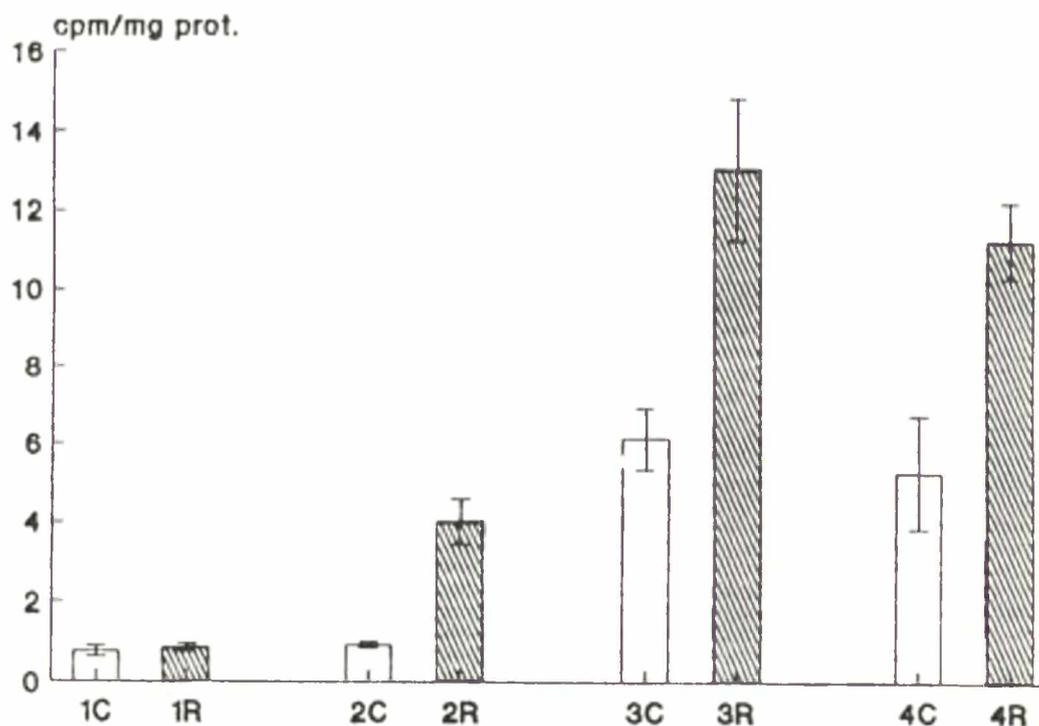


FIGURA III.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL (36h,  $7\mu\text{M}$ ) SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE EM GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

C - controle; R - tratamento com retinol

1C e 1R, compostos solúveis na fase inferior de Folch; 2C e 2R, compostos solúveis em C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0,3); 3C e 3R, proteínas celulares; 4C e 4R, proteínas secretadas.

- Os valores representam as médias  $\pm$  EPM de 3 culturas de uma mesma preparação celular. - a -  $p < 0.01$ ; b -  $p < 0.02$ .

### III 4 1 1 Análise por cromatografia em camada delgada dos compostos lipofílicos intermediários na biossíntese de N-glicoproteínas

A FIGURA III 8 mostra que cerca de 33% da radioatividade presente nas fases inferiores de Folch (tanto nos controles como nos tratados) se desloca em um pico com mobilidade relativa semelhante à do padrão de dolícil-fosfato-manose aplicado na mesma corrida cromatográfica. O restante da radioatividade, representando os lipídios neutros, também solúveis na fase inferior de Folch, corre com a frente do solvente. Não foi detectado nenhum pico com Rf semelhante ao do retinil-fosfato-manose.

A presença de retinil-fosfato-manose foi também pesquisada na fase superior da partição de Folch, pois por suas características de solubilidade este composto se divide igualmente nas duas fases (CREEK et al., 1983). Não foram encontrados picos com Rf semelhantes ao do retinil-fosfato-manose (resultados não apresentados).

Para estas análises utilizou-se o sistema de solventes C:M:H<sub>2</sub>O (45:35:6, v/v), descrito por CREEK et al. (1983), que permite uma melhor separação entre o retinil-fosfato-manose e o dolícil-fosfato-manose.

Os compostos solúveis em C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0.3), obtidos das mesmas células descritas anteriormente, foram submetidos a cromatografia em camada delgada em sílica gel no sistema de solventes propanol:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v). Aproximadamente 90% da radioatividade aparece em só pico, correspondente ao dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo, como já descrito em III 1 2 (FIGURA III.9), não existindo diferenças entre células tratadas e controles.

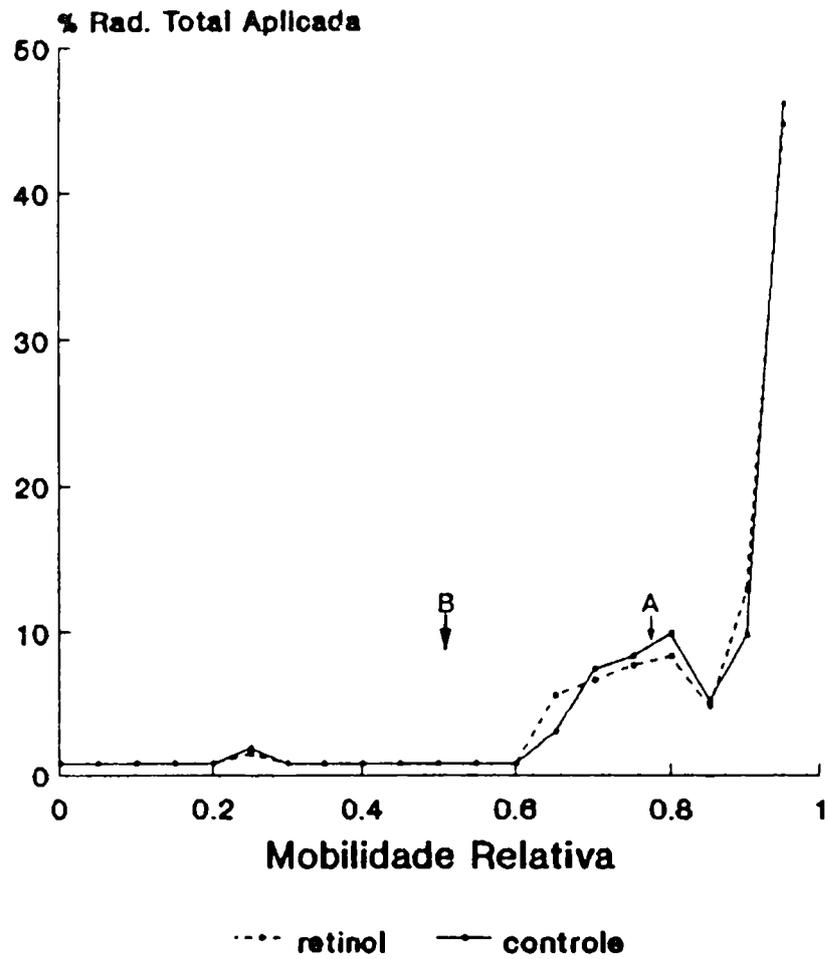


FIGURA III 8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH, OBTIDOS DE CÉLULAS DE SERTOLI TRATADAS OU NÃO COM RETINOL

A - dolícil-fosfato-manose (posição do padrão).

B - retinil-fosfato-manose (posição do padrão).

Sistema de solventes D

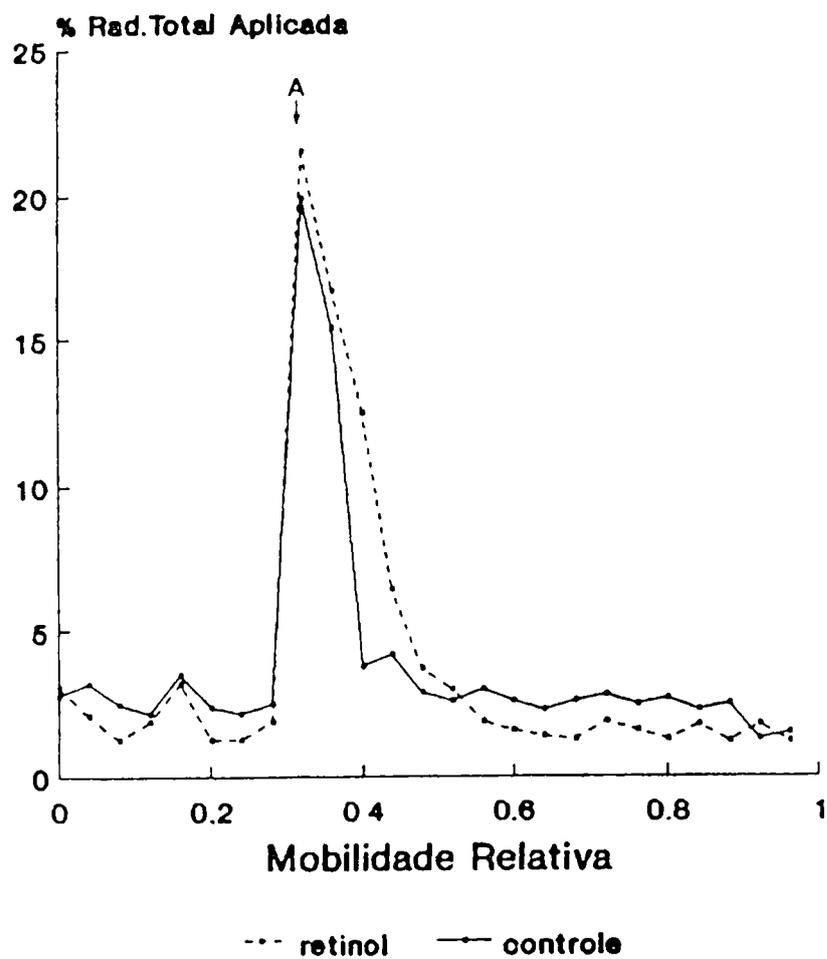


FIGURA III 9 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS EM C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0,3), OBTIDOS DE CELULAS TRATADAS OU NÃO COM RETINOL

A - dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo (posição do padrão)

Sistema de solventes E

### III.4 2. Efeito do tempo de pré-incubação com retinol sobre a incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose nos glicolipídios e nas glicoproteínas de células de Sertoli

Para investigar o efeito descrito nos experimentos anteriores, células de Sertoli foram tratadas por diferentes tempos com 10 $\mu$ M de retinol e incubadas por 3h com 10  $\mu$ Ci/ml de [2-<sup>3</sup>H] manose. Os resultados mostrados na TABELA III 2 indicam claramente que o retinol induziu um aumento significativo da incorporação de manose nos glicolipídios solúveis em C:M:HzO(1:1:0,3), ou seja, no dolícil-PP-oligossacarídeo, em todos os tempos estudados. A incorporação em glicoproteínas foi significativamente aumentada em 36h e 48h de pré-incubação. Não foram encontradas diferenças significativas na incorporação de manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch, que contém o dolícil-fosfato-manose em nenhum dos tempos testados.

### III 4 3 Efeito da dose de retinol sobre a incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose nos glicolipídios e nas N-glicoproteínas de células de Sertoli

A concentração ótima de retinol foi determinada através de uma curva de dose resposta (FIGURA III.10, A, B e C). Culturas de células de Sertoli foram pré-incubadas por 48h com doses crescentes de retinol, como descrito no capítulo II, e depois incubadas por 3h com [2-<sup>3</sup>H]manose. Após, determinou-se a radioatividade incorporada nos compostos lipofílicos solúveis na fase inferior de Folch, no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e nas glicoproteínas de células de Sertoli. Os resultados mostrados na FIGURA III 10(A), indicam que o retinol não induz a um aumento na incorporação de manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch em nenhuma das concentrações testadas. A incorporação no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo (FIGURA III 10 (B)) foi aumentada de forma significativa pelo

III 10 (B)) foi aumentada de forma significativa pelo tratamento com  $10\mu\text{M}$  de retinol. A FIGURA III 10(C) mostra que esta dose ( $10\mu\text{M}$ ) também induz um aumento significativo na incorporação de manose nas N-glicoproteínas (secretadas = 57,8% e celulares = 42,2% do total das glicoproteínas)

TABELA III 2  
EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO COM  $10\mu\text{M}$  DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE EM GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS EM CÉLULAS DE SERTOLI

Pré- Incubação (horas)	Tratamento	Radioatividade $\text{cpm} \times 10^{-3} / \text{mg}$ de proteína			
		F I Folch	1:1.0.3	Proteínas Celulares	Proteínas Secretadas
16 (3)	C	0.12 $\pm 0.02$	0.52 $\pm 0.24$	7.8 $\pm 0.31$	
	R	0.11 $\pm 0.02$	0.88 <sup>b</sup> $\pm 0.02$	8.9 $\pm 0.95$	
36 (4)	C	0.77 $\pm 0.14$	0.95 $\pm 0.06$	6.1 $\pm 0.83$	5.22 $\pm 1.47$ <sup>b</sup>
	R	0.87 $\pm 0.11$	4.04 <sup>a</sup> $\pm 0.54$	13.1 <sup>a</sup> $\pm 1.80$	11.93 <sup>b</sup> $\pm 0.94$
48 (6)	C	0.25 $\pm 0.02$	0.48 $\pm 0.05$	2.32 $\pm 0.19$	1.91 $\pm 0.19$
	R	0.27 $\pm 0.03$	0.80 <sup>a</sup> $\pm 0.05$	3.0 <sup>a</sup> $\pm 0.49$	4.19 <sup>a</sup> $\pm 0.59$
150 (5)	C	0.80 $\pm 0.10$	0.29 $\pm 0.03$	5.70 $\pm 0.40$	1.20 $\pm 0.17$
	R	0.97 $\pm 0.13$	0.58 <sup>a</sup> $\pm 0.05$	4.61 $\pm 0.55$	1.10 $\pm 0.37$

C, controle, R, tratamento com retinol; F I. Folch, fase inferior da partição de Folch

- Valores representam as médias  $\pm$  EPM. Os números entre parênteses representam o número de amostras

a -  $p < 0.01$  comparado com o controle; b -  $p < 0.02$  comparado com o controle.

- Resultados obtidos com culturas de preparações celulares diferentes

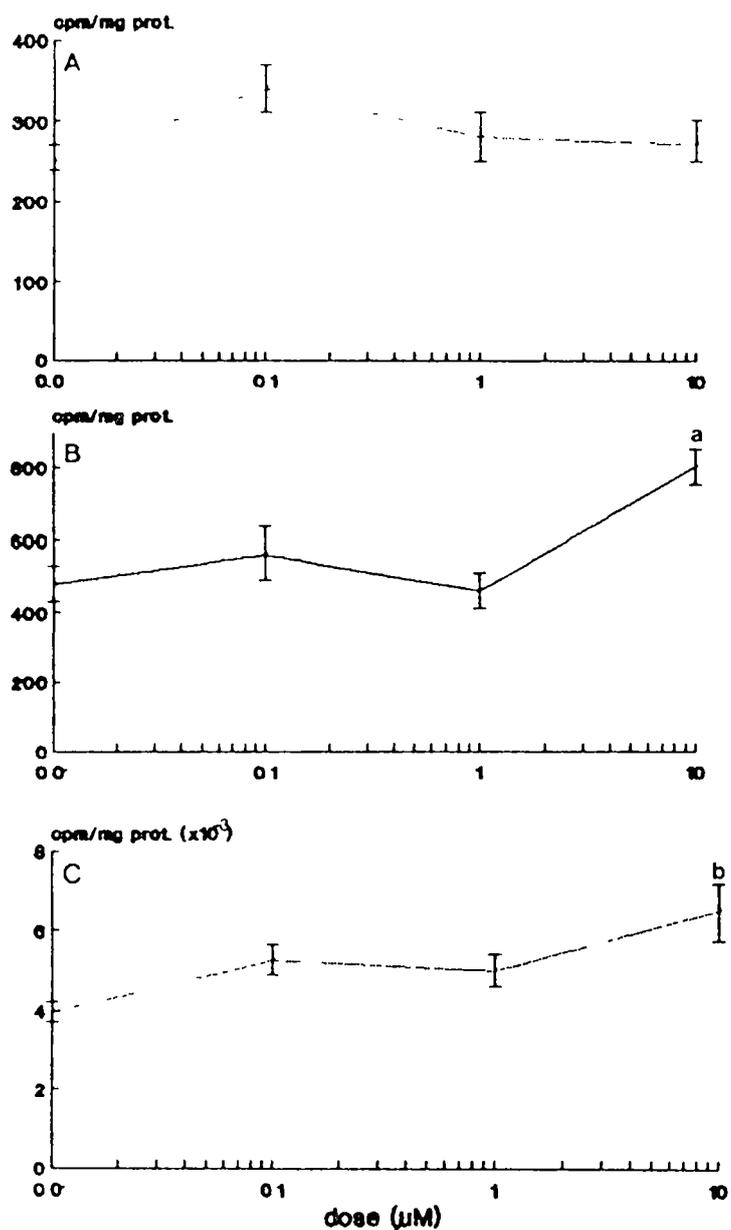


FIGURA III 10 EFEITO DA DOSE DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE MANOSE AOS GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

- A - Fração solúvel na fase inferior de Folch;
- B - Dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo;
- C - N-glicoproteínas
- Os valores representam as médias de 6 amostras  $\pm$  EPM.
- a -  $p < 0.01$  em relação ao grupo controle.
- b -  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### III 4 4 Análise da incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose em células tratadas ou não com 10 $\mu$ M de retinol por 48h - Efeito do tempo de incubação com o açúcar radioativo

A fim de determinar se, em tempos mais curtos de incubação com o precursor radioativo, era possível detectar um aumento precoce e transitório da incorporação de manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch, realizou-se uma curva de tempo de incubação com [2-<sup>3</sup>H]manose (FIGURA III.11) Os resultados mostram (FIGURA III 11,A) que não existe diferença de incorporação na fase inferior de Folch entre células tratadas e controles em todos os tempos testados

A incorporação no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo foi significativamente maior nas células tratadas com retinol, a partir dos 90 minutos de incubação. Nas glicoproteínas, isto somente aconteceu aos 150 minutos, reforçando a idéia da cinética de precursor produto, já proposta no experimento representado na FIGURA III 2 (A,B,C)

#### III 4 5 Análise dos oligossacarídios ligados ao "pellet" protéico delipidado de células de Sertoli tratadas ou não com retinol

Com a finalidade de analisar os oligossacarídios componentes das glicoproteínas presentes no "pellet" protéico delipidado de células de Sertoli tratadas ou não com retinol (10 $\mu$ M por 48h), realizou-se a digestão enzimática com pronase, como descrito no capítulo anterior Os glicopeptídios resultantes (separados por colunas de troca iônica) foram submetidos à digestão com endoglicosidase H Os produtos da Endo H foram separados novamente por colunas de troca iônica, obtendo-se 19% de hidrólise tanto nas células tratadas com retinol como nas controles Os oligossacarídios resultantes foram analisados por cromatografia em camada delgada no sistema G (item II.2 11 2). Os resultados sugerem a existência de uma maior

heterogeneidade de tamanhos nos oligossacarídios das células tratadas com retinol (FIGURA III 12).

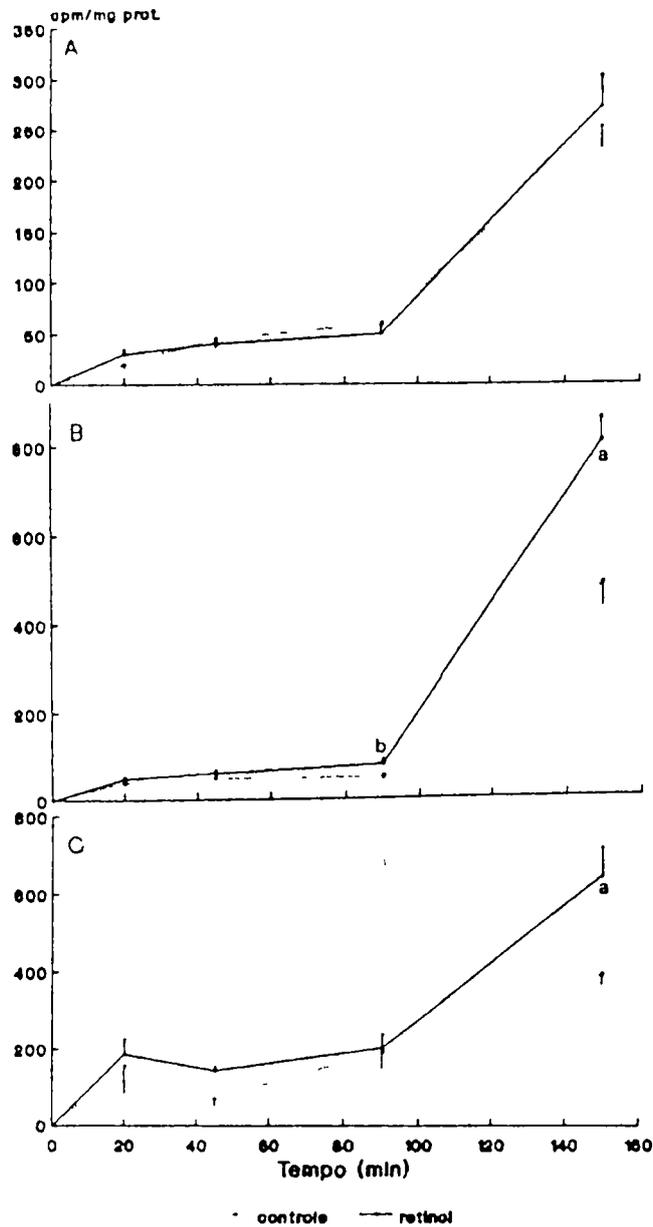


FIGURA III 11 CURVA DE TEMPO DE INCUBAÇÃO COM  $12\text{-}^3\text{H}$ IMANOSE EM CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLES OU TRATADAS COM  $10\mu\text{M}$  DE RETINOL POR 48 HORAS

A, fase inferior de Folch, B, fração C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0,3); C, "pellet" proteico delipidado. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM de 6 culturas obtidas de uma mesma preparação celular a,  $p < 0,01$ ; b,  $p < 0,05$

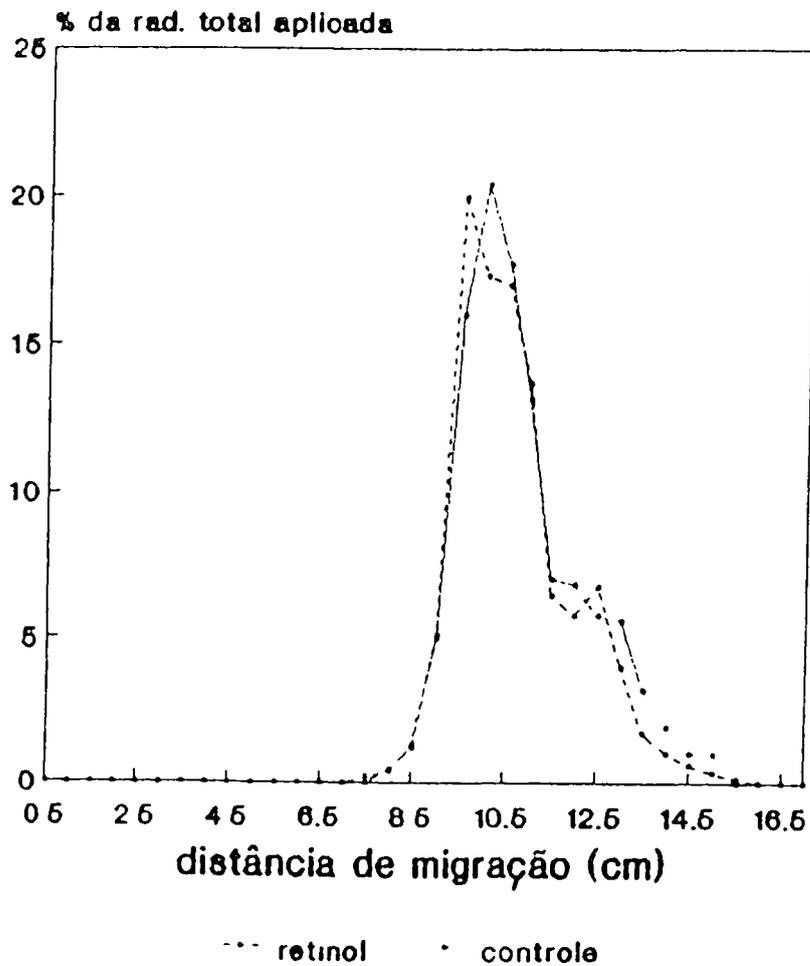


FIGURA III 12 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS PRODUTOS DA ENDOGLICOSIDASE H

Foram aplicados os oligossacarídeos obtidos do tratamento com endoglicosidase H dos *N*-glicopeptídeos resultantes da ação da pronase sobre os "pellets" protéicos delipídados de células-controle e tratadas com retinol - Sistema de solventes G.

### III 4 6 Efeito do retinol sobre a incorporação de metil-timidina ao DNA, de uridina ao RNA e de leucina a proteínas

O aumento da incorporação de manose a glicoproteínas provocado pelo tratamento de culturas de células de Sertoli com retinol aqui apresentado poderia ser decorrente de um aumento da síntese de cadeias polipeptídicas a serem glicosiladas ou de um aumento da glicosilação de cadeias polipeptídicas. Na tentativa de determinar a origem deste aumento, foi estudada a síntese de proteínas, de DNA e de RNA. Incubaram-se células de Sertoli pré-tratadas com retinol (48h com  $10\mu\text{M}$ ) por 3h com [metil- $^3\text{H}$ ]timidina ou com [5- $^3\text{H}$ ]uridina ou ainda com [U- $^{14}\text{C}$ ]leucina.

A TABELA III.3 mostra que a adição de retinol ( $10\mu\text{M}$  por 48h) ao meio de cultura de células de Sertoli induz a um aumento significativo na incorporação de [metil- $^3\text{H}$ ]timidina ao DNA, mas não altera a incorporação de [ $^3\text{H}$ ]uridina ao RNA e de [U- $^{14}\text{C}$ ]leucina a proteínas. O tratamento com retinol também não afetou o conteúdo celular de DNA, RNA e proteínas (TABELA III.4).

### III.4 6 1 Efeito da dose de retinol sobre a incorporação de [metil- $^3\text{H}$ ]timidina ao DNA em células de Sertoli

Para estudar a relação entre a dose de retinol e o aumento de incorporação de timidina ao DNA de células de Sertoli, realizou-se uma curva de dose-resposta (FIGURA III 13). Os resultados mostram que a incorporação de metil-timidina ao DNA foi significativamente maior que nas células controles somente nas células tratadas com  $10\mu\text{M}$  de retinol. No tratamento com  $0,1\mu\text{M}$  com retinol existe um aumento expressivo de incorporação, que em diferentes experimentos não foi significativo.

O efeito do retinol sobre a captação de metil-timidina pelas células de Sertoli foi determinado no mesmo experimento. A radioatividade presente no "pool"

ácido-solúvel (determinada como descrito no capítulo II), demonstrou que o retinol não alterou a captação de metil-timidina por células de Sertoli em nenhuma das doses testadas (TABELA III.5)

TABELA III.3

EFEITOS DO RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE [METIL-<sup>3</sup>H]TIMIDINA AO DNA, DE [5,6-<sup>3</sup>H]URIDINA AO RNA E DE [U-<sup>14</sup>C]LEUCINA A PROTEÍNAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Tratamento	cpm [ <sup>3</sup> H] timidina / µg DNA	cpm [ <sup>3</sup> H] uridina / µg RNA	cpm [ <sup>14</sup> C] leucina / µg proteína
Controle	(8) 49±1,9	(8) 334±28	(7) 55±1 8
Retinol	(8) 156±13*	(8) 300±16	(7) 56±6 9

- Os valores foram expressos como média ± EPM O número entre parênteses indica o número de amostras

\* p<0 001

TABELA III 4

CONTEUDOS DE DNA, RNA E PROTEÍNAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLE E TRATADAS COM RETINOL

Tratamento	Total DNA / cultura (µg)	Total RNA / cultura (µg)	Total proteínas / cultura (µg)
Controle	(8) 52±5 1	(8) 48±5.0	(11) 1153±59
Retinol	(8) 54±3 3	(8) 46±1 0	(11) 1266±89

- Os valores foram expressos como média ± EPM O número entre parênteses indica o número de amostras.

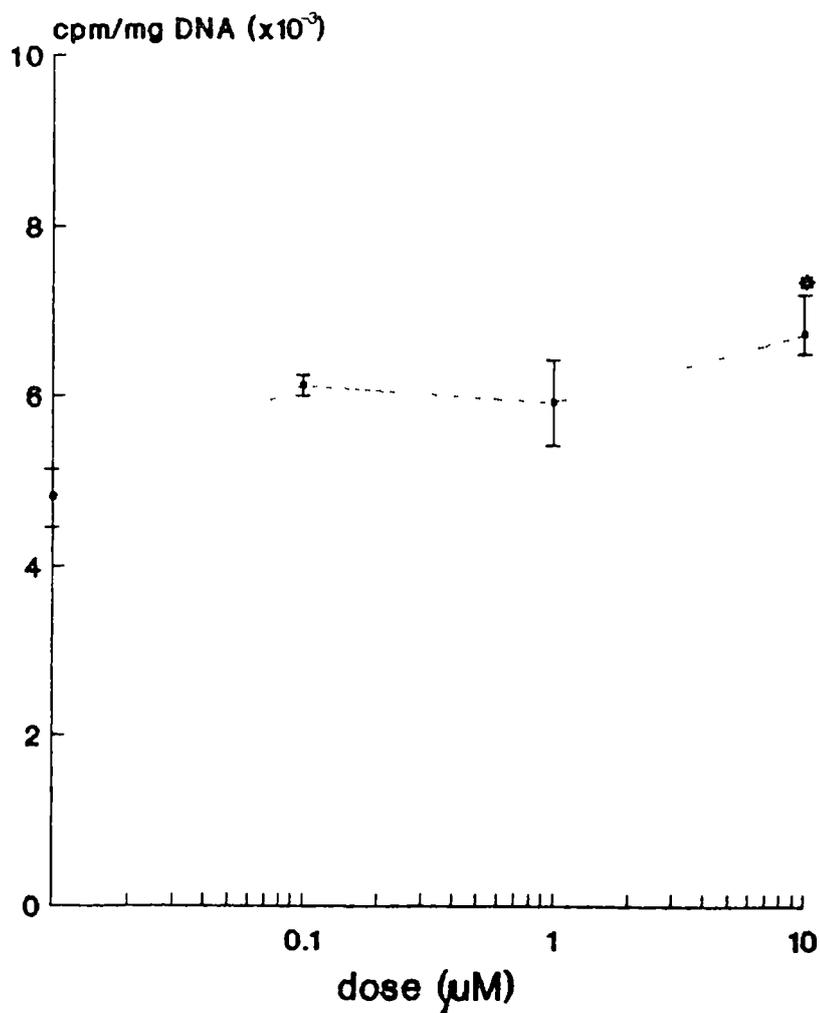


FIGURA III 13 INCORPORAÇÃO DE METIL-TIMIDINA AO DNA DE CÉLULAS DE SERTOLI TRATADAS POR 48H COM DIFERENTES DOSES DE RETINOL

\* -  $p < 0.05$  em relação ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 culturas obtidas de uma mesma preparação celular

TABELA III 5

RADIOATIVIDADE PRESENTE NO "POOL" ÁCIDO-SOLÚVEL, APÓS O TRATAMENTO DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI POR 48H COM DIFERENTES DOSES DE RETINOL:

Concentrações de Retinol ( $\mu$ M)	Radioatividade cpm/ $\mu$ g DNA
	Pool Ácido-Solúvel
Controle	(4) 54 5 $\pm$ 3.1
0 1	(6) 54 5 $\pm$ 2 0
1 0	(6) 47 2 $\pm$ 3 2
10 0	(6) 49 8 $\pm$ 3 9

- Os valores foram expressos como médias  $\pm$  EPM O número entre parênteses indica o número de amostras.

III 4 6 2 Efeito do tempo de pré-incubação com 10 $\mu$ M de retinol sobre a incorporação de metil-timidina ao DNA de células de Sertoli

Pela análise dos resultados mostrados na FIGURA III 14 verificou-se, que já com 14h de pré-incubação com 10 $\mu$ M de retinol a incorporação de metil-timidina era máxima e significativamente maior que no grupo controle.

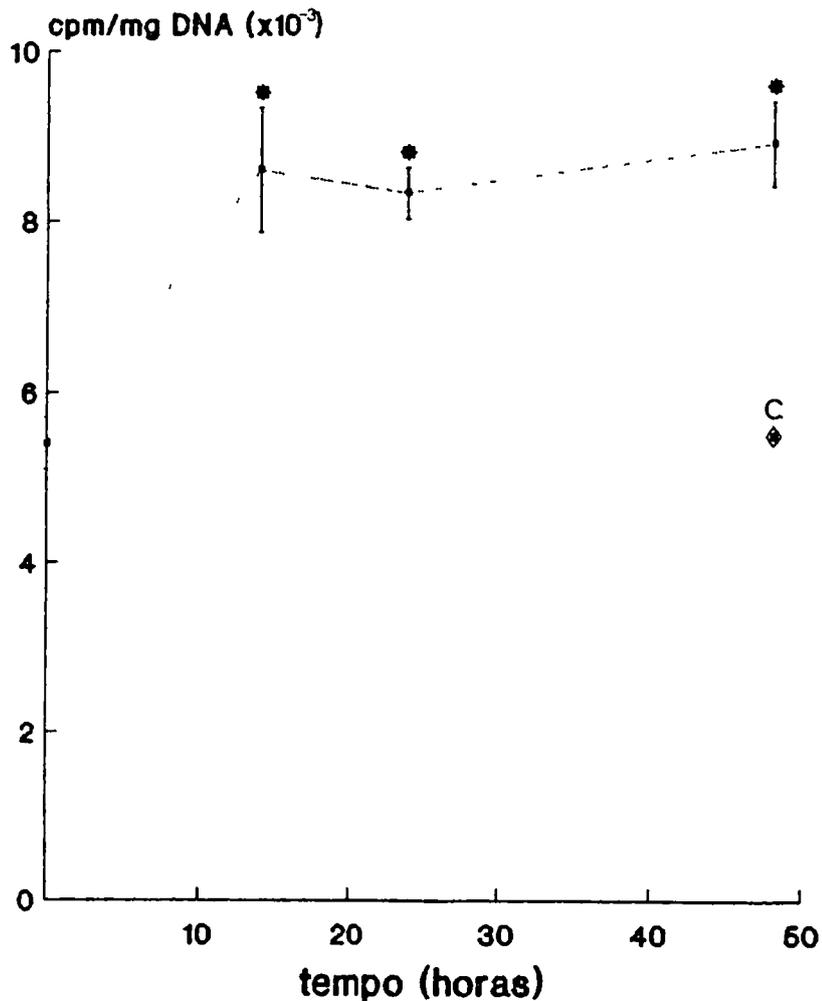


FIGURA III.14 EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO COM 10 $\mu$ M DE RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE METIL-TIMIDINA AO DNA DE CÉLULAS DE SERTOLI

\* -  $p < 0.01$

- Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

- Culturas controle mantidas até ao final do tempo máximo de pré-incubação (48h) apresentam os mesmos níveis de incorporação de metil-timidina ao DNA encontrados no tempo zero de pré-incubação (C, valor assinalado no gráfico).

### III 5 ESTUDO DA BIODÍNTÉSE DE N-GLICOPROTEÍNAS E DE SEUS MANOLIPÍDIOS INTERMEDIÁRIOS EM MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE (EC 2.4.1.83)

III 5 1 Determinação das condições para o estudo da incorporação de manose a partir de GDP-<sup>14</sup>C]manose em aceptores endógenos de frações microssomais de células de Sertoli

III 5 1 1 Estabelecimento das condições para determinação da atividade de dolícil fosfato manose sintase

O sistema de incubação utilizado inicialmente baseou-se em sistemas descritos na literatura para o estudo da transferência de manose em microssomas de fígado (Iusen, et al ,1984), de glândula mamária (White, 1978) e de testículo inteiro (Guaragna et al , 1986).

Determinou-se que, utilizando-se 200µg de proteína microssomal de células de Sertoli, o tempo ideal de incubação a 34°C para a transferência de manose a partir de GDP-manose para os compostos solúveis na fase inferior de Folch foi de 10 minutos. Esta quantidade de proteína foi escolhida por ser compatível com o pequeno rendimento obtido na preparação de microssomas a partir de culturas primárias de células não transformadas e por se encontrar dentro da faixa de linearidade da reação

No estudo de enzimas particuladas, existe a necessidade da utilização de um detergente no sistema de incubação O triton X-100 é o mais usado em reações de glicosilação de proteínas em presença de um substrato lipídico exógeno (dolícil-fosfato). Utilizando concentrações de triton X-100 de até 0.1%, verificou-se uma inibição crescente com a concentração do detergente. Escolheu-se a concentração de 0.05%, que é eficaz na solubilização do dolícil-fosfato exógeno, não apresentando efeito inibitório acentuado

### III.5 1 2 Ação dos íons $Mn^{+2}$ e $Mg^{+2}$

Sabendo-se que as reações de transferência de glicídios, dos respectivos nucleotídeos açúcares doadores para os lipídios receptores e glicoproteínas dependem dos íons divalentes  $Mg^{+2}$  e/ou  $Mn^{+2}$ , testou-se a atividade da dolícil-fosfato-manose sintase em presença de  $Mn^{+2}$ , de  $Mg^{+2}$  ou de  $Mn^{+2} + Mg^{+2}$  (FIGURA III.15).

Verificou-se maior atividade enzimática na presença dos 2 cofatores iônicos ( $Mn^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ ).

Diversos estudos têm mostrado que o íon  $Mg^{+2}$  é o cofator preferencial da dolícil-fosfato-manose sintase e o  $Mn^{+2}$  da síntese do dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e de sua transferência para a proteína. Na tentativa de obter maior rendimento nessas duas etapas da *N*-glicosilação, em experimentos não apresentados, foram feitas incubações de microssomas de células de Sertoli somente com  $Mg^{+2}$ . Após, a radioatividade não incorporada era retirada por lavagem e nova centrifugação dos microssomas era realizada a 105.000 xg por 1h. Esses microssomas eram novamente incubados em um sistema contendo  $Mn^{+2}$ . Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na incubação única com  $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ .

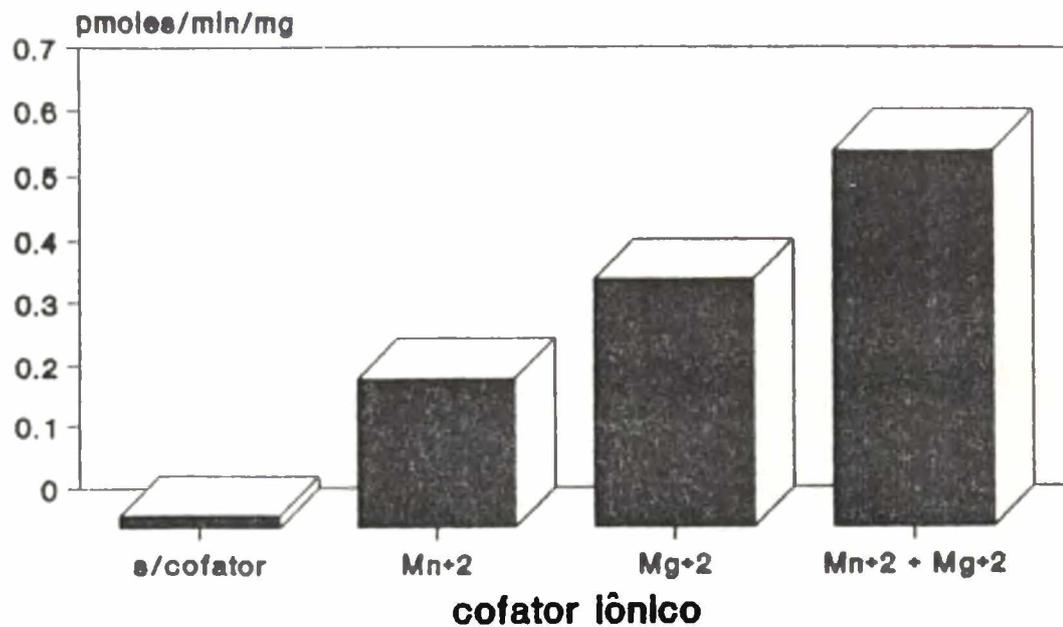


FIGURA III.15 INCUBAÇÃO DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI PARA O ESTUDO DO EFEITO DOS IONS  $Mn^{+2}$  E  $Mg^{+2}$  SOBRE A AÇÃO DA DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE

- Experimento representativo de dois outros realizados nas mesmas condições. As incubações foram feitas com  $200\mu g$  de proteína microsomal.

### III 5 2 Estudo do efeito da variação da concentração de substratos sobre a formação de manolipídios intermediários e sobre a biossíntese de N-glicoproteínas

Para o estudo do efeito da variação da concentração de substratos sobre a incorporação de manose a partir de GDP-[<sup>14</sup>C] manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch, utilizou-se um sistema de incubação com a composição estabelecida no item III.5.1. deste trabalho.

A incorporação de manose ao dolícil-PP-oligossacarídeo foi medida no extrato em C·M·H<sub>2</sub>O (1:1.0,3) do material insolúvel presente na interface da partição de Folch. A extensão da transferência do oligossacarídeo para proteínas foi medida no "pellet" protéico delipidado.

#### III 5 2 1 Curva de concentração de dolícil-fosfato

Nesta curva, a concentração de dolícil-fosfato variou entre 5 e 20ug. Verificou-se na FIGURA III.16 que, na fase inferior de Folch, a transferência de manose apresenta estimulação máxima com 5µg de dolícil-fosfato exógeno. Na mesma figura pode-se observar que a transferência de manose para as outras frações (dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e "pellet" protéico delipidado) é muito pequena.

Com o objetivo de verificar se a baixa transferência para o dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e para o "pellet" protéico era devida à pequena quantidade de enzima incubada e a falta de aceptores endógenos, realizou-se um experimento similar com 500µg de proteína. Como se pode observar na FIGURA III.17, o aumento da quantidade de proteína não modificou o resultado anterior.

#### III 5 2 2 Curva de concentração de GDP-[<sup>14</sup>C]manose

Nesta curva, a concentração de GDP-[<sup>14</sup>C]manose variou entre 85 e 510 pmoles. Na FIGURA III.18 (A, B e C) estão representadas as curvas de concentração de GDP-manose em

ausência e em presença de 5 $\mu$ g ou 20 $\mu$ g de dolícil-fosfato. Verificou-se que transferência de manose para o dolícil-fosfato aumenta com a concentração de GDP-manose (FIGURA III 18,A)

O efeito do aumento da concentração de GDP-manose sobre a incorporação de manose ao dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e ao "pellet" protéico delipídado em ausência e em presença de dolícil-fosfato esta representado nas FIGURAS III 18, B e C.

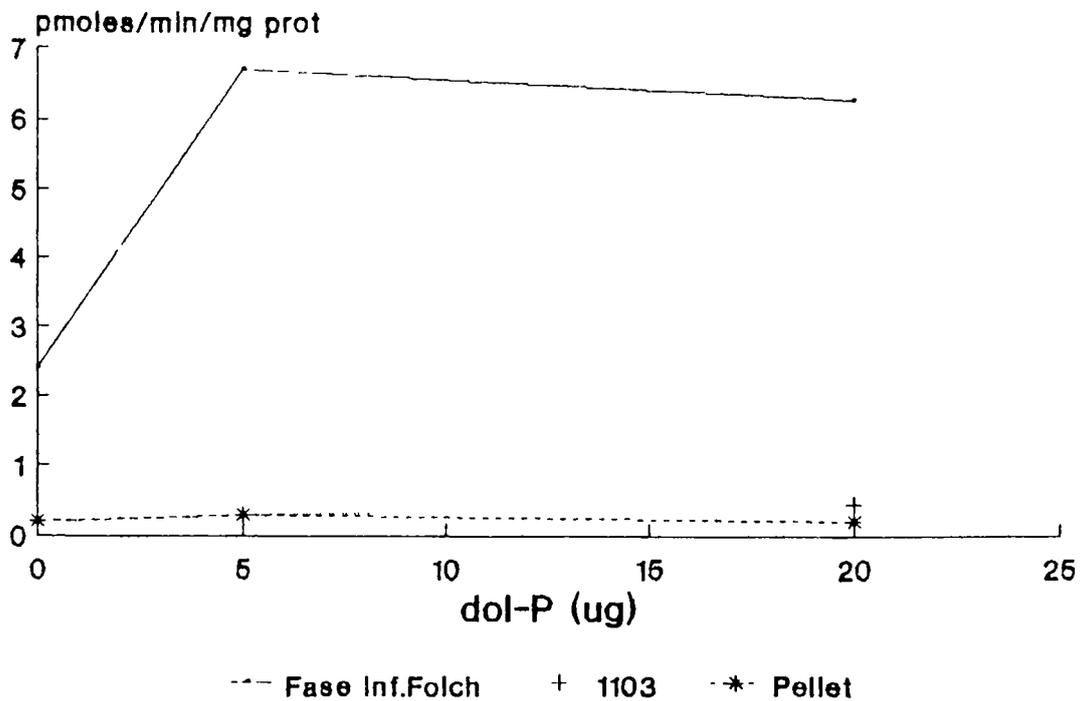


FIGURA III.16 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DOLÍCIL-FOSFATO (200 $\mu$ g DE PROTEÍNA)

- Experimento representativo de dois outros realizados nas mesmas condições.

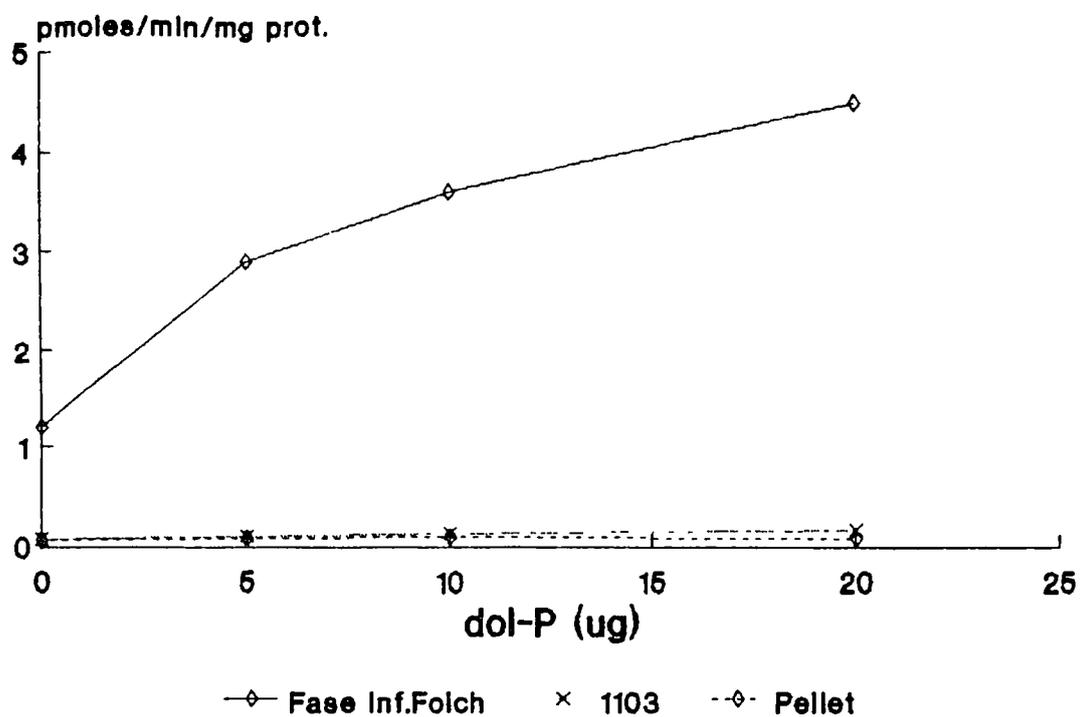


FIGURA III 17 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL- FOSFATO (500 $\mu$ g DE PROTEÍNA)

- Experimento representativo de dois outros realizados nas mesmas condições

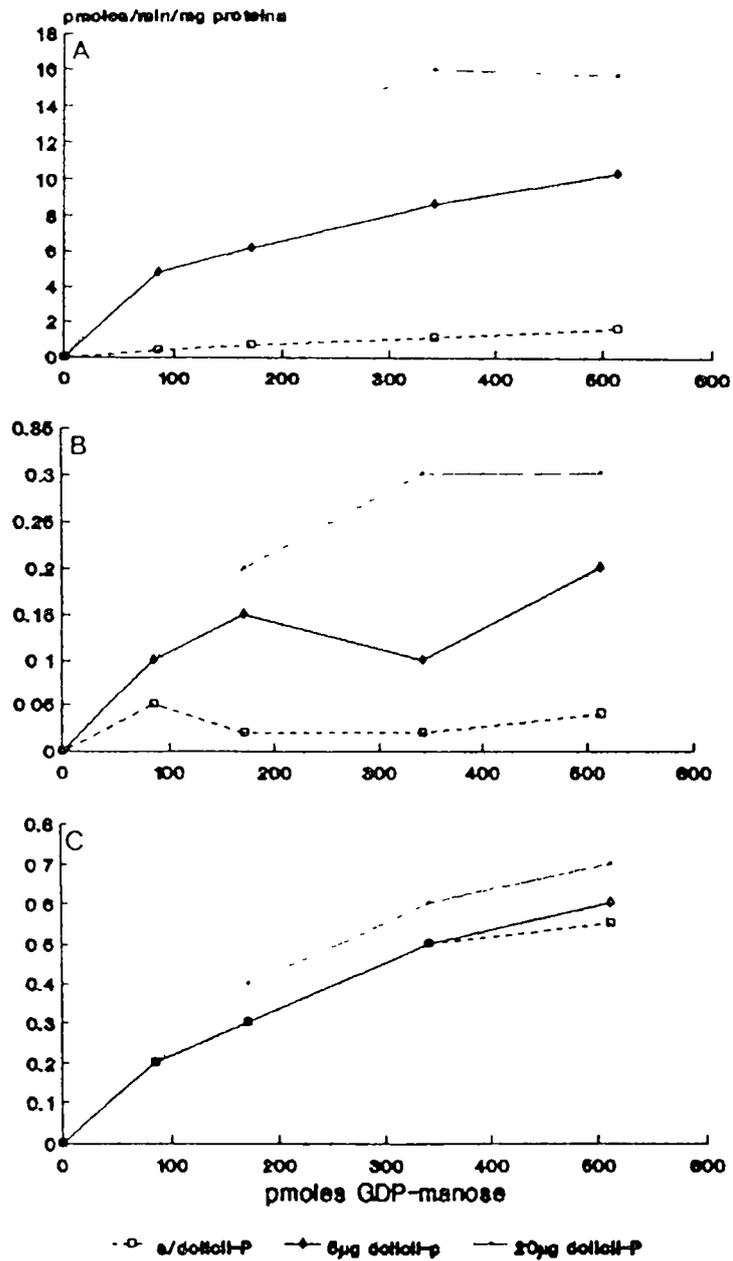


FIGURA III.18 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE GDP-[<sup>14</sup>C]MANOSE

A, compostos solúveis na fase inferior de Folch;

B, dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo;

C, "pellet" protéico delipidado

- Experimento representativo de dois outros realizados nas mesmas condições

### III 6 EFEITOS DO RETINOL SOBRE A ROTA DE N-GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE SERTOLI

#### III.6 1 Efeito do retinol sobre a atividade da dolícil-fosfato- manose sintase

Em experimentos preliminares, verificou-se que o retinol ativava a transferência de manose de GDP-manose para os compostos solúveis na fase inferior de Folch e que esta atividade era favorecida pela presença de dolícil fosfato exógeno (TABELA III.6)

Os microssomas de células tratadas com retinol foram obtidos sempre de culturas que receberam 10 $\mu$ M de retinol por 48h

TABELA III.6

EFEITO DO RETINOL SOBRE A TRANSFERÊNCIA DE MANOSE DE GDP-MANOSE PARA OS COMPOSTOS SOLÚVEIS NA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH EM INCUBAÇÕES DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI:

Tratamento (cpmoles/min/mg)	Dolícil-Fosfato ( $\mu$ g)	
	zero	5
Controle	1.0	8.4
Retinol	1 5	12 1

#### III 6 1 1 Análise por cromatografia em camada delgada (sílica gel) dos compostos solúveis na fase inferior de Folch derivados da incubação de microssomas de células de Sertoli

Pela análise por cromatografia em camada delgada dos compostos solúveis na fase inferior de Folch, verificou-se, tanto nas incubações de microssomas obtidos de células-controle como daquelas tratadas com retinol, a

presença de somente um pico de radioatividade com mobilidade semelhante a do dolícil-fosfato-manose padrão aplicado na mesma corrida cromatográfica (FIGURA III 19).

### III 6 1 2 Efeito da concentração de dolícil-fosfato exógeno sobre a transferência de manose a partir de GDP-[<sup>14</sup>C]manose para o dolícil-fosfato - Efeito sobre a atividade da dolícil-fosfato-manose sintase

Nesta curva, a concentração de dolícil fosfato exógeno variou de 0 a 45µg por tubo de incubação e a de GDP-[<sup>14</sup>C]manose foi de 170pmoles. Verificou-se que a adição dolícil-fosfato exógeno aumenta a atividade da enzima nas células-controle e nas tratadas com retinol (Figura III.20), e que, nas células tratadas com retinol, a formação de dolícil-fosfato-manose é claramente maior que nas células controle, mesmo nas condições em que o dolícil-fosfato exógeno está em grande excesso.

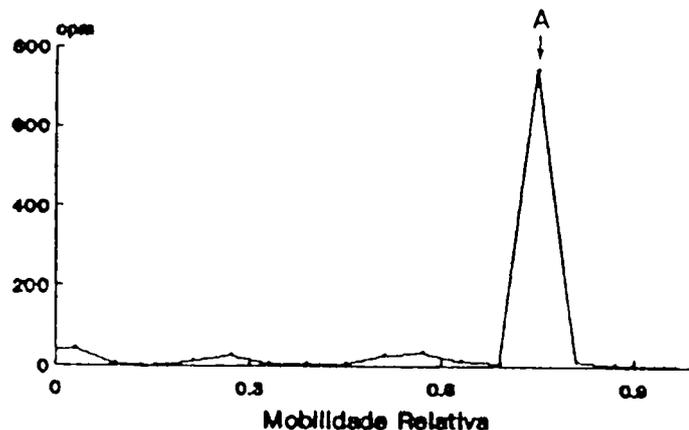


FIGURA III 19 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA FASE INFERIOR DA PARTIÇÃO DE FOLCH DA INCUBAÇÃO DE MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

A - dolícil-fosfato-manose (posição do padrão).

-Sistema de solventes D

-Na figura, está representada somente a TLC da fase inferior de Folch das células tratadas com retinol. O resultado encontrado com as células-controle foi semelhante

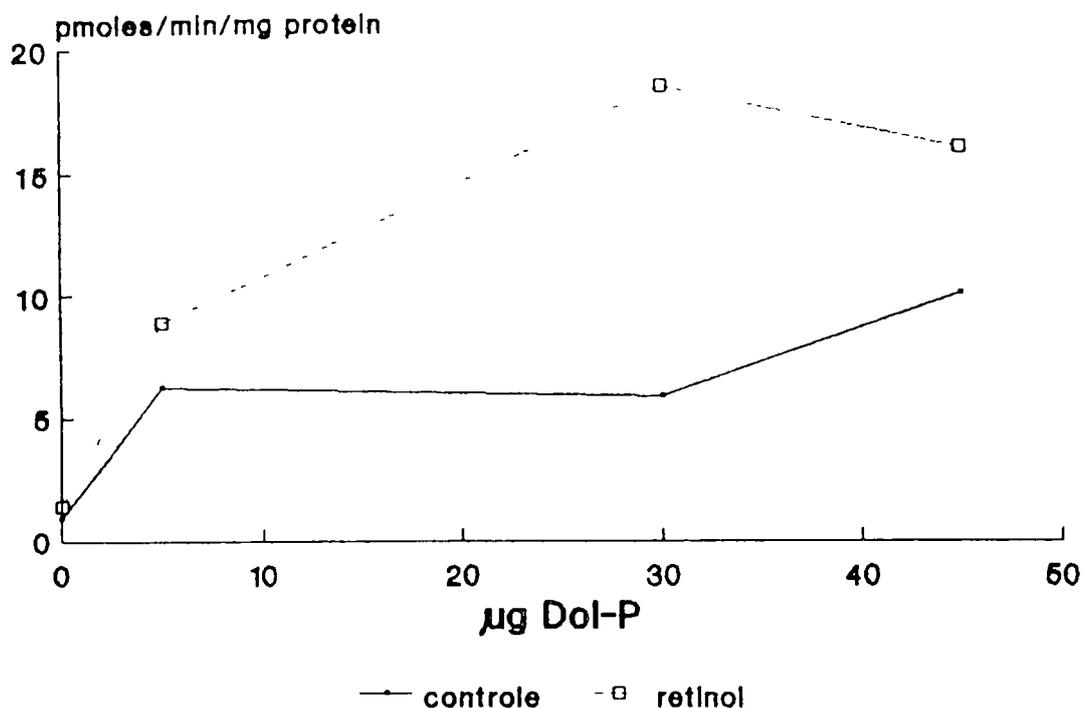


FIGURA III 20 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO EXÓGENO SOBRE A ATIVIDADE DE DOLICIL-FOSFATO-MANOSE SINTASE EM MICROSSOMAS DE CÉLULAS DE SERTOLI CONTROLES E TRATADAS COM RETINOL

- Resultados semelhantes foram encontrados em outros dois experimentos independentes.

### III 6 2 Efeito do retinol sobre a síntese do dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e de glicoproteínas

As FIGURAS III 21 (A e B) mostram que o retinol também produziu um marcado aumento na incorporação de manose ao dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e a glicoproteínas por enzimas de microssomas isolados de células tratadas

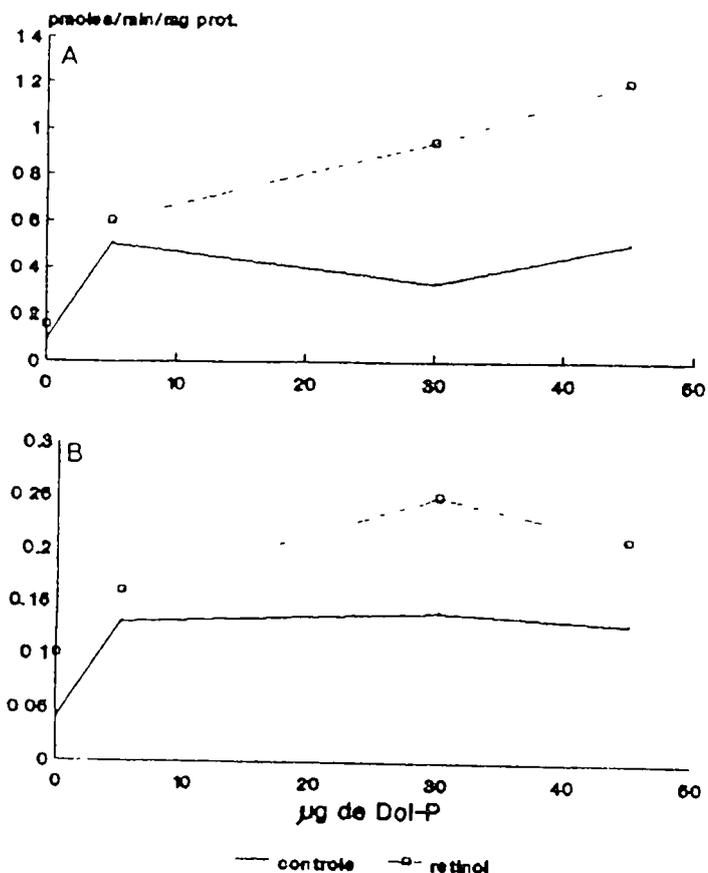


FIGURA III 21 AÇÃO DO RETINOL SOBRE SÍNTESE DE DOLICIL-PIROFOSFORIL-OLIGOSSACARÍDIO E DE *N*-GLICOPROTEÍNAS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DOLICIL-FOSFATO EXÓGENO

A, dolycil-pyrophosphoryl-oligosaccharídeo; B, "pellet" proteico delipidado

- Resultados semelhantes foram encontrados em outros dois experimentos independentes

Experimentos similares aos mostrados nas FIGURA III 20, e III 21 (A e B), foram realizados com 650 pmoles de GDP-[<sup>14</sup>C]manose. Os resultados encontrados foram semelhantes.

#### IV DISCUSSÃO

Os experimentos realizados por THOMPSON et al (1964) e por MITRAMOND et al.(1979) corroboram a hipótese de que o retinol é essencial para a manutenção da espermatogênese em mamíferos. Em ratos, a deficiência prolongada de retinol resulta na interrupção da espermatogênese e atrofia dos túbulos seminíferos (HUANG et al , 1983 e 1989). O restabelecimento da espermatogênese nestes animais se dá por ingestão de retinol ou por sua administração direta nos testículos. O ácido retinóico, que é capaz de manter a morfologia normal de muitos tecidos epiteliais na ausência de retinol, não é capaz de sustentar nem de restabelecer a espermatogênese quando administrado por via oral ou injetado diretamente nos testículos (THOMPSON et al.,1964; LOTAN, 1980).

Existem muitas evidências sugerindo que a célula de Sertoli seja a principal célula alvo da ação do retinol nos testículos. Elas captam o retinol "in vivo" e "in vitro" e possuem a mais alta concentração de CRBP (proteína celular ligadora de retinol) entre as células testiculares. SHINGLETON et al (1989a) demonstraram que as células de Sertoli captam o retinol livre ou ligado ao complexo transportador (RBP-TTR-retinol) e rapidamente o convertem a retinil ésteres. A concentração de retinil-ésteres nas células de Sertoli é comparável à encontrada nos hepatócitos, considerados reservatórios de vitamina A para o organismo (BISHOP e GRISWOLD, 1987, GRISWOLD et al , 1989).

A formação da barreira hemato-testicular na porção baso-lateral das células de Sertoli divide o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal. Com isso, as células do compartimento adluminal se tornam totalmente dependentes das células de Sertoli para o seu

desenvolvimento. Essas últimas, por exemplo, oxidam glicose até piruvato e lactato, sendo esses dois compostos os principais substratos energéticos das células de série germinativa presentes no compartimento adluminal (espermátocitos secundários e espermatídes).

ESKILD et al. (1991) descreveram a existência de receptores nucleares para o ácido retinóico nas células de Sertoli e em espermatídes redondas, sugerindo que o ácido retinóico deve atuar como regulador gênico nestas células. A demonstração da capacidade das células de Sertoli oxidarem o retinol a ácido retinóico, feita por NAPOLI e RACE (1987), estabelece a possibilidade do retinol na forma de ácido retinóico atuar via receptores nucleares já conhecidos.

BISHOP e GRISWOLD (1987) sugerem o envolvimento dos retinil-ésteres na transferência do retinol das células de Sertoli para as células germinativas. A impossibilidade do ácido retinóico servir de substrato para a esterificação pode ser apontada como uma das prováveis razões de sua ineficiência na manutenção da espermatogênese (BISHOP e GRISWOLD, 1987; GRISWOLD et al., 1989).

A espermatogênese envolve uma sequência de alterações morfológicas que incluem a migração, adesão e diferenciação de células. Todos estes processos estão associados com a presença de glicoconjugados de superfície celular. Muitos estudos têm mostrado que ocorrem reconhecimentos específicos e adesão entre células de Sertoli e germinativas. Glicoproteínas estão presentes nestes sítios de contato. A migração de células espermatogênicas ao longo das células de Sertoli, concomitante com o processo de diferenciação, envolve o aparecimento e o desaparecimento de regiões de adesão (PAGE et al., 1990).

A diferenciação morfológica das células de Sertoli se torna mais acentuada quando cessa a atividade mitótica (aproximadamente aos 14 dias de idade em ratos) e quando ocorre a formação da barreira hemato-testicular (entre os 16

e 19 dias da idade em ratos). As regiões de contato entre as células (tight junctions) são formadas por moléculas de adesão, muitas das quais são glicoproteínas, sendo também glicoproteínas a maioria das proteínas secretadas pelas células de Sertoli. Entre essas glicoproteínas estão: o ativador de plasminogênio, a transferrina, a ceruloplasmina, as glicoproteínas sulfatadas 1 e 2 e o ABP, todas importantes para o desenvolvimento das células germinativas.

O estudo da regulação da função das células de Sertoli está, muitas vezes, relacionado com a síntese e a secreção de glicoproteínas. Os efeitos do FSH, da insulina, da testosterona e do retinol, nos processos de síntese, de glicosilação e de secreção de proteínas por células de Sertoli, foram descritos por muitos autores (FRITZ et al., 1976; WILSON e GRISWOLD, 1979; KARL e GRISWOLD, 1980; SKINNER e GRISWOLD, 1981; GALDIERI e ZANI, 1981, BERNARD e WASSERMANN, 1982, SKINNER e GRISWOLD, 1982; LACROIX e FRITZ, 1982; FUGASSA et al., 1987).

O envolvimento do retinol nas reações de glicosilação de proteínas está bem estabelecido, desde que DE LUCA (1977) mostrou que compostos, como o retinil-fosfato-manose e retinil-fosfato-galactose, podiam transferir seus açúcares para proteínas. Vários autores sugeriam que o retinol pode atuar modificando a atividade de algumas enzimas que transferem unidades glicosídicas para glicolipídios e glicoproteínas (CREEK e MOORE, 1980; HASSEL et al., 1978; ROSSO et al., 1977; ROSSO e col., 1981; HUGLY e GRISWOLD, 1987).

As glicoproteínas podem apresentar oligossacarídeos ligados à cadeia polipeptídica por dois tipos principais de ligação glicídio-proteína: a ligação O-glicosídica, via serina ou treonina, que é lábil em condições alcalinas suaves; e a ligação N-glicosídica, via asparagina, que é resistente nestas condições. Os resultados apresentados nesta tese mostram que as glicoproteínas presentes no

"pellet" proteico delipidado de testículos SCE pertencem às duas classes. Em condições alcalinas suaves, obteve-se 46% de hidrólise, e o rendimento da hidrólise alcalina forte foi de 96%, demonstrando que 50% das glicoproteínas são *N*-glicosiladas. Sabendo-se que, em mamíferos, a manose faz parte somente de *N*-glicoproteínas e que a galactosamina indica a existência de *N*-acetil-galactosamina, açúcar constituinte apenas das *O*-glicoproteínas, a existência das duas classes de glicoproteínas foi confirmada pela análise dos produtos da hidrólise ácida total, que revelou a presença de galactose, manose, fucose, glicosamina e galactosamina

A utilização, nos experimentos referidos acima, de glicose como marcador radioativo justifica-se pelo fato de a glicose poder ser convertida em qualquer unidade de açúcar constituinte dos oligossacarídeos das *N*- e *O*-glicoproteínas.

A determinação da presença de ácido *N*-acetil-neuramínico confirma a existência de glicoproteínas do tipo complexo. O tratamento com endoglicosidase H dos *N*-glicopeptídeos (marcados com [2-<sup>3</sup>H]manose) originados da digestão com pronase do "pellet" proteico delipidado obtido de células de Sertoli mostrou que cerca de 80% dos glicopeptídeos não são atacados pela enzima, sendo, portanto, do tipo complexo ou híbrido. Esses resultados são coerentes com os de PAGE et al.(1990), que demonstram que cerca de 60% das glicoproteínas de células de Sertoli de ratos de 20 dias, cultivadas em substrato plástico, têm oligossacarídeos do tipo complexo.

A adição de açúcares a glicoproteínas ocorre pela transferência direta, a partir de nucleotídeos açúcares (*O*- e *N*-) ou indiretamente, pela formação de lipídios-oligossacarídeos intermediários (*N*-) (STANELONI e LELOIR, 1979) O oligossacarídeo pré-formado é imediatamente transferido para as proteínas nascentes no retículo endoplasmático. Este processo é encontrado tanto em células

de mamíferos como de algas, leveduras, insetos e vegetais (HUGHES e BUTTERS, 1981).

Os resultados obtidos, nas incubações de culturas de células de Sertoli com [2-<sup>3</sup>H]manose, mostram que grande parte da radioatividade incorporada está na fração protéica. A radioatividade incorporada no dolícol-fosfato-monossacarídeo e no dolícol-pirofosforil-oligossacarídeo é muito baixa quando comparada à incorporada em proteínas. Nas incubações de microssomas obtidos de células de Sertoli com GDP-[<sup>14</sup>C]manose, verificou-se que a maior parte da radioatividade incorporada estava no dolícol-fosfato-manose, sendo a radioatividade encontrada em proteínas muito baixa. Esses níveis de incorporação são semelhantes aos encontrados por SPEAKE e WHITE (1978) em incubações de explantes de glândula mamária e por WHITE (1978) em incubações de microssomas de glândula mamária com açúcares radioativos.

As diferenças qualitativas e quantitativas encontradas na incorporação de manose em aceptores endógenos, entre células inteiras e preparações de enzimas particuladas, podem ser justificadas, segundo SPEAKE e WHITE (1978), pela grande diferença na quantidade de cadeias polipeptídicas disponíveis para a glicosilação existente entre células intactas e preparações microssomais. As células intactas podem sintetizar proteínas ativamente, continuando a produzir cadeias polipeptídicas. Em contraste, preparações microssomais contêm um número limitado de cadeias polipeptídicas aceptoras.

Nos estudos do efeito do tempo de incubação de culturas de células de Sertoli com o açúcar radioativo, a distribuição da radioatividade incorporada nos glicolípídios solúveis na fase inferior de Folch e em C.M:H<sub>2</sub>O (1:1 0 3), bem como em proteínas em células de Sertoli, sugere a formação inicial de um oligossacarídeo ligado ao acceptor lipídico (dolícol) e sua posterior transferência para a proteína, indicando a existência de uma

cinética de precursor-produto.

Na incubação de células intactas com açúcares radioativos ocorre uma grande redistribuição da marca radioativa. A incubação com manose tritiada no carbono 2 ([2-<sup>3</sup>H]manose) é usada para diminuir possibilidade de formação de outros açúcares radioativos e de intermediários da rota glicolítica. Cerca de 50% do <sup>3</sup>H da [2-<sup>3</sup>H]manose-6-fosfato é removido na formação de frutose-6-fosfato pela manose-fosfato isomerase (D-manose-6-fosfato ceto-isomerase, EC 5.3.1.8) (SPEAKE e WHITE, 1978). Apesar disto, QUISSELL et al. (1983), analisando a relação molar entre os açúcares radioativos incorporados em glicoproteínas a partir de incubações com [2-<sup>3</sup>H]manose, demonstraram a presença de galactose/ glucose/ manose/ fucose na proporção de 1,0:0,05:7,2:1,6.

Utilizando-se incubações com [2-<sup>3</sup>H]manose era esperado que a presença de radioatividade em lipídios estivesse restrita aos glicolipídios contendo manose. Entretanto, pela análise por cromatografia em camada delgada dos lipídios solúveis na fase inferior de Folch, verificou-se que só 30% da radioatividade aplicada corre no pico com mobilidade semelhante a do dolcicil-fosfato-manose padrão. A maior parte da radioatividade corre com a frente do solvente, sendo constituída de lipídios não carregados, como já foi descrito por SPEAKE e WHITE (1978) em explantes de glândulas mamária, por DEL PINO et al (1989) em ovário do carrapato *Boophilus microplus* e em testículos de rato (ELENA A BERNARD, comunicação oral). Nos experimentos citados por ELENA A. BERNARD a percentagem foi confirmada por cromatografias em colunas de DEAE e hidrólise ácida em pH 2,0 (dados não publicados).

Uma explicação para o descrito acima foi sugerida por SPEAKE e WHITE (1978), que propõem que, durante a conversão de [2-<sup>3</sup>H]manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, seria produzido um "pool" intra-celular de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O altamente

radioativa. Esta radioatividade seria incorporada nos ácidos graxos durante as etapas redutoras de sua síntese

Por outro lado, a análise dos compostos menos polares solúveis em C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0.3) mostrou que a radioatividade migrava em um só pico com a mobilidade relativa do dolícolil pirofosforil oligossacarídeo

Comparando os níveis de incorporação [2-<sup>3</sup>H]manose, em glicolipídios e glicoproteínas de células de Sertoli pré-incubadas com 7 μM de retinol por 36h com os encontrados em células-controle, verificou-se que o retinol estimula a incorporação nos glicolipídios solúveis em C:M:H<sub>2</sub>O (1:1:0.3) e em glicoproteínas, não havendo aumento de incorporação nos glicolipídios solúveis na fase inferior de Folch. Estes resultados são semelhantes aos de GALDIERI e MONACO (1983), que ao estudarem a incorporação de [2-<sup>3</sup>H]manose, de [<sup>3</sup>H]glicosamina e de [<sup>3</sup>H]fucose em proteínas celulares e secretadas de células de Sertoli de ratos Wistar de 21 dias, tratadas ou não com retinol, mostraram a ação estimulante da vitamina sobre a incorporação de manose em glicoproteínas e em compostos solúveis em metanol

O sistema de solventes C:M:H<sub>2</sub>O (45:35:6), descrito por CREEK et al (1983) se caracteriza por produzir uma boa separação entre retinil-fosfato-manose e dolícolil-fosfato-manose, permitindo assim a melhor determinação da existência dos dois compostos. Utilizando este sistema, a análise dos glicolipídios solúveis na fase inferior de Folch, obtidos de células-controle e tratadas com retinol, mostrou que não existem diferenças, não sendo detectada a presença de retinil-fosfato-manose. Como, segundo CREEK et al (1983), o retinil-fosfato-manose se distribui igualmente nas duas fases da partição, as fases superiores também foram analisadas no mesmo sistema de solventes. Não foi, entretanto, encontrado nenhum pico de radioatividade com R<sub>f</sub> correspondente ao do retinil-fosfato-manose (experimentos

não apresentados)

Na análise cromatográfica da fração solúvel em C.M H<sub>2</sub>O (1 1 0 3) de células-controle e tratadas com retinol, foi detectado o mesmo pico de radioatividade correspondente ao dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo. Isto demonstra que, pelo menos ao nível de sensibilidade das técnicas usadas, não existem diferenças qualitativas entre os glicolípídios formados por células tratadas com retinol e controles.

Os resultados da curva de dose resposta de retinol mostram que a incorporação de manose, em glicoproteínas e no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo foi crescente com a dose de retinol, sendo significativamente maior nas células tratadas com 10 $\mu$ M de retinol que nas controle. GALDIERI e NISTICO (1986) demonstraram que, com doses de retinol entre 3 $\mu$ M e 7 $\mu$ M havia aumento da incorporação de manose no material precipitado com TCA de células de Sertoli tratadas com a vitamina por cerca de 45h.

Na análise do tempo de pré-incubação com 10 $\mu$ M de retinol, verificou-se um aumento de incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo em todos os tempos estudados e em proteínas com 36 e 48h de pré-incubação. O fato do retinol não ter estimulado a incorporação de manose em glicoproteínas, após 150h de pré-incubação, pode ser justificado pelos resultados de ROMMERTS et al (1978) e de SKINNER e GRISWOLD (1982). Tais autores demonstram que a síntese e a secreção de ABP e transferrina por células de Sertoli, cultivadas em presença ou ausência de hormônios, declina rapidamente com o tempo de cultura.

Quando se analisou o efeito do tempo de incubação com [2-<sup>3</sup>H]manose, foi verificado que o retinol estimulava significativamente a incorporação do açúcar radioativo no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo aos 90 e 150min de incubação. No tocante a proteínas, o aumento foi significativo somente aos 150min. Esses resultados são mais uma indicação da existência de uma cinética de

precursor-produto na incorporação de manose em proteínas de células de Sertoli. Confirmam também os efeitos estimulatórios do retinol sobre a biossíntese de N-glicoproteínas.

Nos estudos de dose-efeito, tempo de pré-incubação e tempo de incubação com o precursor radioativo ([2-<sup>3</sup>H]manose), utilizando células intactas tratadas ou não com retinol, não foram constatadas diferenças na incorporação de manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch. Quando se analisou a incorporação de manose nessa mesma fração em incubações de microsomas de células de Sertoli com GDP-manose, verificou-se que o retinol, em ausência de dolícil-fosfato exógeno provocava um aumento de cerca de 50% na incorporação de radioatividade no dolícil-fosfato-manose. Como já discutido anteriormente, a incorporação de manose nos compostos solúveis na fase inferior de Folch em incubações de células intactas é muito baixa, além disso o dolícil-fosfato-manose representa só 30% da radioatividade presente nessa fração. Nessas condições a ação estimulante do retinol na formação de dolícil-fosfato-manose, em incubações de células intactas, pode ter sido mascarada pela alta proporção de lipídios não carregados radioativos.

As células podem aumentar sua capacidade de glicosilação de proteínas por vários mecanismos.

- a) por aumento do número de cadeias polipeptídicas a serem glicosiladas;
- b) por aumento na concentração de dolícil-fosfato; ou
- c) por estimulação da atividade de enzimas envolvidas no processo de glicosilação.

Com a finalidade de verificar se o retinol atuava ao nível da síntese proteica em células de Sertoli, incubaram-se células-controle e tratadas por 48h com 10 $\mu$ M de retinol com [U-<sup>14</sup>C]leucina ou com [5,8-<sup>3</sup>H]uridina. Como a vitamina A é sabidamente essencial para o crescimento e

diferenciação de células epiteliais, sendo também conhecidos os efeitos do ácido retinóico na inibição do crescimento de alguns tipos de células transformadas (PETKOVICH et al.(1987), na mesma série de experimentos, analisaram-se os efeitos do retinol sobre a incorporação de [metil-<sup>3</sup>H]timidina ao DNA

O tratamento de células de Sertoli com retinol provocou um aumento significativo na incorporação de metil-timidina ao DNA, não alterando a incorporação de uridina ao RNA e de leucina a proteínas. Também não foram afetados os conteúdos celulares de DNA, RNA e proteínas.

O aumento significativo da incorporação de metil-timidina ao DNA não pode ser atribuído a uma estimulação da proliferação celular, já que não foram detectados aumentos nos conteúdos de DNA, RNA e proteínas nas culturas GALDIERI e MONACO (1983), estudando a ação do retinol sobre a incorporação de leucina no precipitado de 105 000xg do homogeneizado de células de Sertoli, tampouco acharam estímulo na incorporação deste aminoácido provocado pela vitamina

Sabe-se que células de Sertoli somente proliferam rapidamente no período neonatal (em ratos de 12-14 dias de idade a atividade mitótica é menor que 1%), embora altos níveis de incorporação de timidina sejam detectados por mais 3 a 4 semanas (NAGY, 1972) O significado fisiológico para esta alta taxa de incorporação de timidina ao DNA em células de Sertoli, em períodos de atividade mitótica baixa, é desconhecido GRISWOLD et al.(1975) descreveram que o tratamento de células de Sertoli obtidas de ratos de 10, 20 e 30 dias de idade com FSH ou dibutiril AMPc aumentava a incorporação de timidina ao DNA total e nuclear Já o maior aumento de incorporação foi observado em células de ratos mais velhos Esses autores desconhecem a natureza do DNA sintetizado, sugerindo que este fato possa estar associado à síntese de DNA durante a fase S na preparação da mitose ou a

outros tipos de incorporação de timidina ao DNA relacionados, por exemplo, com mecanismos de reparação de DNA ou com replicação parcial do DNA, como da heterocromatina nuclear ou amplificação gênica.

Posteriormente, GRISWOLD et al (1976) encontraram que 20% das células de Sertoli em cultura sintetizavam DNA. Resultados semelhantes foram achados por KIERZENBAUM et al (1980), mostrando que, em culturas de células de Sertoli de ratos de 20-22 dias, 17-20% das células sintetizavam DNA e sofriam mitoses, apesar de seu potencial negligenciável de síntese de DNA e mitose "in vivo". Os autores descartaram a possibilidade da síntese de DNA estar acontecendo em células peritubulares contaminantes ao determinarem, por técnicas imunológicas e auto-radiográficas, a presença de ABP no citoplasma das mesmas células que incorporavam timidina.

O efeito do retinol sobre a incorporação de timidina ao DNA de células de Sertoli, relatado neste trabalho, pode estar relacionado com as proposições de GRISWOLD et al (1975) e repetem o efeito descrito para o FSH.

No estudo do efeito da dose de retinol sobre a incorporação de [metil-<sup>3</sup>H]timidina ao DNA de células de Sertoli, verificou-se que, em pré-incubações por 48h com 10µM, a estimulação era significativa. Ao se analisar o efeito do tempo de pré-incubação com esta dose de retinol, demonstrou-se que, após 14h de tratamento, a incorporação já era significativamente maior que nas células-controle. Na mesma série de experimentos, foi demonstrado que o retinol não alterou o "pool" ácido-solúvel de metil-timidina, indicando que a vitamina não provocou aumento na captação de timidina.

HUGLY e GRISWOLD (1987), observaram que os níveis dos mRNA de proteínas características da célula de Sertoli, como a transferrina e a glicoproteína sulfatada 2 (SCM-2), estavam alterados em ratos deficientes em vitamina A. A administração de uma dieta com retinol restabeleceu os

níveis normais dos mRNA e a espermatogênese. O fato do retinol não ter alterado a incorporação de uridina ao RNA total de células de Sertoli pode ser explicado pela sua atuação somente sobre os mRNA de proteínas específicas. O efeito seletivo sobre alguns tipos de RNA pode não ser detectado neste tipo de experimento. Para tal, seria necessária uma análise qualitativa dos RNA de células-controle e de tratadas com retinol.

Os resultados apresentados até esta etapa do trabalho e os descritos por GALDIERI e MONACO (1983) e por GALDIERI e NISTICO (1986) demonstram os efeitos estimulatórios do retinol sobre a *N*-glicosilação de proteínas em células de Sertoli, sem esclarecer os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados. Para tentar explicar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o retinol estimula a síntese de *N*-glicoproteínas em células de Sertoli, passou-se a examinar os efeitos do retinol em sistemas isentos de células. Para isto, estudou-se a transferência de manose para dolícil-fosfato, para dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e para proteínas em incubações de microsomas isolados de células-controle e tratadas por 48h com 10 $\mu$ M de retinol em presença de GDP-[<sup>14</sup>C]manose

Nestes experimentos, demonstrou-se que a síntese de dolícil-fosfato-manose a partir de GDP-manose foi maior nas incubações de microsomas obtidos de células de Sertoli tratadas com retinol. A análise cromatográfica do material solúvel na fase inferior de Folch mostrou que a radioatividade migrava em um único pico com mobilidade relativa semelhante ao padrão de dolícil-fosfato-manose, não tendo sido detectada a presença de retinil-fosfato-manose

Após PARODI e LELOIR (1979) terem determinado que o intermediário lipídico na *N*-glicosilação de proteínas em células eucarióticas era um dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo, muito se tem discutido sobre a importância da concentração celular de dolícil-fosfato na

regulação do processo (LUCAS e LEVIN, 1977) Muitos laboratórios têm estudado a regulação da síntese de dolicol e sua possível inter-relação com a síntese de colesterol RAMACHANDRAN et al.(1981), demonstraram em células HeLa, que a dexametasona estimulava a síntese de dolicol, dolícil-fosfato e dolícil-fosfato-manose, ao mesmo tempo em que inibia a síntese de colesterol.

A incorporação de [<sup>14</sup>C]acetato no colesterol não foi alterada pelo tratamento de culturas de células de Sertoli com retinol (LÚCIA H. MARTINI, tese de mestrado).

Pelo já discutido acima e descrito na introdução deste trabalho, a ativação da síntese de *N*-glicoproteínas pode estar relacionada com o aumento da concentração de dolícil-fosfato ou da atividade de glicosil-transferases, por estimulação dessas enzimas ou por incremento na sua síntese Ao analisar os efeitos da presença de dolícil-fosfato exógeno em incubações de microsomas de células de Sertoli, verificou-se um aumento significativo na síntese de dolícil-fosfato-manose

Com a finalidade de investigar se o efeito do retinol sobre a síntese de dolícil-fosfato-manose estaria relacionado com uma maior disponibilidade de dolícil-fosfato, incubaram-se microsomas de células tratadas com retinol e de células-controle em presença de quantidades saturantes de dolícil-fosfato exógeno. Nas células tratadas com retinol, encontrou-se um claro estímulo na formação de dolícil-fosfato-manose em todas as concentrações de dolícil-fosfato exógeno testadas. Esses resultados indicam que o retinol, em células de Sertoli, exerce um efeito estimulatório sobre a dolícil-fosfato-manose sintase (EC 2.4.1.83). Entretanto, não pode ser excluída a possibilidade de que também exista um aumento na disponibilidade de dolícil-fosfato.

O controle hormonal da dolícil-fosfato-manose sintase foi proposto por vários autores. Ao analisarem o efeito da

adição de dolícil-fosfato exógeno em células HeLa tratadas ou não com dexametasona, RAMACHANDRAM et al.(1981) e RAMACHANDRAM e MELNIKOVYCH (1986) descreveram um resultado similar aos aqui apresentados. Verificaram então, que a resposta à adição do aceptor exógeno era maior nas células tratadas com o hormônio, sugerindo que a dexametasona poderia estar estimulando a dolícil-fosfato-manose sintase de maneira independente, não relacionada com a concentração de dolícil. IUSEN et al (1984), ao determinarem que a N-glicosilação em epidídimo de ratos estava sujeita à modulação por andrógenos, mostraram que o tratamento hormonal não alterava a concentração endógena de dolícil-fosfato. A atividade da dolícil-fosfato-manose sintase epididimal, porém, apresentava uma forte dependência do estado androgênico do animal. Assim, a castração provocava uma diminuição na atividade da enzima que era restabelecida com administração de testosterona. Como as mudanças provocadas por andrógenos eram mais acentuadas quando expressas em função do conteúdo de DNA e como os hormônios esteróides atuam ativando a síntese de mRNA específicos, os autores propuseram que o aumento da atividade da transferase, encontrado nos animais tratados com andrógenos, poderia ser devido a uma estimulação na síntese da enzima.

Vários trabalhos têm demonstrado que a deficiência em vitamina A provoca uma redução na incorporação de manose em manolipídios e glicoproteínas de fígado (SATO et al ,1978; DE LUCA et al ,1975) HASSELL et al. (1978) demonstraram que a administração de um excesso de retinil-palmitato em ratos resultava em um aumento na incorporação de manose em glicolipídios e glicoproteínas, mas não de galactose. A etapa da rota de glicosilação na qual a vitamina A alteraria a incorporação de manose não foi esclarecida. RIMOLDI et al. (1990) sugerem que a redução da incorporação de manose durante a deficiência em vitamina A seja devida à inibição da síntese de GDP-manose

Estudando os efeitos do retinol e do retinil-palmitato sobre as atividades de glicolípido e glicoproteína galactosil-transferase em membrana plasmática de fígado de ratos, CREEK e MORRÉ (1980) concluíram que a estimulação provocada pelo retinol na incorporação de galactose não era resultado de sua atuação com carregador intermediário de galactose.

DEUTSCH e LOTAN (1983), por sua vez, demonstraram que o ácido retinóico estimulava a incorporação de ácido siálico a proteínas em várias linhagens de células tumorais.

Nas incubações de microssomas de células de Sertoli com GDP-manose apresentadas e discutidas neste trabalho, também foi detectada uma estimulação na incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e em glicoproteínas nos microssomas isolados de células tratadas com retinol. Pode-se atribuir ao aumento da concentração de dolícil-fosfato-manose a responsabilidade por este efeito.

Por outro lado a estimulação da incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo nos microssomas de células tratadas com retinol também poderia indicar que o dolícil-fosfato-manose participa não somente como substrato para a  $\alpha$ -manosilação, mas também como regulador da biossíntese do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo. Isto foi demonstrado por KEAN (1982, 1983 e 1985), em retina de pintos, determinando que o dolícil-fosfato-manose era efetor alostérico da UDP-N-acetil-glicosamina-dolícil-N-acetil-glicosamina-1-fosfato transferase.

Outro dos efeitos encontrado foi o aumento da transferência do oligossacarídeo para a proteína. Tal efeito pode ser explicado pelo simples aumento do substrato ou por um fenômeno similar aos descritos por vários autores que mostraram a regulação por hormônios da oligossacarídeo-transferase SINGH e LUCAS (1981) demonstraram que o tratamento com estrógenos estimulava a atividade de uma oligossacarídeo-transferase em oviduto de galinha. FRANC et

al (1984) observaram que a tireotropina estimulava a atividade de várias glicosil-transferases, distribuídas ao longo do processo de N-glicosilação (manosil- e glicosil-, galactosil- e sialil-transferase e oligossacarídeo-transferase), sendo que foi notado maior efeito estimulatório sobre a oligossacarídeo-transferase

É um fato conhecido que os hormônios esteróides e tiroideos atuam sobre receptores nucleares estimulando genes específicos. Os trabalhos de GIGUERE et al.(1987); PETKOVICH et al (1987); DARMON (1990) e WOLF (1990) sugerem que o mecanismo de ação da vitamina A seria bastante semelhante ao dos hormônios esteróides e da tireóide, envolvendo a ativação de genes específicos. No entender destes pesquisadores, isto colocaria o retinol na categoria dos hormônios que regulam o crescimento e a diferenciação celular. A glicosilação de proteínas está estreitamente relacionada com os processos de diferenciação celular. Em vários trabalhos citados nesta discussão, estão descritos efeitos de esteróides e de hormônios da tireóide sobre a glicosilação de proteínas. ESKILD et al.(1991) encontraram altos níveis do receptor do ácido retinóico (tipo RAR $\alpha$ ) em células de Sertoli. Baseados nos resultados obtidos no presente trabalho e nos de outros autores aqui citados, sugere-se a possibilidade de que a vitamina A (na forma de retinol ou de ácido retinóico) possa atuar sobre a glicosilação de proteínas em células de Sertoli, via ligação com seu receptor nuclear.

Os resultados apresentados demonstram que o retinol estimula a atividade da dolícil-fosfato-manose sintase (EC 2.4.1.83) em culturas de células de Sertoli. Tomando em consideração os efeitos sugeridos para diferentes hormônios sobre a atividade das enzimas envolvidas na síntese do lipídio-pirofosforil-oligossacarídeo, na sua transferência para a cadeia polipeptídica e na analogia proposta entre as ações da vitamina A e as de alguns hormônios, uma explicação

similar poderia ser aplicada aos aumentos encontrados na síntese do dolíclil-pirofosforil-oligossacarídió e de N-glicoproteínas

## V CONCLUSÕES

(1) Na caracterização das classes de glicoproteínas constituintes das células de Sertoli, constatou-se

a) A existência de aproximadamente a mesma proporção (50%) de *O*- e *N*-glicoproteínas

b) A análise dos oligossacarídeos constituintes dessas glicoproteínas demonstrou a existência de glicídios neutros (galactose, manose e fucose) e carregados (galactosamina, glicosamina e ácido *N*-acetil-neuramínico). Essa composição em glicídios é uma confirmação da presença de *O*- e *N*-glicoproteínas em células de Sertoli.

c) A presença de fucose, galactose e de ácido *N*-acetil-neuramínico sugere a existência de *N*-glicoproteínas do tipo complexo

d) O tratamento com endoglicosidase H demonstrou que cerca de 20% das *N*-glicoproteínas encontradas em culturas de células de Sertoli mantidas nas condições utilizadas neste trabalho são do tipo "high mannose"

(2) Ao analisar as diferentes etapas da biossíntese de *N*-glicoproteínas, usando [2-<sup>3</sup>H]manose como precursor radioativo, determinou-se que a incorporação de manose nos glicolipídios intermediários dessa rota, no "pellet" proteico delipidado e nas proteínas secretadas foi crescente com o tempo de incubação com o açúcar radioativo. Os resultados ainda sugerem a existência de uma cinética de precursor produto

(3) O tratamento de culturas de células de Sertoli com retinol aumentou a incorporação de manose no dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo e nas glicoproteínas. Este efeito foi encontrado em incubações com 10 $\mu$ M de retinol

(4) As análises cromatográficas dos compostos solúveis na fase inferior da partição de Folch e C/M/H<sub>2</sub>O (1 1 0.3) demonstraram a existência de picos de radioatividade com mobilidade relativa semelhante aos padrões de dolícil-fosfato-manose e dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo

(5) O tratamento com 10 $\mu$ M de retinol não afetou os conteúdos celulares de DNA, RNA e proteínas. Também não foi afetada a incorporação de uridina ao RNA e de leucina em proteínas.

(6) O tratamento com retinol aumentou a incorporação de metil-timidina ao DNA de culturas de células de Sertoli. Esse efeito é significativo com a dose de 10 $\mu$ M e já é máximo com 14h de tratamento das culturas com a vitamina A.

(7) Os experimentos com microsomas isolados de células de Sertoli demonstraram que o tratamento com retinol aumentou a atividade da dolícil-fosfato-manose sintase e possivelmente de outras enzimas envolvidas na rota de glicosilação.

Outros autores já haviam determinado a regulação da dolícil-fosfato-manose sintase por hormônios, mas esta foi a primeira demonstração de sua regulação pelo retinol. Também foi a primeira demonstração de uma ação regulatória exercida pela vitamina A ao nível da síntese do dolícil-pirofosforil-oligossacarídeo.

## VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, C M e WARD, S D. Dolichyl phosphate and dolichol kinase levels change during testicular development in the rat. *Chemica Scripta*, Cambridge, United Kingdom, v 27, p 25-31, 1987

ALPERIN, D.M. , CARMINATTI, H. IDOYAGA-VARGAS, V. e COUSO, R.O Thermal-ultraviolet method for differential detection and recovery of organic compounds on thin-layer chromatography *Journal of Chromatography*, Amsterdam, Netherlands, v 265, p 193-200, 1983

ATKINSON, P H. e LEE, J.T. Co-translational excision of  $\alpha$ -glucose and  $\alpha$ -mannose in nascent vesicular stomatitis virus G protein *Journal of Cell Biology*, Bethesda, MD, USA, v 98, p.2245-2249, 1984

AZHAR, S. , REEL, J R. ; PASTUSLOK, C A e MENON, K.M.J. LH Biosynthesis and secretions in rat anterior pituitary cell cultures stimulation of LH glycosilation and secretion by GNRH and an agonistic analogue and blockage by an antagonistic analogue. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, San Diego, CA, USA, v.80, p 659-666, 1978

BABA, T. , MORRIS, C. e ALLEN, C.M Dehydrodolichyl diphosphate synthase from rat seminiferous tubules. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, CA, USA, v 252, p 440-450, 1987

BEHRENS, N H e LELOIR, L.F Dolichol Monophosphate Glucose An Intermediate in Glucose Transfer in Liver *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- Washington, DC, USA, v 66, p.153-159, 1970.
- BERKOWITZ, L e NYQUIST, S E Dolichol kinase activity in developing rat testis **Biology of Reproduction**, Champaign, IL, USA, v 34, p 518-526, 1986
- BERNARD, E A e WASSERMANN, G F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by in vivo administration of follicle stimulating hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.44, p.45-47, 1982.
- BEYTIA, E D. e PORTER, J W Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, CA, USA, v 45, p 113-142, 1976
- BISHOP, P D e GRISWOLD, M D. Uptake and metabolism of retinol in cultured Sertoli cells Evidence for a kinetic model **Biochemistry**, Washington, DC, USA, v.26, p 7511-7518, 1987.
- BORLAND, K ; MITA, M ; OPPENHEIMER, C L ; BLINDERMAN, L. A. ; MASSAGUÉ, J. ; HALL P F. e CHECH, M P The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells **Endocrinology**, Baltimore, MD, USA, v.114, p 240-246, 1984
- BURTON, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v 62, p 315-323, 1956
- BURTON, W A ; LUCAS, J J e WAECHTER, C J Enhanced chick oviduct dolichol kinase activity during estrogen differentiation **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v 256, p 632-635, 1981

- CARSON, K J., EARLES, B J e LENNARZ, W J. Enhancement of protein glycosilation in tissue slices by dolichyl phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.256, p 11552-11557, 1981
- CHALIFOUR, R.J e SPIRO, R. Cleavage of dolichyl pyrophosphoryl by Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H. Comparation of enzymatic and hydrolysis techniques of saccharide release. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, CA, USA, v.229, p 386-394, 1984
- CHALIFOUR, R.J. e SPIRO, R.G. Effect of phospholipids on thyroid oligosaccharyltransferase activity and orientation *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.263, p 15673-16580, 1988.
- CHAN, V.T e WOLF, G. The role of vitamin A in the glycosilation reactions of glycoproteins synthesis in an In Vitro system. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v.247, p.53-62, 1987.
- CHAPIN, R.E., PHELPS, J.L.; MILLER, B.E. e GRAY, T.J.B Alkaline phosphatase histochemistry discriminates peritular cells in primary rat testicular cell culture *Journal of Andrology*, Philadelphia, PA, USA, v.8, p 155-161, 1987.
- CHAUDHARY, L.R ; HUANG, J C e STOCCO, D M. Effect of retinol and retinoic acid on testosterone production by rat leydig cells in primary culture *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, CA, USA, v 158, p 400-406, 1989

- CHEN, Z ; ROMRELL, L.J. e ALLEN, C.M. Dehydrodolichyl diphosphate synthase in Sertoli and spermatogenic cells of prepuberal rats *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 264, p 3849-3853, 1989
- CHILTON, B.S., KAPLAN, H.A. e LENNARZ, W.J Estrogen regulation of the central enzymes involved in O- and N-linked glycoprotein assembly in the developing and adult rabbit endocervix. *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 123, p 1237-1244, 1988
- CHYTIL, F. e ONG D.E. Cellular vitamin A binding proteins. *Vitamin and Hormones*, Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA, v 36, p 1-32, 1978
- CHYTIL, F. e ONG, D.E Cellular retinol and retinoic acid-binding protein in vitamin A action *Federation Proceedings*, Bethesda, MD, USA, v.38, p.2510-2518, 1979.
- CHYTIL, F e ONG, D.E The Retinoids, ed. Sporn,B ; Roberts, A B E Goodman, D S Academic Press, New York, NY, USA, v 2, p 89-121, 1984.
- CLERMONT, Y Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal *Physiological Reviews*, Bethesda, MD, USA, v.52, p 198-236, 1972
- COATES, S W., GURNEY, Jr T., WYLES SOMMER, L , YEH, M e HISCHEBERG, C B. Subcellular localization of sugar nucleotide synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.255, p.9225-9229, 1980.
- COUROT, M e KILGOUR, R J Endocrine control of mammalian testicular ontogenesis *Archivos de Biologia y Medicina*

Experimentales, Santiago, Chile, v 17, p 249-255, 1984

CREEK, K.E e MORRÉ, J Effects of retinol and retinol palmitate on glycolipid and glycoprotein galactosyl transferase activities of rat liver plasma membranes **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, CA, USA, v 95, p 1775-1780, 1980.

CREEK, K E.; MORRÉ, D J , SYLVERMAN-JONES, C.S.; SHIDOJI, Y. e De LUCA, L.M. Mannosyl carrier functions of retinyl phosphate and dolichyl phosphate in rat liver endoplasmic reticulum **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v 210, p.541-547, 1983

CREEK, K E ; RIMOLDI, D ; SIVERMAN-JONES, C.S. e De LUCA L.M Synthesis of retinyl phosphate mannose In Vitro. Non-enzymic breakdown and reversibility. **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v 227, p 695-703, 1985.

CULLER, M D e NEGRO-VILAR, A. Passive immunoneutralization of endogenous inhibin: sex-related differences in the role of inhibin during development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.58, p.263-273, 1988.

DARMON, M. The nuclear receptors of retinoic acid. **The Journal of Lipid Mediators**, Amsterdam, Netherlands, v.2, p.247-256, 1990.

DAS, R C ; SARADA, S.K e GANGULY, J. Isolation of a receptor protein for retinol from the oviduct magnum of laying hens **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, India, v.15, p.251-254, 1978.

DE LUCA, L M The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes *Vitamin and Hormones*, Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA, v 35, p 1-57, 1977.

De LUCA, L M , BHAT, P.V.; SASAK, W. e ADAMO, S Biosynthesis of phosphoryl and glycosyl phosphoryl derivatives of vitamin A in biological membranes. *Federation Proceedings*, Bethesda, MD, USA, v 38, p 2535-2539, 1979.

De LUCA L M , BRUGH, M R ; SILVERMANN-JONES, C.S. e SHIDOJI, Y Synthesis of retinyl phosphate mannose and dolichyl phosphate mannose from endogenous and exogenous retinyl phosphate in microsomal fraction *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v.208, p.159-170, 1982

De LUCA, L M., SILVERMAN-JONES, C.S. e BARR, R.M Biosynthetic studies on mannlipids and mannoproteins of normal and vitamin A-depleted hamster livers. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.409, p 342-359, 1975

DEL PINO, J.C , TRINDADE, V M.T.; GUMA, F. e BERNARD, E A Biochemical studies of ovary glycoproteins of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry*, Oxford, United Kingdom, v.19, p.657-661, 1989.

DEUTSCH, V e LOTAN, R. Stimulation of sialyltransferase activity of melanoma cells by retinoic acid. *Experimental Cell Research*, San Diego, CA, USA, v 149, p.237-245, 1983.

DIXON, J.L e GOODMAN, D S Effects of nutritional and hormonal factors on the metabolism of retinol-binding protein by primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of*

Cellular Physiology, New York, NY, USA, v 130, p 6-13, 1987a

DIXON, J L. e GOODMAN, D S. Studies on the metabolism of retinol-binding protein by primary hepatocytes from retinol-deficient rats Journal of Cellular Physiology, New York, NY, USA, v 130, p.14-20, 1987b.

DORRINGTON, J.H. e FRITZ, M.R. Cellular localization of 5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hidroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testes Endocrinology, Baltimore, MD, USA, v.96, p.879-889, 1975.

DOWLING, J E. e WALD, G. The biological function of vitamin A acid Proccedings of the National Academy of Sciences of USA, Washington, DC, v 46, p.587-608, 1960.

DUTT, A ; TANG, J.P. ; WELPLY, J.K. e CARSON, D.D. Regulation of N-linked glycoprotein assembly in uteri by steroid hormones Endocrinology, Baltimore, MD, USA, v.118, p 661-673, 1986

ELTING, J.J., CHEN, W.W. e LENNARZ, W.J Characterization of a glucosidase involved in an initial step in the processing of oligosaccharide chains. The Journal of Biological Chemistry, Bethesda, MD, USA, v.255, p 2325-2331, 1980.

EKBLON, P , THESLEFF, I ; SAXEN, L., MIETTINEM, A e TIMPE, R Transferrin as a foetal growth factor Aquisition of responsiveness related to embryonic induction. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, DC, v 80, 2651-2655, 1983

ESKILD, W ; REE, A H ; LEVY, F O.; JAHNSEN, T e HANSSON, V Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor- $\alpha$ , cellular retinol-binding protein, and germ cell-specific mRNAs. **Biology of Reproduction**, Champaign, IL, USA, v 44, p 53-61, 1991

FAWCETT, D W. Ultrastructure and function of Sertoli cell. **Handbook of Physiology**, Baltimore, MD, USA, v 5 (Endocrinology), p 21-55, 1975.

FISCHER, F.G e NEBEL, H.J Nachweis und glucosamin und galactosamin auf papierchromatogrammen. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, Berlin, Fed. Rep. Ger , v 302, p 10-19, 1955

FOLCH, J ; LEES, M e SLOONE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissue. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v 226, p.497-509, 1957

FRANC, J L., HOVSEPIAN, S., FAYET, G. e BOUCHILOUX, S. Differential effects of thyrotropin on various glycosyltransferases in porcine thyroid cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, San Diego, CA, USA, v 118, p 910-915, 1984

FRITZ, I B ; KOPEC, B.; LAM, K e VERNON, R.G. Effects of FSH on levels of ABP in testis **Hormone Binding and Activation in Testis**. Ed Dufaue e Means Plenum Press, New York, NY, USA, 1974.

FRITZ, I B , ROMMERTS, F ; LOUIS, B.G. e DORRINGTON, J.H. Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein cell-enriched cultures **Journal of Reproduction and Fertility**,

Cambridge, United Kingdom, v 48, p.17-24, 1976

FUGASSA, E , PALMERO, S. e GALLO, G Triiodothyronine decreases the production of androgen binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, San Diego, CA, USA, v 143, p 241-247, 1987.

FUTTERMAN, S. e HELLER, J The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 247, p.5168-5172, 1972.

GALDIERI, M. e MONACO, L. Retinol increases synthesis and secretion of Sertoli cell mannose-containing glycoproteins *Cell Biology International Reports*, London, United Kingdom, v.7, p.219-226, 1983.

GALDIERI, M. e NISTICO, L. Vitamin A modifies the glycopeptide composition of cultured Sertoli cells *Journal of Andrology*, Philadelphia, PA, USA, v 7, p.303-309, 1986

GALDIERI, M e ZANI, B Hormonal induced changes in Sertoli cell glycoproteins *Cell Biology International Reports*, London, United Kingdom, v.5, p 111, 1981.

GALDIERI, M ; ZIPARO, E.; PALOMBI, F ; RUSSO, M A e STEFANINI, M Pure Sertoli cell cultures. A new model for the study of somatic cell interactions *Journal of Andrology*, Philadelphia, PA, USA, v.2, p.249-254, 1981.

GIGUERE, V., ONG, E.S.; SEGUI, P. e EVANS, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoc

acid *Nature*, Hampshire, United Kingdom, v 330 p 624- 629, 1987.

GLASS, C K , LIPKIN, S.M. ; DEVARY, O V. e ROSENFELD, M G  
Positive and negative regulation of gene transcription by  
a retinoic acid - thyroid hormone receptor heterodimer  
*Cell*, Cambridge, United Kingdom, v 59, p 697-708, 1989

GODELAINE, D. ; SPIRO, M.J. e SPIRO, R Processing of the  
carbohydrate units of thyroglobulin. *The Journal of  
Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 256,  
p 10161-10168, 1981.

GOODMAN, D S Plasma retinol-binding protein *The  
Retinoids*. Ed. Sporn, M.D. ; Roberts, A.B. e Goodman, D S  
Academic Press, New York, NY, USA, v.2, p.42-88, 1984

GOLD, M.H e HAHN, H J Role of a mannosyl lipid  
intermediate in the synthesis of "*Neurospora crassa*"  
glycoproteins *Biochemistry*, Washington, DC, USA, v 15,  
p 1808-1814, 1976

GOLD, M.H. e HAHN, H.J. Effect of divalent metal ions on  
the synthesis of oligosaccharide side chains of  
"*Neurospora crassa*" glycoproteins *Phytochemistry*,  
Oxford, United Kingdom, v.18, p.1269-1272, 1978

GONZALES, G F , RISBRIDGER, G P ; HODGSON, Y H , POLLANEN,  
P. e KRETZER, D M. Stage-specific inhibin secretion by  
rat seminiferous tubules. *Reproduction, Fertility and  
Development*, Victoria, Australia, v.1, p 275-279, 1989.

GRANGE, D.K. e ADAIR, W.J., Jr. Studies on the biosynthesis of  
dolichyl phosphate: Evidence for the in vitro formation of  
2,3 dehydrololichyl phosphate *Biochemical Biophysical*

Research Communications, San Diego, CA, USA, v.79,  
p.734-740, 1977

GRANT, S R e LENNARZ, W J Relationship between  
oligosaccharide-lipid synthesis and protein synthesis in  
mouse LM cells **European Journal of Biochemistry**, New  
York, NY, USA, v 134, p.575-583, 1983.

GREEN, S e CHAMBON, P. A superfamily of potentially  
oncogenic hormone receptors **Nature**, Hampshire, United  
Kingdom, v 324, p 615-617, 1986.

GRISWOLD, M D., BISHOP, P D ; KIM, K., PING, R.; SIITERI,  
J.E e MORALES, C. Function of vitamin A in normal and  
synchronized seminiferous tubules. **Annals of New York  
Academy of Sciences**, New York, NY, USA, v.564, p.154-170,  
1989

GRISWOLD, M.D.; MABLY, E. e FRITZ, I.B. Stimulation by  
follicle stimulating hormone and dibutyryl cAMP of  
incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into nuclear DNA of cultured  
Sertoli cell-enriched preparations from immature rats  
**Currents Topics in Molecular Endocrinology. 2-Hormonal  
Regulation of Spermatogenesis**. Ed. French, F.S.; Hansson,  
V ; Ritzen, E.M E Nayfeh. p 413-420, 1975.

GRISWOLD, M D , MABLY, E R. e FRITZ, I.B. FSH stimulation of  
DNA synthesis in Sertoli cells in culture. **Molecular and  
Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.4,  
p 139-149, 1976.

GUARAGNA, R.; ROSA, N.B.S.; MORAES, G.G.S.; PERRY, M.L.S. e  
BERNARD, E A. Effect of protein malnutrition on  
glycoprotein synthesis by testes of 20-day-old-rats.  
**International Journal of Andrology**, Oxford, United

Kingdom, v 9, p.467-476, 1986

GUMA, F C R , GUARAGNA, R. , ROSA, N.B.S.; MORAES, G G S. ,  
GAMALLO, J.L. , PERRY, M L S e BERNARD, E.A. Glycoprotein  
biosynthesis by testes of 40-day-old rats subjected to  
protein malnutrition **International Journal of Andrology**,  
Oxford, United Kingdom, v 13, p.389-397, 1990.

HAGENAS,L ; RITZEN, E.M ; POEN, L ; HANSSON, V FRENCH, F S  
e NEYFEH, S N. Sertoli cell origin of testicular  
androgen-binding protein (ABP) **Molecular and Cellular  
Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.2, p 339-350, 1975 .

HAM, R.G e McKEEHAN, W.L Media and growth requeriments.  
**Methods in Enzimology**, Academic Press, Inc., San Diego,  
CA, USA, v.LVIII, p 44-93, 1979.

HANEJI, T.; MAEKAWA, M. e NISHIMUNE, Y. Retinoic acid  
(vitamin A acid) induces spermatogenesis in adult mouse  
cryptochid testes In Vitro. **Biochemical and Biophysical  
Research Communications**, San Diego, CA, USA, v.188,  
p 1320-1324, 1982.

HANOVER, J.A e LENNARZ, W J The topological orientation of  
N,N'-diacetylchitobiosyl pyrophosphoryl dolichol in  
artificial and natural membranes. **The Journal of  
Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v.254,  
p.9237-9246, 1978.

HANOVER, J.A. e LENNARZ, W J. Transmembrane assembly of N-  
and O-linked glycoproteins. **Archives of Biochemistry and  
Biophysics**, San Diego, CA, USA, v.211, p.1-19, 1981.

HARFORD, J B e WAECHTER, C.J. A developmental change in a  
dolichyl phosphate mannose synthase activity in pig brain.

The Biochemical Journal, Colchester Essex, United Kingdom,  
v 188, p 481-490, 1980.

HARFORD, J B.; WAECHTER, C.J e EARL, F J  
Effect of exogenous dolichyl monophosphate on a  
developmental change in a mannosyl phosphoryl dolichol  
biosynthesis. **Biochemistry and Biophysics Research  
Communication**, San Diego, CA, USA, v.76, p 1036-1043,  
1977

HASHIMOTO, Y Retinobenzoic acids and nuclear retinoic  
acids receptors. **Cell Structure and Function**, Kyoto,  
Japan, v.16, p.113-123, 1991.

HASSEL, J.R , SILVERMAN-JONES, C.S e De LUCA, L M. The In  
Vivo stimulation of mannose incorporation into mannosyl  
retinyl phosphate, dolichyl mannosyl phosphate, and  
specific glycopeptides of rat liver by high doses of  
retinyl palmitate. **The Journal of Biological Chemistry**,  
Bethesda, MD, USA, v 253, p 1627-1629, 1978.

HELLER, J. Interactions of plasma retinol-binding protein  
with its receptor. **The Journal of Biological Chemistry**,  
Bethesda, MD, USA, v.250, p.3613-3619, 1975.

HERCOVICS, A; BUGGE, B ; QUARONI, A. e KRISCH, K  
Characterization of glycopeptides labelled from D-[2-<sup>3</sup>H]  
mannose and L-[6-<sup>3</sup>H]fucose in intestinal epithelial cell  
membranes during differentiation. **Biochemical Journal**,  
Colchester Essex, United Kingdom, v 192, p 145-153, 1980

HSEUH, A J.W , DAHL, K.D.; VAUGHAN, J.; TUCKER, E.; RIVIER,  
J , BARDIN, C W e VALE, W Heterodimers and homodimers  
of inhibin subunits have different paracrine action in the  
modulation of luteinizing hormone stimulated androgen

- biosynthesis Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, DC, v 84, p 5082-5086, 1987.
- HUANG, H F.S ; DYRENFURTH, I. e HEMBREE, W.C Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A-induced recovery of spermatogenesis. Endocrinology, Baltimore, MD, USA, v 112, p 1163-1171, 1983
- HUANG, H F S ; GOULD, S e BOCCABELLA, A V Modification of Sertoli cell functions in vitamin A-deficient rats Journal of Reproduction and Fertility, Cambridge, United Kingdom, v 85, p 273-281, 1989
- HUGGENVIK, J I. e GRISWOLD, M.D. Retinol binding protein in rat testicular cells Journal of Reproduction and Fertility, Cambridge, United Kingdom, v.61, p 403-408, 1981
- HUGGEENVIK, J I ; IDEZERDA, R.L.; HAYWOOD, L ; LEE, D C McKNIGHT, G S. e GRISWOLD, M.D. Transferrin messenger ribonucleic acid: Molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells Endocrinology, Baltimore, MD, USA, v 120, p 332-340, 1987
- HUGHES, R C e BUTTERS, T D Glycosilation patterns in cells an evolutionary marker? Trends in Biochemical Science, Essex, United Kingdom, v.September, p 228-230, 1981
- HUGLY, S e GRISWOLD, M Regulation of levels of specific Sertoli cell mRNAs by vitamin A Developmental Biochemistry, San Diego, CA, USA, v 121, p 316-324, 1987
- HUTSON, J C e STOCCO, D M Peritubular cell influence on the efficiency of androgen-binding protein secretion by

- Sertoli cells in culture *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 108, p 1362-1368, 1981
- IUSEN, N D , LARMINAT, M A de, TEZON, J G ; BLAQUIER, J A e BELOCOPILOW, E Androgen dependence of protein N-glycosylation in rat epididymis *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v.114, p.1448-1453, 1984.
- JAMES, M J. e KANDUTSCH, A A Elevated dolichol synthesis in mouse testes during spermatogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.255, p.16-19, 1980.
- JENSEN, J.W. e SCHUTZBACH, J S. The biosynthesis of oligosaccharide-lipids *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 257, p.9025-9029, 1982
- JOSEPH, D.R., HALL, S.H., CONTI, M. e FRENCH, F.S. The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of follicle-stimulating hormone-regulated protein. *Molecular Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 2, p.3-13, 1988
- KARL, A.F e GRISWOLD, M D Actions of insulin and vitamin A on Sertoli cells *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v 186, p.1001-1003, 1980.
- KATO, M ; SUNG, W K., KATO, K.; GOODMAN, D S Immunohistochemical on the localization of cellular retinol binding protein in rat testis and epididymis *Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v.32, p 173-189, 1985.
- KEAN, E L Activation by dolichol phosphate-mannose of the biosynthesis of N-acetylglucosaminyl pyrophosphoryl

- polyprenols by the retina *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 257, p 7952-7954, 1982
- KEAN, E L Effect of inhibiting dolichol phosphate-mannose formation on the biosynthesis of the N-acetylglucosaminyl pyrophosphoryl polyprenols by the retina. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.752, p 488-490, 1983.
- KEAN, E L Stimulation by dolichol phosphate-mannose and phospholipids of the biosynthesis of N-acetylglucosaminyl pyrophosphoryl dolichol *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 260, p.12561-12571, 1985.
- KELLER, R K. Dolichol metabolism in rat. *Trends in Biochemical Science*, Essex, United Kingdom, v.12, p 443-445, 1987
- KELLER, R K ; ADAIR, W.L. e NESS, G.C. Studies on the regulation of glycoprotein biosynthesis. an investigation of the rate-limiting steps of dolichyl phosphate biosynthesis *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.254, p.9966-9969, 1979.
- KERR, J.B. e de KRETZER, D.M. Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle of the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, United Kingdom, v.43, p.1-8, 1975.
- KERR, J B An ultrastructural and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat *Anatomy and Embryology*, New York, NY, USA, v.179, p 191-203, 1988
- KIERZENBAUM, A.L , FELDMAN, M , LEA, O., SPRUILL, W A ;

- TRES, L.; PETRUSZ, P. e FRENCH, F.S. Localization of androgen-binding protein in proliferating Sertoli cells in culture **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, DC, USA, v.77, p 5322-5326, 1980
- KIERSZENBAUM, A L e TRES ,L.L The structural and functional cycle of Sertoli cells in culture **Bioregulators of Reproduction**. Ed. Jagiello, G. e Vogel, H.J , Academic Press, New York, NY, USA, p 207-228, 1981.
- KIRVEN, M.J e WOLF, G. Synthesis and glycosilation of fibronectin in hepatocytes from vitamin A-deficients rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.101, p 101-114, 1991.
- KRONQUIST, K E, e LENNARZ, W.J. Enzimatic conversion of proteins to glycoproteins by lipid-linked saccharides: A study of potential exogenous acceptors proteins. **Journal of Supramolecular Structure**, New York, NY, USA, v 8, p 51-66, 1978
- LACROIX, M e FRITZ, I B The control of the synthesis and secretion of plasminogen activator by rat Sertoli cells in culture **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v 26, p 247-258, 1982.
- LACROIX, M., SMITH,F.E e FRITZ, I.B. Secretion of plasminogem activator by Sertoli cell enriched cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerik, Ireland, v 9, p.227-236, 1977
- LAMB, D.J.; KESSLER, M.J.; SHEWACH, D.S.; STEINBERGER, A e SANBORN, B Characterization of Sertoli cell RNA synthetic activities *In Vitro* at selected times during sexual maturing **Biology of Reproduction**, Champaign, IL, USA,

v 27, p 374-382, 1982

LEBLOND, C P e CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea-pig as revealed by "periodic acid - fuchsin sulfurous acid" technique *American Journal of Anatomy*, New York, NY, USA, v 90, p 167-215, 1952a

LEBLOND, C.P. e CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, NY, USA, v.55, p 548-573, 1952b

LELOIR, L F , CAPUTTO, R ; CARDINI, C.E. e PALADINI, A. Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.184, p.333-350, 1950

LENNARZ, W J Topological and regulatory aspects of dolichyl phosphate mediated glycosilation of proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B - Biological Sciences*, London, United Kingdom, v.300, p 129-144, 1982.

LENNARZ, W J e SCHER, M.G. Metabolism and function of poly-isoprenol sugar intermediates in membrane associated reactions *Biochimica et Biophysica Acta Review*, Amsterdam, Netherlands, v 265, p 417-441, 1972.

LOTAN, R Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.605, p.33-91, 1980.

LUCAS, J J e LEVIN, E Increase in the lipid intermediate pathway of protein glycosylation during hen oviduct

differentiation *The Journal of Biological Chemistry*,  
Bethesda, MD, USA, v 252, p 4330-4336, 1977

LUCAS, J.J e NEVARY, C Loss of mannosyl phosphoryl  
polyisoprenol synthesis upon conversion of reticulocytes  
to erythrocytes *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam,  
Netherlands, v 528, p 475-482, 1978

LOWRY, O.H ; ROSEBROUGH, A L.; FARR, A.L. e RANDALL, R J  
Protein measurement with the the folin phenol reagent *The  
Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 193,  
p 265-275, 1951

MANGELSDORF, D J., ONG, E S., DYCK, J A e EVANS, R M  
Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid  
response pathway *Nature*, Hampshire, United Kingdom, v 345,  
p 224-229, 1990

MATHER, J.P , ZHUANG, L Z., PEREZ-INFANTE, V e PHILLIPS,  
D.M Culture of testicular cells in hormone-supplemented  
serum-free medium. *Annals of the New York Academy of  
Sciences*, New York, NY, USA, v 383, p 44-68, 1982

MARTINI, L.H. Metabolismo de lipídios em cultura de células  
de Sertoli. Tese de mestrado, orientada por Elena A.  
Bernardi, em redação.

MARZOWSKI, J.; SYLVESTER, S.R., GILMONT, R.R. e GRISWOLD,  
M.D Isolation and characterization of Sertoli cell plasma  
membranes and associated plasminogen activator activity.  
*Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v 32,  
p.1237-1245, 1985.

MARSHALL, R.D. Glycoproteins. *Annual Review of  
Biochemistry*, Palo Alto, CA, USA, v 47, p 673-702, 1972

- MASSAGUÉ, J The TGF- $\beta$  family of growth and differentiation factors *Cell*, Cambridge, United Kingdom, v.49, p 437-438, 1987
- McCOLLUM, E V e DAVIS, M The nature of dietary deficiencies of rice *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 23, p.181-246, 1915.
- MEANS, A.R.; FAKUNDING, J.L., HUCKINS, C.; TINDALL, D.J. e VITALE, R FSH, The Sertoli cell, and Spermatogenesis em *Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press, Inc , Orlando, FL, USA, v.32, p 477-527, 1976.
- MILLS, J T e ADAMANY, A.M. Impairment of dolichyl saccharide synthesis and dolichol-mediated glycoprotein assembly in the aortic smooth muscle cell in culture by inhibitors of cholesterol biosynthesis *The Journal of Biological Chemical*, Bethesda, MD, USA, v.253, p 5270-5273, 1978
- MITRANOND, V ; SOBHON, P ; TOSUKHOWONG, P e CHINDADUANDGRAT, W. Cytological changes in the testis of vitamin A-deficient rats I Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules *Acta Anatomica*, Basel, Switzerland, v 103, p 159-168, 1979.
- MORRÉ, D M , MORRÉ, D.J.; BOWEN, S.; REUTTER, W.W. e WINDEL, K Vitamin A excess alters membrane flow in rat liver. *European Journal of Cell Biology*, Stuttgart, Fed.Rep.Ger , v 46, p 306-315, 1988
- MURPHY, L A e SPIRO, R G. Transfer of glucose to oligosaccharide-lipid intermediates by thyroid microsomal enzymes and its relationship to the N-glycosylation of

- proteins *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 256, p 7487-7494, 1981.
- NAGY, F Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, United Kingdom, v 28, p 389-395, 1972.
- NAPOLI, J L. e RACE, K R The biosynthesis of retinoic acid from retinol by rat tissues In Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, CA, USA, v.255, p 95-101, 1987
- NOY, N. e XU, Z Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells *Biochemistry*, Washington, DC, USA, v 29, p 3878-3883, 1990
- NOWACK, D.D, MORRE, D.M., PAULIK, M.; KEENAN, T.W. e MORRE, D J Intracellular membrane flow reconstitution of transition vesicle formation and function in a cell-free system *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, Washington, DC, v 84, p.6098-6102, 1987.
- ONG, D E , MacDONALD, P.N e GUBITOSI, A M Esterification of retinol in rat liver. Possible participation by cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein II *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 263, p.5789-5796, 1988.
- OONK, R B. e GROOTEGOED, J.A. Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v 49, p.51-62, 1987

- COONK, R B e GROOTE GOED, J.A Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v 55, p.33-43, 1988.
- ORTH, J M. Proliferation of Sertoli cells in foetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study **Anatomical Records**, New York, NY, USA, v.203, p 485-492, 1982
- PAGE, K C , KILLIAN, G J e NIQUIST, S E. Sertoli cell glycosilation patterns as affected by culture age extracellular matrix **Biology of Reproduction**, Champaign, IL, USA, v 43, p 659-664, 1990.
- PAN, Y T e ELBEIN, A D. Control of N-linked oligosaccharide synthesis. cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor **Biochemistry**, Washington, DC, USA, v 29, p 8077-8084, 1990
- PARODI, A J e LELOIR, L.F The role of lipid intermediaries in the glycosilation of proteins in the eucaryotic cell. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v 559, p 1-37, 1979
- PARVINEN, M. Regulation of seminiferous epithelium. **Endocrine Reviews**, Baltimore, MD, USA, v.3, p.404-417, 1982.
- PEREZ-INFANTE, V.; BARDIN, C W., GUNSALUS, G L., MUSTO, N A ; RICH, K A. e MATHER, J.P. Differential regulation of testicular transferrin and androgen-binding protein secretion in primary cultures of rat Sertoli cells **Endocrinology**, Baltimore, MD, USA, v.118, p.383-392, 1986

- PEREZ, M. e HIRSCHBERG, C.B. Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.260, p 4671-4678, 1985
- PEREZ, M e HIRSCHBERG, C B Topography of glycosilation reactions in the rough endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 261, p 6822-6830, 1986.
- PEROZZI, G.; MENGHERI, E.; COLANTUONI, V. e GAETANI, S. Vitamin A intake and In Vivo expression of the genes involved in retinol transport. *European Journal of Biochemistry*, New York, NY, USA, v.196, p.211-217, 1991.
- PETKOVICH, M ; BRAND, N J ; KRUST, A. e CHAMBON,P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors *Nature*, Hampshir, United Kingdom, v 330, p 444-450, 1987.
- PICARD, J Y e JOSSO, N. Anti-müllerian hormone and lectins. New perspectives *Annales d'Endocrinologie*, Paris, France, v 41, p.538-544, 1980.
- PLOTKIN, G.M e WOLF, G Vitamin A and galactosyltransferase of tracheal epithelium *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v 615, p.94-102, 1980.
- PORTER, S B ; ONG D E , CHYTIL, F. e ORGEBIN-CRIST, M.C. Localization of cellular retinol binding protein in the rat testis and epididymis. *Journal of Andrology*, Philadelphia, PA, USA, v 6, p.197-212, 1985

- PURO, K Carbohydrate components of Bovine-kidney gangliosides *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v 187, p 401-413, 1969
- QUESADA-ALLUE, L A The biosynthesis of glucose containing insect lipid linked oligosaccharide and its possible role in glycoprotein assembly. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Limerick, Ireland, v 33, p 149-155, 1980
- QUISSELL, D O ; MAWHINNEY, T.P ; BARZEN, K.A. e DEISHER, L M Comparison In Vitro of the incorporation of D-[2-<sup>3</sup>H]mannose and D-[1-<sup>14</sup>C]glucosamine into glycoproteins of dispersed rat submandibular salivary gland cells. *Archives of Oral Biology*, Oxford, United Kingdom, v 28, p 827-831, 1983
- RANDOLPH, R K. e ROSS, A.C Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids *Journal of Lipids Research*, Bethesda, MD, USA, v 32, p 809-820, 1991.
- RANDOLPH, R K ; WINKLER, K.E. e ROSS, A.C. Fatty acyl CoA-dependent and -independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, CA, USA, v 288, p 500-508, 1991
- RAJAN, N ; SUNG, W K. e GOODMAN, D.S. Localization of cellular retinol-binding protein mRNA in rat testis and epididymis and its stage-dependent expression during the cycle of seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v.43, p.835-842, 1990
- RAJGURU, S U , KANG, Y H e AHLUWALIA, B.S Localization of retinol (vitamin A) in rat testes. *Journal of*

Nutrition, Bethesda, MD, USA, v 112, p.1881-1891, 1982

RAMACHANDRAN, C K ; HIGNITE, C.E. ; GRAY, S L. e MELNYKOVYCH, G. Evidence for the stimulation of dolichol and mannosyl lipid synthesis by glucocorticoids in HeLa cells *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v 198, p 23-28, 1981.

RAMACHANDRAN, C.K e MELNYKOVYCH, G. Differential regulation of the synthesis of mannosylphosphoryl derivatives of dolichol and retinol in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.877, p 96-103, 1986

RASK, L e PETERSON, P A In Vitro uptake of vitamin A from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey small intestine *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 251, p 6360-6366, 1976.

REBOUL, P ; BROQUET, P. ; GEORGE, P. e LOUISOT, P. Effect of retinoic acid on two glycosyltransferase activities in C6 cultured glioma cells *International Journal of Biochemistry*, Oxford, United Kingdom, v.22, p.889-893, 1990.

RIMOLDI, D , CREEK, K.E. e De LUCA, L.M Reduced mannose incorporation into GDP-glycosylation and dolichol-linked intermediates of N-glycosylation in hamster liver during vitamin A deficiency *Molecular and Cellular Biochemistry*, Limerick, Ireland, v 93, p 129-140, 1990.

ROMMERTS, F F G , KRUGER-SEWNARAIN, B Ch , VAN WOEKOM-BLIK, A , GROOTEGOED, J A. e VAN DER MOLEN, H.J Secretion of proteins by Sertoli cell enriched cultures: effects of

follicle stimulating hormone, dibutyryl cAMP and testosterone and correlation with oestradiol and androgen binding protein. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, Ireland, v.10, p.39-55, 1978.

ROSSIGNOL, D.P.; LENNARZ, W.J WAECHTER, C.J Induction of phosphorylation of dolichol during embryonic development of the sea urchin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v.256, p 10538-10542, 1981.

ROSSO, G.C , BENDRICK, C J e WOLF, G In Vivo synthesis of lipid-linked oligosaccharides in the livers of normal and vitamin A-deficient rats. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v.256, p.8341-8347, 1981

ROSSO, G C ; MASSUSHIGE, S.; QUILL, H e WOLF, G. Transfer of mannose from mannosyl retinyl phosphate to protein **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, DC, v.74, p 3762-3766, 1977

ROTH, J Subcellular organization of glycosilation in mammalian cells **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v 906, p 405-436, 1987

ROTHFIELD, L e ROMEO, D Role of lipids in the biosynthesis of the bacterial cell envelope. **Bacteriological Reviews**, Washington, DC, USA, v 35, p 14-38, 1971.

RUSSEL, L D. e PETERSON, R.N Sertoli cells junctions: morphological and functional correlates. **International Review of Citology**, San Diego, CA, USA, v.94, p.177-211, 1985

SANI, B.P ; REDDY, L G ; SINGH, R.K. e ARELLO, E. A new retinoid-binding protein with a low molecular weight.

Biochemical and Biophysical Research Communication, San Diego, CA, USA, v 175, p.1064-1069, 1991.

SARKAR, M e MOORKEJEA, S Effects of dexametasone on mannlipid synthesis by hepatocytes prepared from control and inflamed rats. **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v.219, p.429-436, 1984.

SATO, M ; De LUCA, L.M e MUTO, Y. Effect of exogenous retinol and retinoic acid on biosynthesis of [<sup>14</sup>C]mannose-labeled glycolipids and glycoproteins in rat liver **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, Japan, v 24, p.9-23, 1978

SCHACHTER, H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, Canada, v 64, p.163-181, 1986.

SERTOLI, E Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano **Il Morgagni**, Roma, Italy, v 7, p.31-39,1865.

SHIDOJI, Y. e De LUCA, L M Rat liver microsomes catalyse transfer mannosyl from GDP-mannose to retinyl phosphate with high efficiency in absence of detergents. **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v.200, p 529-538, 1981.

SHIDOJI, Y; SILVERMAN-JONES, C.S e De LUCA L.M. Retinyl phosphate mannose synthesis in rat liver membranes Phospholipase sensitivity and phospholipid requeriment. **Biochemical Journal**, Colchester Essex, United Kingdom, v 216, p. 727-735, 1983

- SHINGLETON, J.L , SKINNER, M K e ONG, D E Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells **Biochemistry**, Washington, DC, USA, v 28, p 9641-9647, 1989a
- SHINGLETON, J L , SKINNER, M K e ONG, D E. Retinol esterification in Sertoli cells by lecthin-retinol acyltransferase **Biochemistry**, Washington, DC, USA, v 28, p.9647-9653, 1989b
- SING, B N e LUCAS, J J Increased transfer of oligosaccharide from oligosaccharide pyrophosphoryl dolichol to protein acceptors upon estrogen-induced chick oviduct differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v.256, p. 12018-12022, 1981
- SKINNER, M K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, MD, USA, v.12, p.45-77, 1991
- SKINNER, M K e GRISWOLD, M D Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, USA, v.255, p 9523-9525, 1980
- SKINNER, M K e GRISWOLD, M D Hormonal regulation of transferrin synthesis in cultured Sertoli cells. **Journal of Cell Biology**, Washington, DC, USA, v.91, p.191a, 1981.
- SKINNER, M K e GRISWOLD, M D Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids **Biology of Reproduction**, Champaign, IL, USA, v 27, p 211-221, 1982

- SKINNER, M.K.; SCHITZ, S.M. e ANTHONY, C.T. Regulation of Sertoli cell differentiated function Testicular transferrin and androgen-binding protein expression. *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 124, p.3015-3024, 1989
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEHKOWITZ, R.J.; HANDLER, P e WHITE, A. Gonads Principles of Biochemistry v Mammalian Biochemistry, 7<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA, p.498-523, 1983.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G. Statistical Methods, 6<sup>th</sup> ed, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1978.
- SNIDER, M.D. e ROBBINS, P.W. Transmembrane organization of protein glycosylation - Mature oligosaccharide-lipid is located on the luminal side of microsomes from chinese hamster ovary cells *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.257, p 6796-6801, 1982.
- SNIDER, M.D. e ROGERS, O.C. Transmembrane movement of oligosaccharide-lipid during the glycoprotein synthesis. *Cell*, Cambridge, United Kingdom, v.36, p.753-761, 1984
- SNIDER, M.D.; SULTZMAN, L.A. e ROBBINS, P.W. Transmembrane localization of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles. *Cell*, Cambridge, United Kingdom, v.21, p 385-392, 1980.
- SOBHON, P.; MITRAMOND, V.; TOSUKHOWONG, P. e CHINDADAUNGRAT, W. Cytological changes in testis of vitamin A deficient rats *Acta Anatomica*, Basel, Switzerland, v.103, p 169-183, 1979

- SPEAKE, B.K. e WHITE, D A The formation of lipid-linked sugars as intermediates in glycoprotein synthesis in rabbit mammary gland. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v 170, p 273-283, 1978
- SPIRO, R G Analysis of sugars found in glycoproteins *Methods in Enzimology*, v.8, Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA, p 3-25, 1966.
- SPIRO, R G e SPIRO, M J Studies on the synthesis and processing of the asparagine-linked carbohydrate units of glycoproteins *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B - Biological Sciences*, London, United Kingdom, v 300, p 117-127, 1982.
- SPIRO, M J. e SPIRO, R.G Control of N-linked carbohydrate unit synthesis in thyroid endoplasmic reticulum by membrane organization and dolichyl phosphate availability. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 261, p.14725-14732, 1986
- SPIRO, R G , SPIRO, M J e BHOYROO, V.D. Processing of carbohydrate units of glycoproteins. Characterization of a thyroid glycosidase *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 254, p 7659-7667, 1979
- SPORN, M B , DUNLOP, N M.; NEWTON, D.L. e HENDERSON, W.R. Relations between structure and activity of retinoids. *Nature*, Hampshir, United Kingdom, v 263, p.110-113, 1976.
- STANELONI, R J e LELOIR, L F. The biosynthetic pathway of the asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins. *Trends in Biochemical Science*, Essex, United Kingdom, v 4, p 65-67, 1979

- STANELONI, R J e LELOIR, L F. The biosynthetic pathway of the asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, Boca Raton, FL, USA, v Abril, p 289-324, 1982
- STEINBERGER, A ; DIGHE, R.R. E DIAZ, J. Testicular peptides and their endocrine and paracrine functions. *Archivos de Biologica y Medicina Experimentales*, Santiago, Chile. v 17 p 267-271, 1984
- STEINBERGER, A. e STEINBERGER,E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis "in vivo" and in organ culture *Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v 4, p.84-87, 1971.
- STOOL, J., ROSENBERG, L., CARSON, D.D.; LENNARZ, W J. e KRAG, S.S A single enzyme catalyses the synthesis of the mannosylphosphoryl derivative of dolichol and retinol in rat liver and chinese hamster ovary cells *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v.260, p 232-236, 1985
- SYLVESTER, S R e GRISWOLD, M.D. Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes *Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v.31, p. 195-203, 1984.
- SZUTS, E Z e HAROSI, F.I. Solubility of retinoids in water *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, CA, USA, v 287, p 297-304, 1991
- TAO, R V.P. e SWEELEY, C C Occurrence of hematoside in human plasma *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v 218, p.372-375, 1970.

- THOMPSON, J N., HOWELL, J e PITT, G.A. Vitamin A and reproduction in rats *Proceedings of Royal Society of London B*, London, United Kingdom, v 159, p.510-535, 1964
- TINDALL, D.J e MEANS, A R Concerning the hormone regulation of androgen-binding protein in rat testis *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 99, p 808-818, 1976
- TOEBOSCH, A M W Model system to study biochemical functions of rat sertoli cells Tese de doutorado orientada por H.J van der Molen, Erasmus Universiteit Rotterdam, Holanda, 1990
- TOEBOSCH, A M W , ROBERTSON, D M , KLAIJ, I A , JONG, F H e GROOTEGOED, J A Effects of FSH and testosterona on highly purified rat Sertoli cells: inhibin  $\alpha$ -subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH but not by testosterona. *Journal of Endocrinology*, Bristol, United Kingdom, v.122, p.757-762, 1989.
- TOEBOSCH, A. M W., ROBERTSON, D.M.; TRAPMAN, J. KLAASSEN, P. de PAUS, R A ; JONG, F.H. e GROOTEGOED, J.A. Effects of FSH and IGF-I on immature rat Sertoli cells inhibin  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit mRNA levels and inhibin secretion *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v 55, p 101-105, 1988
- TREVELYAN, K , PROCTER, D.P. e HARRISON, J S Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, Hampshir, United Kingdom, v 166, p 444-445, 1950.
- TUNG ,P S.; SKINNER, M K. e FRITZ, I.B. Fibronectin synthesis is a marker for peritubular cell contamination in Sertoli cell-enriched cultures. *Biology of Reproduction*, Champaign, IL, USA, v.30, p 199-211, 1984

- van PELT, A M M. e ROOJI, D G Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology*, Baltimore, MD, USA, v 128, p 697-704, 1991.
- WALD, G. Vitamin A in eye tissues. *Journal of General Physiology*, New York, NY, USA, v.18, p.905-915, 1935.
- WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids The *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, USA, v 234, p 1971-1975, 1959
- WELLNER, R.B e LUCAS, J.J. Evidence for a compound with the properties of 2,3-dehydrodolichyl pyrophosphate. *Febs Letters*, Amsterdam, Netherlands, v.104, p 379-383, 1979.
- WHITE, D.A The formation of lipid-linked sugars by lactating rabbit mammary gland. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, United Kingdom, v.170, p.497-486, 1978
- WILSON, R M e GRISWOLD, M.D Secreted proteins from rat Sertoli cells. *Experimental Cell Research*, San Diego, Ca, USA, v 123, p 127-135, 1979
- WOLF, G Recent progress in vitamin A research: nuclear retinoic acid receptors and their interation with gene elements *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, MA, USA, v 1, p 284- 289, 1990.
- WRIGHT, W.W., MUSTO, N.A.; MATHER, J.P. e BARDIN, C.W Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, Washington, DC, USA, v.78, p.7565-7579, 1981.