

FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE ESTIMULAÇÃO DO
TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS POR FSH E
RETINOL EM CÉLULAS DE SERTOLI**

Curitiba
1995

FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE ESTIMULAÇÃO DO
TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS POR FSH E
RETINOL EM 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 Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. **Guillermo Federico Wassermann**

Curitiba
1995

ARTIGOS PUBLICADOS

Os resultados desta tese foram publicados nos seguintes artigos:

WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B.; GRILLO, M.L.; LOSS, E.S.; LEITE, L. and von LEDEBUR, E.I.C.F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by a Ca^{++} related mechanism. *Medical Science Research*, London, England, v.21, p. 437-438, 1993.

SILVA, F.R.M.B.; RENCK, L. and WASSERMANN, G..F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by mechanism unrelated to protein synthesis. *Medical Science Research*, London, England , v. 23, p. 155-156, 1995.

Trabalhos publicados em temas conexos durante a realização desta tese:

WASSERMANN, G. F.: MONTI BLOCH, L.: GRILLO, M.L.: SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E.S. and McCONNEL, L.L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Hormone and Metabolic Research*, New York, USA, v. 24 p.276-279, 1992a.

WASSERMANN, G. F.: MONTI BLOCH, L.: GRILLO, M.L.: SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E.S. and McCONNEL, L.L. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Hormone and Metabolic Research*, New York, USA, v.24 p.326 -328, 1992b.

Dedico este trabalho de tese ao meu esposo Percival Buligon Ferrigolo que sofreu com minhas angústias, vibrou com minhas realizações e, incansavelmente, embalou meus ideais.

Agradecimento especial

Ao meu "Mestre", Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann não só pelos ensinamentos laboratoriais mas, sobretudo, por ter me conduzido à pesquisa usando como ferramentas a simplicidade, seriedade e objetividade para me mostrar o caminho da verdadeira Ciência.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do grupo de pesquisa pela solidariedade e companheirismo que muito contribuíram para meu crescimento.

Aos amigos do departamento de Bioquímica da UFRGS pelo afeto e solicitude sempre demonstrados.

À Coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal do Paraná por terem oportunizado a realização deste trabalho.

Aos colegas e ao chefe do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio e compreensão.

Ao Departamento de Engenharia Nuclear - UFRGS, pela valiosa contribuição na irradiação dos animais com ^{60}Co .

Ao Prof. Dr. Moacir Wajner pela doação da $\text{H}_2\text{O} - ^3\text{H}$.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Morfológicas - UFRGS, em especial ao Dr. Antônio Marrone pelo apoio e compreensão.

Aos alunos da iniciação científica Esther I.C.F. von Ledebur, Letícia Renck, Karin Talini, Cristina Pereira Gonçalves, aos técnicos Ilo Garcia, Olavo Ludwig, Evandro Janovik e Elza Pires, pela amizade e auxílio prontamente prestados durante a realização deste trabalho.

Ao Mário Pereira pelo cuidado e irradiação dos animais.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia pelo apoio, colaboração e valiosa convivência a qual muito contribuiu para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Radovan Borejevic pelo ensinamento das técnicas de cultura de células e pelas constantes colaborações.

A Profa. Dra. Sandra Strazulas pelas sugestões e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de distribuição de hormônios hipofisários NIDDK-NIH e ao Dr. A.F.Parlow pela doação dos hormônios de diferentes espécies e, pelos esclarecimentos de estocagem e ensaios com os hormônios.

Ao CNPq, FINEP, FAPERGS-RS e PROPESP-UFRGS pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, pelas bolsas concedidas.

Aos meus pais e irmãos, a compreensão pelos momentos que não passamos juntos.

Aos inúmeros amigos aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma maneira ou outra, para a realização de uma etapa deste sonho.

SUMÁRIO

pag.

Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xviii
Abreviaturas	xix
Resumo	xxii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. TESTÍCULO	
I.1.1. Organização Estrutural do Testículo	1
I.1.2. Histofisiologia do Testículo	3
I.2. CÉLULAS DE SERTOLI	6
I.2.1. Características Estruturais e Funcionais	6
I.3. MATURAÇÃO TESTICULAR E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI	8
I.4. CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA	10
I.4.1. Culturas Enriquecidas em células de Sertoli	11
I.5. HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE	12
I.6. CÉLULAS DE SERTOLI COMO ALVO DO FSH	13
I.7. MENSAGEIROS INTRACELULARES	15
I.8. MECANISMO DE AÇÃO DO FSH NA CÉLULA DE SERTOLI	19
I.9. RETINOL	24
I.9.1. Características Estruturais	24
I.9.2. Aspectos Gerais do Metabolismo da Vitamina "A"	25
I.9.3. Captação Celular e Metabolismo do Retinol	28
I.9.4. Aspectos Gerais do Retinol no Testículo	28
I.9.5. As Células de Sertoli como Alvo do Retinol	31
I.10. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS	39
I.10.1. Sistemas de Transporte para Aminoácidos Neutros	41
I.10.2. Sistema "A"	42

I.10.3. Sistema "ASC"	43
I.10.4. Sistema "L"	44
I.10.5. .Regulação Hormonal do Transporte de Aminoácidos	45
I.11. OBJETIVOS	50
 II. MATERIAIS E MÉTODOS	 52
II.1. MATERIAIS	52
II.1.1..Soluções Salinas e Meio de Cultura Utilizados	52
II.1.1.1. Solução Salina Tamponada (BSS)	52
II.1.1.2. Solução Salina Tamponada sem Cálcio e Magnésio (CMF-BSS)	52
II.1.1.3. Meio de Cultura 199	53
II.1.1.4. a) Tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb)	53
b) Tampão Hipossódico	54
II.1.1.5. Meio Bacteriológico - Caldo de carne simples	54
II.1.2. Enzimas	55
II.1.3. Hormônios	55
II.1.3.1. Hormônio Folículo Estimulante	55
II.1.4. Retinol	56
II.1.5. Soro Fetal Bovino	57
II.1.6. Outras Substâncias	57
II.1.7. Substâncias Radioativas	57
II.1.8. Soluções de Cintilação	57
II.1.9. Esterilização de Materiais	58
II.1.10. Esterilização de Soluções	58
II.1.11. Equipamentos	59
II.2. MÉTODOS	60
II.2.1. Animais Experimentais	60

II.2.2. Obtenção de Ratos com Testículos Enriquecidos em Células de Sertoli "SCE"	61
II.2.3. Controle Histológico dos Procedimentos de Irradiação	61
II.2.4. A) MÉTODOS PARA OS EXPERIMENTOS REALIZADOS EM CULTURAS	
DE CÉLULAS DE SERTOLI	62
II.2.4.1. Isolamento de Túbulos Seminíferos "SCE" e Obtenção de Células de Sertoli	62
II.2.4.2. Cultura Primária de Células de Sertoli	64
II.2.4.3. Determinação da Pureza das Culturas de Células de Sertoli	64
II.2.4.4. Determinação do Conteúdo Lipídico nas Culturas	65
II.2.4.5. Determinação Quantitativa das Células em Cultura pelo Método da Hematoxilina-Eosina	68
II.2.4.6. Culturas de Células de Sertoli após 72 h em Cultura	69
II.2.5. TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA	69
II.2.5.1. Células de Sertoli Tratadas com FSH	69
II.2.5.2. Células de Sertoli Tratadas com LH	70
II.2.5.3. Células de Sertoli Tratadas com Retinol	70
II.2.5.4. Células de Sertoli Tratadas com Retinol e FSH	71
II.2.5.5. Células de Sertoli Tratadas com Testosterona	71
II.2.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	72
II.2.6.1. Coleta e Rompimento das Células	72
II.2.6.2. Determinação da Radioatividade	72
II.2.6.3. Expressão dos Resultados e Análise Estatística	72
II.2.7. B) MÉTODOS UTILIZADOS PARA OS EXPERIMENTOS EM TESTÍCULOS	
ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI "SCE"	73
II.2.7.1. Obtenção dos Testículos "SCE"	73
II.2.7.2. Incubação dos Testículos	73
II.2.7.3. Grupos Experimentais	74
II.2.7.3.1. Efeito da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de Aminoácidos	74

II.2.7.3.2. Influência da Inibição do Sistema "A" no Transporte de Aminoácidos	74
II.2.7.3.3. Influência dos Bloqueadores de Canais de Cálcio no Efeito Estimulatório do Retinol na Captação de Aminoácidos	74
II.2.7.3.4. Efeito do Tratamento Crônico com Testosterona em Testículos "SCE"	74
II.2.7.3.5. Efeito da Glicose em Testículos "SCE"	74
II.2.7.3.6. Ação do Retinol na Captação de Aminoácidos Durante a Maturação Sexual	74
II.2.7.4. Medida da Radioatividade e Expressão dos Resultados	74
II.2.7.5. Análise Estatística	75
III. RESULTADOS	77
<u>Parte I. Experimentos com FSH</u>	
III.1. EXPERIMENTOS COM FSH EM CULTURAS "SCE"	77
III.1.1. Efeito da Dose de FSH de Hipófise de Ovinos (Sigma) no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	77
III.1.2. Efeito da Concentração de FSH de Hipófise de Suínos (NIH) no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli.	79
III.1.3. Curva Dose Resposta do FSH de Hipófise de Ovinos (NIH) no Transporte de Aminoácidos Neutros	80
III.1.4. Efeito Comparativo de Diferentes Origens e Espécies de FSH no Transporte de Aminoácidos	81
III.1.5. Efeito Comparativo do FSH e LH no Transporte de Aminoácidos em Culturas de Células de Sertoli	83
III.1.6. Efeito de um Longo Período de Pré-Tratamento com FSH no Transporte de Aminoácidos Neutros	84
III.1.7. Efeito do FSH sobre a Incorporação de Leucina- ^{14}C em Proteínas de Culturas de Células de Sertoli	86
<u>Parte II. Experimentos com Retinol</u>	87
III.2. ANÁLISE DO EFEITO DO RETINOL NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS	87

III.2.1. Influência da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de Aminoácidos Neutros em Testículos "SCE"	87
III.2.2. Influência da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de Aminoácidos em Culturas de Células de Sertoli	89
III.2.3. Efeito da Dose de Retinol sobre o Transporte de Aminoácidos Neutros em Culturas "SCE"	90
III.2.4. Curvas de Tempo da Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas "SCE"	91
III.2.5. Identificação do Sistema de Transporte de Aminoácidos Neutros Estimulado por Retinol em Testículos "SCE"	92
III.2.6. Efeito do Co^{++} e do Ni^{++} sobre a Ação Estimulatória do Retinol no Transporte de Aminoácidos Neutros em Testículos "SCE" de Ratos Imaturos	94
III.2.7. Efeito do Retinol sobre a Incorporação de Leucina- ^{14}C em Proteínas	95
III.2.8. Influência do Tratamento com Ciclo-Heximida na Síntese Protéica e no Transporte de Aminoácidos	97
III.2.9. Efeito da Ciclo-Heximida na Ação do Retinol no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C	99
III.2.10. Influência do Tempo Longo de Tratamento com Retinol no Transporte de Aminoácidos	101
III.2.11. Efeito do Tratamento com Retinol e FSH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	102
III.2.12. Ação do Retinol no Transporte de Aminoácidos Neutros em Testículos "SCE" Durante a Maturação Sexual	104
III.2.13. Efeito do Tratamento Crônico com Testosterona no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"	105
III.2.14. Efeito do Tratamento Crônico e Agudo com Testosterona no Transporte de Aminoácidos Neutros em Culturas "SCE" de Ratos Imaturos	107
IV. DISCUSSÃO	109
Parte I. Experimentos com FSH	109
Parte II. Experimentos com Retinol	115

V. CONCLUSÕES	129
VI. APÊNDICE	131
VI.1. Estudo do Efeito da Variação da Concentração de α -MeAIB- ¹⁴ C Basal e Estimulado por FSH em Culturas de Células de Sertoli.	131
VI.2. Influência da Glicose sobre o Transporte de Aminoácidos Neutros em Testículos "SCE" de Ratos de 35 dias de idade.	132
VI.3. Influência dos Diferentes Meios de Incubação no Transporte de α -MeAIB- ¹⁴ C Estimulado por FSH ou Retinol em Culturas de Células de Sertoli	134
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE FIGURAS

	pag.
FIGURA I.1. Representação Esquemática da Estrutura dos Testículos de Mamíferos	2
FIGURA I.2. Representação Esquemática da Síntese de Testosterona à Partir de Acetato ou Colesterol Plasmático	4
FIGURA I.3. Produtos da Célula de Sertoli e Fatores que Podem Influenciar a sua Secreção	9
FIGURA I.4. Resumo Esquemático do Controle Hormonal da Função Testicular	14
FIGURA I.5.A) Estrutura Química do Retinol	27
B) Fórmula Estrutural Básica dos Retinóides e Várias Modificações do Anel, da Cadeia Lateral e do Grupo Polar	
FIGURA I.6. Representação Esquemática dos Mecanismos de Captação do Retinol e Ácido Retinóico e dos Destinos Intracelulares destas Substâncias em uma Célula de Vertebrados	29
FIGURA I.7. Mecanismo Proposto para a Ação dos Retinóides nos Túbulos Seminíferos	32
FIGURA I.8. Visão Geral da Regulação da Transcrição Mediada pelo Receptor	34
FIGURA I.9. Homologia entre os Membros da Família de Receptores Nucleares	36
FIGURA I.10. Diagrama Esquemático de Algumas das Ações do Ácido Retinóico sobre o Genoma	38
FIGURA I.11. Representação Esquemática da Hipótese do Mecanismo de Ação do FSH e Retinol	50
FIGURA II.1.A e B. Determinação da Efetividade da Irradiação com ^{60}Co "in útero"	63
FIGURA II.2. Representação Esquemática do Processo de Obtenção de Células de Sertoli.	66
FIGURA II.3. Determinação do Conteúdo Lipídico pelo Método do Sudan Negro	67
FIGURA II.4. Determinação Quantitativa das Células em Cultura pelo Método da Hematoxilina-Eosina	68

FIGURA II.5. Monocamada de Células de Sertoli "SCE" Cultivadas por 72h	69
FIGURA II.6. Representação Esquemática do Processo de Obtenção e Incubação dos Testículos "SCE"	76
FIGURA III.1.1. Efeito da Dose de FSH de Ovinos-Sigma no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	78
FIGURA III.1.2. Efeito da Dose de FSH de Suínos NIH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	79
FIGURA III.1.3. Efeito do FSH de Hipófise de Ovinos NIH no Transporte de Aminoácidos Neutros	80
FIGURA III.1.4. Efeito do FSH de Diferentes Origens e Espécies no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	82
FIGURA III.1.5. Efeito Comparativo do FSH e LH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	84
FIGURA III.1.6. Influência do Tempo de Pré-Incubação com FSH de Suínos-NIH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	85
FIGURA III.1.7. Efeito do FSH de Suínos-NIH sobre a Incorporação de Leucina- ^{14}C em Proteínas de Culturas de Células de Sertoli	87
FIGURA III.2.1. Efeito da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"	88
FIGURA III.2.2. Efeito da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	90
FIGURA III.2.3. Efeito da Dose de Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	91
FIGURA III.2.4. Influência do Tempo de Incubação na Captação de α -MeAIB- ^{14}C basal e estimulada por retinol em Culturas de Células de Sertoli	92

FIGURA III.2.5. Influência da Inibição do Sistema "A" de Transporte de Aminoácidos no Efeito Estimulatório do Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"	93
FIGURA III.2.6. Influência dos Bloqueadores de Canais de Cálcio no Efeito Estimulatório do Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"	95
FIGURA III.2.7.A. Efeito do Retinol sobre a Incorporação de Leucina- ^{14}C em Proteínas de Células de Sertoli em Culturas	96
FIGURA III.2.7.B. Efeito do Tempo de Pré-Incubação em BSS na Incorporação Leucina- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	97
FIGURA III.2.8.A. Inibição da Síntese Protéica em Culturas de Células de Sertoli	98
FIGURA III.2.8.B. Efeito da Ciclo-Heximida no Transporte Basal de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	99
FIGURA III.2.9. Efeito da Ciclo-Heximida na Ação do Retinol no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C	100
FIGURA III.2.10. Influência do Tempo de Pré-Incubação com Retinol no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli Incubadas por 15 min. sem Retinol	102
FIGURA III.2.11. Efeito Não-Aditivo da Ação do Retinol e FSH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli	103
FIGURA III.2.12. Efeito do Retinol no Transporte de Aminoácidos Durante a Maturação Sexual	105
FIGURA III.2.13. Efeito do Tratamento Crônico com Testosterona na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"	106
FIGURA III.2.14. Efeito do Tratamento Crônico e Agudo com Testosterona na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas Provenientes de Testículos "SCE" de Ratos Imaturos	107

FIGURA VI.1. Efeito de Diferentes Concentrações de α -MeAIB- ^{14}C na Captação	
Estimulada por FSH de Suínos-NIH em Culturas de Células de Sertoli	132
FIGURA VI.2. Influência da Glicose (14 mM) sobre o Transporte de Aminoácidos	
Neutros em Testículos "SCE" de Ratos de 35 dias de idade	133
FIGURA VI.3.A e B. Influência dos Diferentes Nutrientes no Transporte de Aminoácidos	
Estimulado por FSH ou Retinol em Culturas de Células de Sertoli	135

LISTA DE TABELAS

	pag.
TABELA II.1. Composição da Salina Tamponada (BSS)	52
TABELA II.2. Composição da Salina Tamponada CMF-BSS	53
TABELA II.3. Soluções Estoque para Preparo do KRb	53
TABELA II.4. Concentrações Iônicas do KRb, líquido intra e extracelular	54
TABELA II.5. Composição do Caldo de Carne Simples	55
TABELA II.6. Composição do Aquasol	58
TABELA II.7. Coloração Histoquímica - Fixação	65
TABELA II.8. Revelação	65

ABREVIATURAS

Além dos símbolos químicos e das unidades do sistema internacional (SI) de pesos e medidas convencionalmente utilizados, encontram-se listadas abaixo outras abreviaturas empregadas neste trabalho.

ABP	Proteína ligadora de andrógenos
AC	Adenil-ciclase
AIB	Ácido α -aminoisobutírico
AMPc	3', 5' adenosina monofosfato cíclico
atm	Atmosfera
BSS	Solução salina tamponada
cLeu	Cicloleucina
CMF-BSS	Solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio
cpm	Contas por minuto
CRP	Com retinol durante o período de pré-incubação
CRABP	Proteína de ligação celular de ácido retinóico
CRBP	Proteína de ligação celular de retinol
CRI	Com retinol durante o período de incubação
DA	Dopamina
DBAMPc	Derivado dibutiril do 3', 5' adenosina monofosfato cíclico
DG	Diacilglicerol
DHP	Dihidropiridinas
DHT	Dihidrotosterona
DNA	Ácido desóxirribonucléico
DOG	2-Deóxi-glicose
E.P	Erro padrão da média
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Unidade gravitacional
GMPc	3' 5' guanosina monofosfato cíclico
GnRH	Hormônio de liberação de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HE	Hematoxilina-eosina
Hz	Hertz
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina-I

IP	Inositol fosfato
IP ₃	Inositol trifosfato
KRb	Krebs-Ringer bicarbonato
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
μCi	Micro Curie
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
MeAIB	Ácido α-metilaminoisobutírico
μg/ml	Micrograma por mililitro
mEq/l	Miliequivalente por mililitro
min	Minuto
mCi	Mili Curie
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mU/ m	Miliunidade por mililitro
ng	Nanogramas
NIH	National Institute of Health - USA
NIADDK	National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases
nm	Nanômetro
ODC	Ornitina descarboxilase
P-Mod-S	Proteína das células peritubulares moduladora da célula de Sertoli
P.A	Pró-análise
P.A.S.	Ácido periódico-Shiff
PDE	Fosfodiesterase
PKI	Inibidor da proteína quinase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
POPOP	(1, 4 di) -5- fenil -2-oxazolil - benzeno
PPO	2,5 - difenil - oxazole
PRL	Prolactina
Proteína-G	Proteínas ligadoras de nucleotídios da guanina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rads	Radiações
RAR	Receptor do ácido retinóico
RAR-α	Receptor nuclear (α) para o ácido retinóico

RBP	Proteína carregadora de retinol
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SCE	Enriquecidos em células de Sertoli
SFB	Soro fetal bovino
SRP	Sem retinol durante o período de pré-incubação
T/M	Relação tecido/meio
T ₃	L-triiodotironina
TC	Toxina colérica
TCA	Ácido tri-cloroacético
TGF	Fator de crescimento transformador
TP	Toxina pertússis
TTR	Transtirretina
U/mg	Unidades por miligramas
U.V.	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
VAD	Animais deficientes em vitamina A

RESUMO

As células de Sertoli tem um papel importante na regulação do processo espermatogênico e possuem sítios de ligação para o FSH e andrógenos. Além disso, são células alvo da vitamina A, substância que exerce efeitos modulatórios importantes sobre a espermatogênese. Esta tese teve como objetivo esclarecer alguns aspectos do mecanismo de ação do hormônio folículo estimulante (FSH) (responsividade das culturas de células de Sertoli ao FSH e ação mediata do hormônio) e, investigar o mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos neutros (ação imediata e mediata). Para este estudo foram utilizados testículos enriquecidos em células de Sertoli (*SCE*) de ratos e culturas de células de Sertoli provenientes de testículos "*SCE*" de ratos imaturos.

Na primeira parte desse trabalho foi analisado o efeito do FSH de distintas origens e purezas no transporte de aminoácidos neutros e, posteriormente a influência do FSH na síntese de proteínas gerais em culturas enriquecidas em células de Sertoli de ratos imaturos. As culturas de células de Sertoli altamente purificadas são completamente responsivas ao FSH aos 15 min. de tratamento hormonal. As diferentes doses de gonadotrofinas utilizadas estimularam o transporte de aminoácidos neutros com diferenças na potência relativa do hormônio. A sensibilidade desse método foi detectada desde a dose 0,025 mU/ml e nenhum efeito do LH foi observado com respeito ao estímulo no transporte de α -MeAIB- ^{14}C . Paralelamente foi analisado a ação mediata do hormônio no transporte de aminoácidos e na síntese protéica. O tratamento prolongado com FSH (0,1 mU/ml), aumentou significativamente a incorporação de leucina- ^{14}C em proteínas e não foi verificado qualquer alteração estimulatória no transporte de aminoácidos. A seguir, modelos de tratamento agudo e prolongado também forneceu informações a respeito do mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos neutros. O retinol induziu um aumento significativo no transporte de aminoácidos neutros em testículos "*SCE*" e em culturas de células de Sertoli de ratos imaturos. Este estímulo foi observado com as doses de 10 e 20 μM em tempos curtos (minutos). A ação estimulatória do retinol no transporte de α -MeAIB- ^{14}C processa-se através do sistema "A" de transporte dependente de sódio e energia e, envolve a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, provavelmente do tipo "T". Por outro lado, a ação estimulatória do retinol no transporte de aminoácidos continua sendo observada mesmo na presença de ciclo-heximida em concentrações que reduziram em 95% a síntese protéica. O tratamento prolongado com retinol estimulou a síntese protéica em 15 min. e atingiu um efeito máximo nas 3 h de incubação. Também foi observado que a presença do retinol somente durante o período de pré-incubação (ação mediata), não teve uma segunda fase no transporte de aminoácidos mediada pela síntese de novo de proteínas. A ação estimulatória do retinol no transporte de aminoácidos não foi aditiva nem com a dose máxima de FSH utilizado.

Nos estudos do efeito do retinol em testículos "*SCE*" de ratos durante o desenvolvimento sexual do animal observou-se uma ação estimulatória na captação de aminoácidos somente em testículos de ratos de 15 dias, aos 30 e 35 dias a captação caiu drasticamente e o retinol foi inefetivo.

O tratamento crônico e/ou agudo com propionato de testosterona não teve efeito detectável no transporte de aminoácidos nem em testículos "SCE" nem em células de Sertoli de ratos imaturos. Estes resultados mostram que o FSH e o retinol estimulam o transporte de aminoácidos através de um mecanismo parcialmente comum, já que, ambos atuam no sistema "A" de transporte através de canais de cálcio dependentes da voltagem, são independentes da síntese "*de novo*" de proteínas e, seus efeitos não são aditivos.

I. INTRODUÇÃO

I.1. TESTÍCULO

I.1.1. Organização Estrutural do Testículo

O sistema reprodutor masculino consiste em: 1) órgãos sexuais primários - os dois testículos; 2) um sistema de ductos (ductos eferentes, o epidídimo, o canal deferente e o conduto ejaculador) e 3) várias glândulas acessórias masculinas (vesícula seminal, a próstata e a glândula bulbouretral) (Dym, 1983).

O parênquima testicular de mamíferos é composto basicamente de dois compartimentos. O tecido intersticial vascularizado, constituído pelas células de Leydig, células mióides ou peritubulares, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos e macrófagos (Fawcett, 1993), sendo que a organização desse compartimento varia consideravelmente de uma espécie a outra (Steinberger e Steinberger, 1989). E, os túbulos seminíferos que em animais sexualmente maduros são formados por um complexo epitélio estratificado constituído por distintas categorias de células. As células de Sertoli, células de sustentação não proliferativas e uma população de células proliferativas que migram continuamente da periferia do túbulo à superfície luminal - as células germinativas (Fawcett, 1993 e Dym, 1983).

Um corte histológico transversal do parênquima testicular mostra os túbulos seminíferos, apresentando um alto grau de dobramentos, inseridos na matriz do tecido conjuntivo frouxo que contém as células do tecido intersticial. Figura I.1.

A análise da composição de um túbulo seminífero de um animal adulto, além das células de Sertoli, podem ser observadas uma ou duas gerações de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Uma geração é definida como um grupo de células que são produzidas aproximadamente no mesmo momento e se desenvolvem sincronicamente. Nos diferentes tipos de células germinativas, certos passos do desenvolvimento da espermátide está associado com uma geração definida de espermatócito e espermatogônia, estas associações são chamadas estágios e já está bem descrito em várias espécies (Clermont,

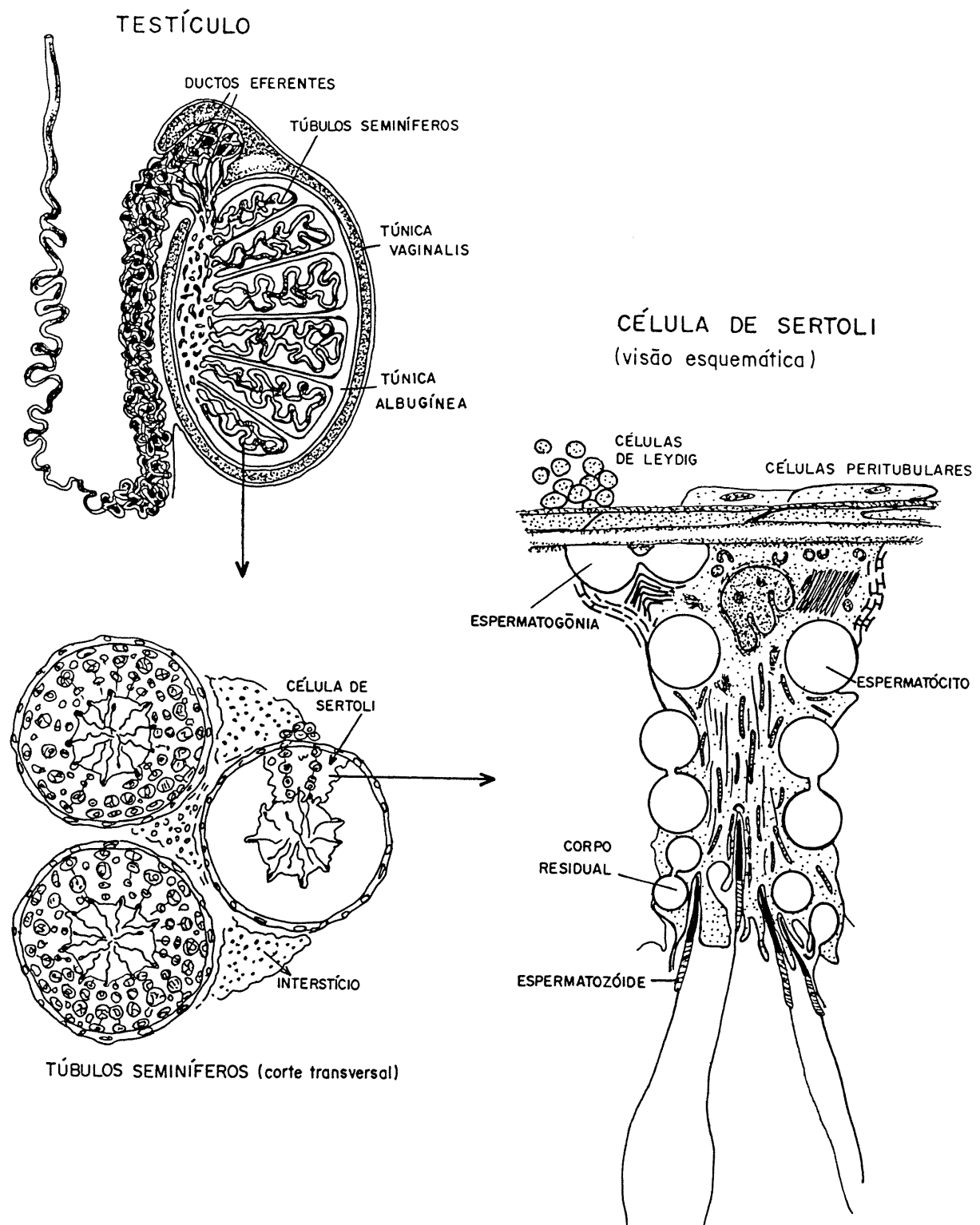


Figura I.1. Representação Esquemática da Estrutura dos Testículos de Mamíferos.
Reproduzido de Dym, 1983 e de Skinner, 1991.

1972). Uma série completa de um estágio é denominada ciclo do epitélio seminífero e dura aproximadamente 12 a 13 dias nas diferentes cepas de ratos (Leblond e Clermont, 1952; Clermont, 1972; Parvinen, 1982). A espermatogênese completa nos ratos Wistar é atingida aproximadamente aos 52 dias de idade (Clermont, 1972). Nesse processo contínuo de produção de espermatozóides no testículo, as células de Sertoli e germinativas interagem intensiva e cooperativamente para o pleno desenvolvimento do epitélio germinativo.

Observações morfológicas e histológicas demonstraram que as células de Sertoli variam qualitativamente e alteram seu comportamento metabólico durante os diferentes estágios do ciclo do epitélio germinativo (Parvinen, 1982). Essas descobertas garantem que a plena associação ambiental, além de nutricional e hormonal entre as células de Sertoli e germinativas, são fundamentais para o desenvolvimento completo da espermatogênese.

I.1. 2. Histofisiologia do Testículo

Os testículos constituem o órgão sexual primário do sistema reprodutor masculino e possuem funções importantes como: a) função endócrina (células intersticiais) e b) função exócrina (túbulos seminíferos).

a) Função endócrina testicular- Junto ao lado externo da membrana basal dos túbulos seminíferos, há uma ou mais camadas de tecido conjuntivo frouxo de células mióides e agregados de células de Leydig distribuídas no espaço intertubular. As células de Leydig possuem um rico retículo endoplasmático liso onde reside a maquinaria enzimática para a produção de hormônios androgênicos (Fawcett, 1993). O colesterol derivado da circulação ou sintetizado no retículo endoplasmático liso é transportado para a mitocôndria onde uma clivagem na cadeia lateral leva à formação de pregnenolona que no retículo endoplasmático liso é transformada em testosterona e posteriormente é secretada no interstício. Assim, a testosterona pode entrar para o sistema capilar venoso ou linfático para ser transportada para fora dos testículos ou difundir-se para os túbulos seminíferos (Steinberger, 1970). Figura I.2. A alta concentração local de testosterona é necessária para manter a espermatogênese normal e

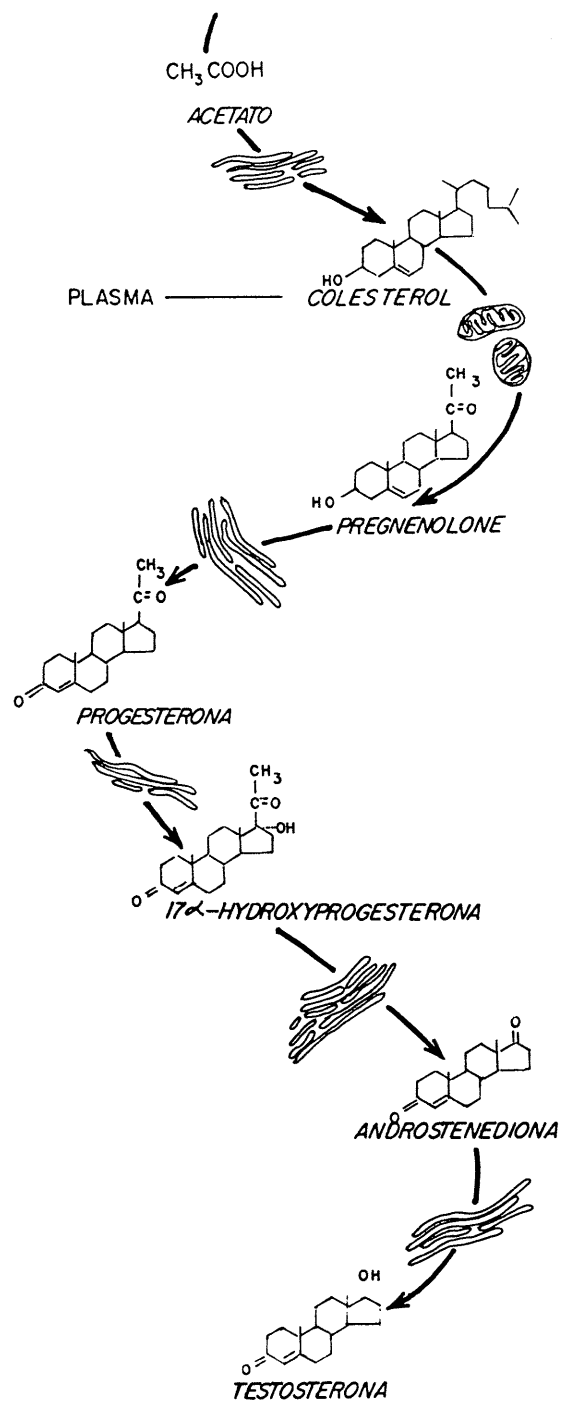


Figura I.2. Representação Esquemática da Síntese de Testosterona à Partir de Acetato ou Colesterol Plasmático
 Reproduzido e modificado de Steinberger e Steinberger, 1989.

completa nos túbulos seminíferos. Além disso, a testosterona circulante é essencial para manter a função das glândulas acessórias e o desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas (Steinberger et al., 1973 ; Parvinen, 1982 e Fawcett, 1993).

b) Função exócrina testicular - O epitélio seminífero possui uma organização bastante complexa, sendo formado por duas populações de células - As células germinativas e as células de Sertoli.

Os elementos germinativos consistem de uma geração sucessiva de células arranjadas numa camada concêntrica bem definida dentro do epitélio seminífero no interior dos túbulos, incluindo da periferia ao lúmen; espermatogônia, espermatócito, espermátide e espermatozóide (Dym, 1983).

As células germinativas primordiais masculinas originadas do endoderma do saco vitelino, migram para dentro dos testículos em desenvolvimento, incorporam-se aos cordões sexuais epiteliais que se desenvolverão em túbulos seminíferos. Nesse local, as células germinativas primordiais, as espermatogônias primitivas ou pré-espermatogônias, que permanecem em repouso até, por volta do início da puberdade, começam a sofrer mitose para formar espermatogônias e dar início ao processo de divisão e diferenciação das espermatogônias, produzindo os espermatozóides através do processo denominado espermatogênese (Cormack, 1991 e Clermont, 1972). As células germinativas em desenvolvimento são circundadas pelos componentes somáticos do epitélio seminífero - as células de Sertoli.

As células de Sertoli originadas de células epiteliais comuns dos cordões sexuais transformam-se em células epiteliais constituintes dos túbulos seminíferos. Além de proporcionar um apoio mecânico e de proteção das células germinativas em desenvolvimento, participam ativamente no processo de nutrição e liberação dos espermatozóides maduros (Fawcett, 1993). O início da espermatogênese é caracterizado pela proliferação de uma célula tronco indiferenciada - a espermatogônia indiferenciada. Dessa multiplicação surge uma geração de espermatogônias diferenciadas e uma nova geração de espermatogônias

indiferenciadas. As espermatogônias diferenciadas dão origem aos espermatócitos que, numa segunda fase, sofrem divisão meiótica para formar as espermatídes haplóides. No processo denominado espermiogênese as espermatídes se diferenciam em espermatozóides (Clermont, 1972). A localização peculiar das células de Sertoli no túbulo seminífero, constituindo-se no seu tecido de sustentação, parece caracterizar bem sua função.

Pode aceitar-se que os espermatozóides sejam o produto exócrino principal do epitélio seminífero. Entretanto, a função secretora deste epitélio inclui também a síntese e secreção de proteínas testiculares com funções específicas e a liberação do fluído tubular rico em potássio (Fawcett, 1993). Esses componentes são seguramente importantes na manutenção da espermatogênese ativa e da transferência dos espermatozóides através do sistema de ductos excretores.

I.2.CÉLULA DE SERTOLI

I.2.1. Características Estruturais e Funcionais

Baseado nos estudos em microscopia ótica e eletrônica tem sido descrito para as células de Sertoli uma morfologia bastante complexa. Elas são células colunares, de aparência tridimensional que se estendem desde a lâmina basal dos túbulos seminíferos, onde são apoiadas, até o lúmen tubular. Essas células possuem um núcleo irregular e complexo e no seu citoplasma além das organelas usuais, possuem muitos microtúbulos e microfilamentos (para uma revisão ver Fawcett, 1993). Uma das primeiras interações identificadas entre as células de Sertoli foram as junções especializadas, chamadas junções oclusivas (*tight junctions*) (Flickinger e Fawcett, 1970). A projeção do citoplasma das células de Sertoli, próximos à base das células, conectam-se uns aos outros formando as junções oclusivas entre células de Sertoli adjacentes (Russel e Peterson, 1985). Após estudos comparativos da análise do conteúdo protéico, iônico e dos aminoácidos no fluido testicular dos túbulos, da linfa e do plasma (Setchell, 1960 e Waites, 1977) foi atribuído a essas interações entre células de Sertoli uma função seletiva da passagem de macromoléculas do espaço intersticial para o lúmen tubular

(Dym e Fawcett, 1970 e Aoki e Fawcett, 1975). Essas junções especializadas, além de manter o epitélio germinativo coeso, permitem a comunicação célula-célula, através dos contatos de baixa resistência das membranas, e formam a base estrutural da barreira sangue testículo (Fawcett, 1975). A barreira divide o túbulo seminífero em um compartimento basal e um compartimento adluminal. O arranjo citoarquitetônico entre as células de Sertoli e as células germinativas é um dos exemplos da importância da interação ambiental célula-célula no testículo. As células de Sertoli, além de fornecerem um suporte físico para a espermatogônia sofrer mitose, o espermátócito sofrer meiose e a espermátide transformar-se em espermatozóide (Clermont, 1972; Russel et al, 1987), também mantém um sincício entre as germinativas dado pela conexão de todas as células derivadas de um mesmo clone inicial (Brokelmann, 1963).

As células de Sertoli, cuja função primária é fornecer fatores de crescimento essenciais e criar um ambiente apropriado para o desenvolvimento de células germinativas, apresentam inúmeras outras funções como: a) estabelecimento e manutenção da barreira sangue-testículo; b) fagocitose de células germinativas danificadas e dos corpos residuais que resultam do processo de metamorfose das espermátides; c) secreção e manutenção de um fluido rico em potássio e bicarbonato (o qual permite maior direcionamento dos espermatozoides ao fluirem do testículo para o epidídimo); d) produção e secreção de proteínas testiculares; e) síntese de estradiol a partir de testosterona e, f) sítio testicular para a ação de hormônios (Means et al.,1976). A célula de Sertoli no túbulo seminífero, possui um caráter de célula exócrina e endócrina o que é estabelecido pelos seus produtos secretórios e por ser um sítio para a ação de hormônios.

As células de Sertoli possuem função secretora bastante relevante. Essas células produzem uma grande variedade de compostos, alguns dos quais são bem conhecidos quanto a função e regulação da sua produção. Outros produtos de secreção, no entanto, foram detectados somente recentemente e sua função nos testículos ainda não é clara (De Philip et

al., 1982; Cheng e Bardin, 1986; Lee et al., 1986; Hugly et al., 1988; Papadopoulos et al., 1987). Figura I.3.

A produção e secreção de muitos produtos das células de Sertoli podem ser regulados por fatores hormonais, incluindo FSH e testosterona, fatores nutricionais (metabólitos energéticos, metais ou vitaminas) e por interações ambientais (contato das células) (Skinner, 1991). Esta regulação pode ocorrer, especificamente, na transcrição do gen, na translação ou modificações pós-transcricionais.

I.3.MATURAÇÃO TESTICULAR E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI

A utilização de técnicas histológicas específicas tornou possível a caracterização das diferentes fases do desenvolvimento testicular em várias espécies (Courot e Kilgour, 1984). Os tipos celulares precursores das células de Sertoli e das células de Leydig aparecem no início da vida fetal (Gondos, 1977). Acredita-se que as células de Sertoli surjam do blastema gonadal e as de Leydig a partir de células do mesênquima indiferenciado no interstício (Pelliniemi e Dym, 1980). Assim, a diferenciação sexual das gônadas masculinas inicia com a formação dos cordões seminíferos aos 13 dias de gestação no rato (Jost et al., 1981) e aos 42 dias em humanos (Pelliniemi e Dym, 1980). O desenvolvimento pós-natal divide-se em três fases: 1) impúbere, 2) pré-púbere e 3) adulta.

No feto e em testículos impúberes, os túbulos são constituídos por dois tipos celulares: as células de suporte, precursoras das células de Sertoli no adulto, e as células germinativas primordiais ou gonócitos. O número de células de suporte é muito maior que o de células germinativas, existindo mitose nas duas populações. Os receptores para o hormônio luteinizante (LH) são primeiro detectados em testículos de feto de rato aos 15 dias e atingem uma concentração máxima no nascimento (Warren et al., 1984). A ligação do hormônio folículo estimulante (FSH), em testículo de feto de rato aumenta dos 17 dias até o

EFETOR

Insulina

IGF-I

Retinol

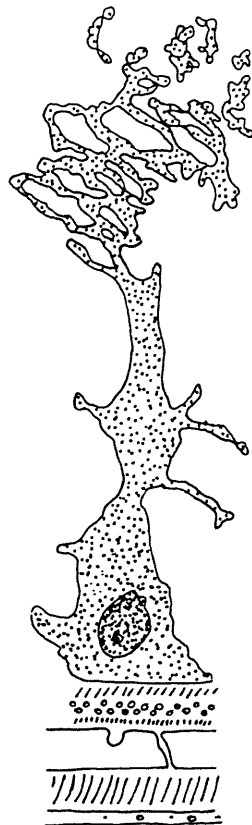
Testosterona

Células Germinativas

dbcAMP

Glucagon

P-Mod-S



PRODUTOS

ABP

Transferrina

Ceruloplasmina

Precursor TGF- β

Hormônio Anti-Mulleriano

Inibina

TGF- α

Fator de crescimento

semelhante a EGF

IGF-I

Fator de crescimento semelhante
a interleucina

Fator de crescimento do túbulo
seminífero

Fator de crescimento da célula
de Leydig

Colágeno tipo IV

Laminina

Glicoproteína sulfatada-I

Glicoproteína sulfatada-II

Testibumina

Testinas

Proteína ligadora de Retinol

Figura I.3. Produtos da Célula de Sertoli e Fatores que Podem Influenciar a sua Secreção.

Reproduzido e modificado de Griswold, 1988.

nascimento o que é atribuído ao aumento do número de receptores para o FSH e conjuntamente com o aumento do número de células de Sertoli. A mitose das células de Sertoli ocorre durante o crescimento dos cordões testiculares (Peliniemi e Dym, 1980), durante o final do período fetal em ratos, sob a influência do FSH (Orth, 1984), é estabilizada no nascimento e declina no início da vida pós-natal (Steinberger e Steinberger, 1971). Em muitos mamíferos, a alta concentração de testosterona plasmática é atingida após o nascimento e rapidamente diminui e permanece baixa até o início da puberdade (Ewing e Zirkin, 1983). Ainda que tenha sido observado uma atrofia na população de células de Leydig durante este período em ratos, a concentração dos receptores de LH permanece constante durante os primeiros cinco dias de vida no rato, mesmo que, a concentração de testosterona intratesticular diminua rapidamente (Lee e Burger, 1983; Warren, 1984).

A fase pré-púbere é caracterizada por um período de rápido crescimento testicular, no início da espermatogênese. A população celular é drasticamente aumentada e os gonócitos se transformam em espermatogônias, iniciando o desenvolvimento das células germinativas.

I.4. CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA

O testículo é um órgão altamente complexo e constituído de múltiplos tipos celulares. Cada um desses tipos celulares está sob o controle de diferentes hormônios e fatores. Devido as múltiplas funções desempenhadas pelo testículo, o cultivo de células de Sertoli tornou-se popular para o estudo das funções específicas dessa célula. Em geral, é observado com as técnicas atuais de isolamento de células de Sertoli que há uma grande perda da sua configuração típica "*in vitro*". Entretanto, as respostas das células de Sertoli em cultura, são um indicativo do potencial genético dessas células, ainda que a expressão fenotípica possa ser alterada pelo ambiente de cultivo (Steinberger et al., 1975 e Tung et al., 1984).

Diferentes métodos para cultura primária de células de Sertoli estão disponíveis na literatura para a escolha conforme os objetivos a serem estudados. Em geral podem ser distinguidos duas principais áreas de interesse.

A primeira área considera a própria célula de Sertoli e diz respeito principalmente com a caracterização de produtos específicos, com o estudo de mecanismos de ação de hormônios e com a regulação da secreção dos produtos da célula de Sertoli. Geralmente são usados sistemas muito simples de incubação com fácil manuseio e fácil análise bioquímica (Steinberger et al., 1975; Oonk et al., 1985). Para esses experimentos é importante que as culturas de células de Sertoli sejam puras ou, com um nível insignificante de contaminação com outros tipos de células testiculares.

Uma outra área de interesse desenvolve sistemas de cultura os quais mais ou menos assemelham-se a certos aspectos "*in vivo*". Para este tipo de estudo tem sido desenvolvido complexos sistemas de cultura usando: a) tecido testicular total; b) fragmentos tubulares; c) matriz; d) sistema de cultura de dois compartimentos; e) túbulos intactos ou f) co-cultura de diferentes tipos celulares (Steinberger, 1964; Hadley et al., 1985; Toppari e Parvinen, 1985; Borland et al., 1986; Byers et al., 1986; Janecki e Steinberger, 1986; Kierszenbaum et al., 1986). Entretanto, o objetivo fundamental dessas técnicas em ambas as áreas é melhorar a qualidade de apreciação do papel das células de Sertoli e de seus produtos na espermatogênese.

I.4.1. Culturas Enriquecidas em Células de Sertoli

O isolamento de células que envolve o tratamento de testículos intactos de ratos imaturos com tripsina e collagenase produz agregados celulares com aproximadamente 90% de células de Sertoli (Tung et al., 1984). Nesse sistema a maioria das células germinativas, após 72 h em cultura não permanecem ligadas as células de Sertoli. As células peritubulares proliferam devido a presença do soro no meio apresentando um índice de contaminação entre 3 e 4% (Guma, 1992). Um duplo tratamento com collagenase dessa preparação modificada por Oonk et al., 1985, obtém-se uma monocamada com 94% de células de Sertoli. Para obter culturas com um número mínimo de células peritubulares Tung et al., 1984 acrescentaram a

um desses procedimentos um tratamento com hialuronidase e obtiveram um rendimento de menos de 1% de células peritubulares após 6 dias de incubação.

A obtenção de cultura de células de Sertoli provenientes de testículos enriquecidos em células de Sertoli ("SCE"), utilizando-se o método convencional com tripsina e colagenase e incubadas as primeiras 24 h com 1% de soro fetal bovino (SFB) a 34°C num total de 72 h, obtém-se uma monocamada com aproximadamente 96 % de células de Sertoli (Dorrington e Fritz 1975; Tung et al., 1984).

A maioria desses sistemas são baseados em cultura primária provenientes de testículos de ratos imaturos, frequentemente até 21 dias. Razões triviais para isto inclui que as células de Sertoli são isoladas com muita facilidade (são predominantes) e, a razão mais convincente é que nesta idade, os testículos estão crescendo e se desenvolvem rapidamente (Mills et al., 1977; Ekwall et al., 1984), além do que as células de Sertoli, no meio de sua fase de maturação pós-natal, são sensíveis ao FSH e vários outros hormônios e fatores (Rich et al., 1983; Oonk e Grootegoed, 1988; Roberts e Griswold, 1989; Perez-Sanches e Wassermann, 1981).

I.5. HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE

As observações de que o homem domesticou os animais através da castração infere que o testículo é um dos primeiros órgãos investigados à nível fisiológico (Bremner, 1981).

A hipófise anterior sintetiza e secreta três hormônios glicoprotéicos com a estrutura da sub-unidade α comum a essas três glicoproteínas hipofisárias. Dois desses, o FSH e o LH são chamados gonadotrofinas e exercem efeitos diferentes sob as gônadas, entretanto, ambos regulam e mantêm os processos reprodutivos essenciais como a gametogênese, esteroidogênese e a ovulação (Chappel et al., 1983). É bem conhecido que a adenohipófise sintetiza e secreta FSH em múltiplas formas isoméricas e que a quantidade relativa bem como a biopotência dessas formas estão sob a influência de variações no meio endócrino (Bogdanove et al, 1974; Robertson et al., 1982).

O hipotálamo, um sistema altamente complexo e integrativo tem um papel fisiológico importante através do controle da secreção do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH, um decapeptídeo hipotalâmico, regula a secreção pulsátil do LH e do FSH pela hipófise. A secreção de FSH e LH é também regulada por um mecanismo de retroalimentação negativo, exercido pelos hormônios produzidos na glândula alvo (Ying, 1988). O desenvolvimento e a função do eixo hipotálamo-hipófise-testículo depende do equilíbrio entre as ações inibitórias e estimulatórias dos produtos secretados pelo hipotálamo, hipófise e gônadas.

O conceito que as proteínas gonadais, além dos esteróides, exercem um papel importante na inibição da secreção de gonadotrofinas da hipófise anterior tem sido largamente investigado. Entretanto, só recentemente a fisiologia e a química desses hormônios gonadais tem sido razoavelmente elucidados (Ying, 1988). As três proteínas ativina, inibina e folistatina regulam a secreção de gonadotrofinas na hipófise. A ativina estimula, enquanto a inibina e a folistatina inibem a secreção de FSH. Figura I.4.

I.6. CÉLULA DE SERTOLI COMO ALVO DO FSH

A iniciação e a manutenção da espermatogênese é dependente do FSH e da testosterona. A regulação do desenvolvimento das células germinativas está fortemente associado as células de Sertoli já que os receptores para o FSH e para a testosterona são encontrados nas superfícies das células de Sertoli (Griswold, 1993) ou dentro delas (Sar et al., 1993). Ainda que existam algumas evidências que os receptores de FSH também residam nas espermatogônias (Orth e Christensen, 1978), atualmente é bem aceito que o efeito do FSH e da testosterona nas células espermatogênicas seja mediado via célula de Sertoli.

Embora seja mais provável que este controle envolva o crescimento, maturação e regulação da síntese de vários produtos de secreção das células de Sertoli, é largamente desconhecido como esses dois hormônios controlam a espermatogênese.

É bem conhecido que o FSH efetua uma variedade de eventos bioquímicos com profundas alterações na fisiologia testicular. Esses eventos iniciam, em ratos imaturos, com a ligação do FSH a receptores específicos na superfície celular (Means et al., 1976).

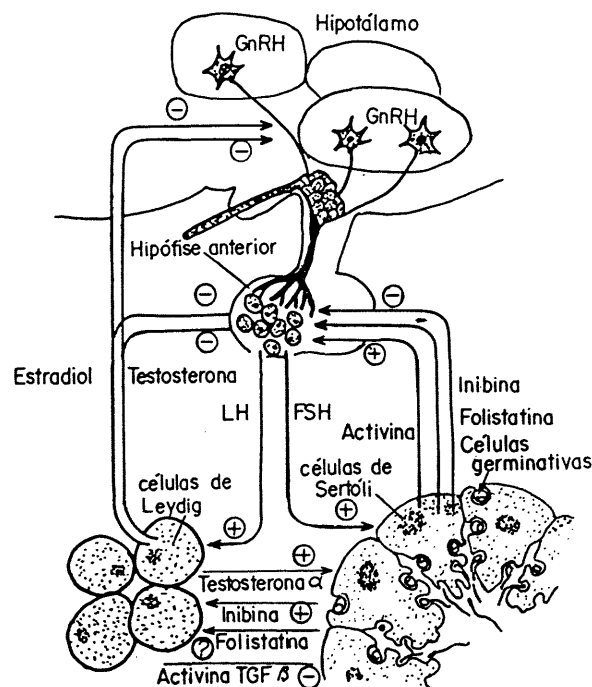


Figura I.4. Resumo Esquemático do Controle Hormonal da Função Testicular
Reproduzido e modificado de Ying, 1988

Efetivamente, o FSH influencia: a regulação do fluxo de cálcio (Grasso et al., 1991; Gorczynska e Handelsman, 1991); a atividade da adenil-ciclase, proteína quinase e fosfodiesterase (Fakunding et al., 1976); síntese de proteínas celulares gerais (ornitina descarboxilase) e específicas (inibina e transferrina) (Fakunding et al., 1976 e Osterman et al., 1983); síntese de glicoproteínas (Bernard e Wassermann, 1982); regula a síntese e secreção do inibidor da proteína quinase, PKI (Tash et al., 1979); da proteína ligadora de andrógeno (Rich et al., 1983); do ativador de plasminogênio (Lacroix et al., 1977); da transferrina (Skinner e Griswold, 1980); da ceruoplasmina (Skinner e Griswold, 1983); e da proteína inibina (Ying, 1988). Outros efeitos gerais do FSH também tem sido demonstrados como, por exemplo: a aromatização da testosterona à 17-β-estradiol

(Dorrington et al., 1978); efeitos sobre a divisão (síntese de DNA e mitose) (Solari e Fritz, 1978); motilidade celular e organização dos microtúbulos e microfilamentos (Marcum et. al., 1978; Dedman et al., 1979), modificações na forma celular (Tung et al., 1993) e comunicação célula-célula através dos complexos juncionais (Skinner et al., 1991). A resposta da célula de Sertoli ao FSH foi observada tanto "*in vivo*" quanto "*in vitro*" (Dorrington e Armstrong, 1979; Fakunding, 1976; Rommerts et al., 1978; DePhilip, 1982; Mather et al., 1982).

Além destes processos acima descritos, tem sido demonstrado o estímulo do transporte de aminoácidos em testículos de ratos adultos hipofisectomizados (Irusta e Wassermann, 1974); testículos inteiros "*SCE*" de ratos imaturos (Perez-Sanches e Wassermann, 1981; Spritzer e Wassermann, 1985;), testículos inteiros de ratos imaturos normais (Cruz Curte e Wassermann, 1985; Wassermann et al. 1989a e Wassermann e Loss, 1989); túbulos seminíferos "*SCE*" (Wassermann et al., 1990 e Wassermann et al, 1992b); e a célula de Sertoli é a única que participa em cada um desses processos, os quais, todos são regulados pelo FSH durante o desenvolvimento e diferenciação desta célula (Means et al., 1980 e Fakunding et al., 1976; Perez-Sanches e Wassermann, 1981).

I.7.MENSAGEIROS INTRACELULARES

Das muitas formas comuns de sinalização, os mensageiros químicos são usados para transmitir a informação de uma célula a outra e, em muitos casos, as proteínas ligadoras de nucleotídeos da guanina (Proteínas G), acoplam receptores a enzimas efetoras desempenhando um papel crítico na resposta celular. Muitas respostas incluem algumas mudanças nas propriedades elétricas das células e dos canais iônicos dos quais derivam estas propriedades elétricas. Até pouco, se pensava que tais mudanças eram mediadas por caminhos citoplasmáticos regulados por enzimas efetoras da proteína G, mas agora está claro que proteínas G acoplam receptores da membrana a canais iônicos por uma via delimitada à membrana. Isto é, o efeito da proteína G pode ser direto, sem o envolvimento de um sistema

de segundo mensageiro, ou indireto, possivelmente através da ativação de uma fosfolipase e eventual fosforilação (reversível) de canais (Birnbaumer et al., 1989).

Os efetores que funcionam sob a regulação das muitas proteínas G incluem a adenil ciclase (AC), a fosfodiesterase GMPc específica (GMPc PDE), as fosfolipases específicas para os polifosfoinositídeos, a fosfolipase C (PLC) e a fosfolipase A₂ (PLA₂) e duas classes de canais iônicos - uma específica para o K⁺ e relativamente independente do potencial de membrana para sua atividade e uma outra específica para o Ca⁺⁺ fortemente dependente do potencial de membrana (Brow e Birnbaumer, 1990). Baseado nisto, as respostas em consequência da ocupação de receptores acoplados a proteína G incluem não somente mudanças nos níveis intracelulares de segundos mensageiros - AMPc, GMPc, inositol trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DG) e ácido araquidônico - mas também variações no potencial de membrana das células, o qual, por si só, é um regulador potente da função celular (Birnbaumer et al., 1989).

Os sinais elétricos que promovem mudanças no potencial de membrana, geram alterações na permeabilidade seletiva da membrana (alteram a condutância), e essas modificações resultam em movimentos iônicos e modificações na carga da membrana (Koester, 1991a). Os movimentos iônicos ocorrem por intermédio da abertura de poros especializados de proteínas intramembranais chamados canais iônicos. Canais como os de Na⁺, K⁺ ou de Ca⁺⁺ podem responder a estímulos elétricos, abrindo ou fechando seus poros ocasionando mudanças despolarizantes ou hiperpolarizantes no potencial de membrana. Nesse caso, os canais são dependentes da voltagem e as membranas são caracterizadas como eletricamente excitáveis (Koester, 1991b).

Outros canais iônicos que não são dependentes da voltagem abrem em resposta a ativação de um receptor de membrana, estes são denominados - canais operados por receptor.

Segundo técnicas eletrofisiológicas os canais de Ca⁺⁺ dependentes da voltagem foram classificados em função da cinética de ativação e inativação, da especificidade iônica e da sensibilidade a determinada faixa de voltagem, em canais do tipo L, N, T e P. O canal do tipo

L é ativado em -10mV, o do tipo N em -30mV, o do tipo T em -70mV e o do tipo P (encontrado em alguns neurônios), são de alto limiar de excitação (Llinas et al., 1989; Spedding e Paoletti, 1992).

Estudos com agentes farmacológicos foram feitos com substâncias que apresentam ações específicas sobre estes canais e, que são conhecidos como antagonistas de Ca^{++} ou bloqueadores de canais de Ca^{++} . Os bloqueadores específicos para canais de Ca^{++} dependentes da voltagem estão presentes em três principais classes de fármacos: 1. Fenilalquilaminas - verapamil e seus derivados; 2. Dihidropiridinas - nifedipina e seus derivados e, 3. Benzodiazepinas - diltiazem (Godfraind et al., 1986; Millard et al., 1983; Triggle e Swami, 1983). Além destes antagonistas podemos citar os íons como: La^{3+} , Co^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} ; que também agem como bloqueadores de cálcio por competirem pelos seus canais (Tan e Tahjian, 1984a; Spedding e Paoletti, 1992).

Vários tipos de canais iônicos são encontrados em membranas plasmáticas de células glandulares. Como por exemplo:

a) Canais de cátions não-seletivos, ativados pelo cálcio - o padrão de abertura e fechamento desses canais independe do potencial de membrana; o canal é seletivo a cátions monovalentes e não discrimina entre o Na^+ e o K^+ . O cálcio necessário para a abertura vem dos reservatórios intracelulares. Estes canais já foram descritos em cultura de células cardíacas de rato e em células acinares pancreáticas de camundongo (Colquhoun et al., 1981; Petersen e Findlay, 1987).

b) Canais seletivos ao K^+ , ativados pelo Ca^{++} - foram obtidas evidências direta da existência desses canais em células exócrinas (Petersen e Findlay, 1987), e em tecidos endócrinos como a hipófise e ilhotas pancreáticas (Wong et al., 1982; Petersen e Findlay, 1987). Esses canais são de alta condutância ao K^+ e a probabilidade de abertura do canal é acentuada pela despolarização da membrana e pela concentração de cálcio intracelular, isto é, uma certa concentração de Ca^{++} intracelular despolariza a célula ativando assim a abertura desses canais

de K^+ com consequente efluxo do K^+ e repolarização da célula (Petersen e Findlay, 1987; Brown e Birnbaumer, 1990).

c) Canais seletivos ao K^+ , sensíveis a ATP - em contraste ao canal de K^+ ativado pelo Ca^{++} , esse canal é insensível a mudanças no potencial de membrana. O canal de K^+ -ATP é extremamente seletivo ao K^+ , e alterações na concentração de cálcio e no pH intracelular não afetam a atividade desse canal (Petersen e Findlay, 1987). A aplicação de ATP à superfície interna da membrana consiste na inibição direta desses canais.

d) Canais Seletivos ao Cálcio - alguns canais de Ca^{++} são dependentes da voltagem e abrem em resposta a uma despolarização ou hiperpolarização da membrana plasmática. São importantes no suprimento de cálcio a vários tipos de células excitáveis como as do músculo e nervos. Também estão presentes em células secretoras (células beta, células GH_4C_1 da hipófise, células da glomerulosa e cromafínicas de adrenal bovina) e, em células não excitáveis como linfócitos e neutrófilos (Hosey e Lazdunski, 1988; Tan e Tashjian, 1984b; Cohen et al., 1988; McCarthy et al. 1990; López et al., 1994). Nessa categoria de canais existem subclasses que diferem quanto à sensibilidade da voltagem e quanto às propriedades cinéticas e farmacológicas. Em uma determinada célula poderá haver um ou mais tipos desses canais de Ca^{++} dependentes da voltagem (Hosey e Lazdunski, 1988; Spedding e Paoletti, 1992).

Uma segunda categoria de canais de Ca^{++} inclui canais que são operados através de mecanismos dependentes do receptor, isto é, canais que são abertos via ativação de um receptor associado. Um aspecto interessante de alguns canais de Ca^{++} , incluindo os canais dependentes da voltagem, é que são regulados por mecanismos adicionais, ou seja, são regulados por proteínas G, que são ativadas pelo receptor (Birnbaumer et al., 1989). A proteína G regula diretamente os canais de Ca^{++} sensíveis a voltagem e a dihidropiridinas (DHP) (Mumby et al., 1988). Diferente dos canais de K^+ , onde para a abertura desses canais é comum o estímulo da proteína G, no caso dos canais de cálcio a abertura é modulada pela

proteína G; a proteína G, entretanto, não é essencial para a abertura desses canais e sim a despolarização da membrana (Brown e Birnbaumer, 1990).

Além disso, alguns canais de Ca^{++} são regulados por eventos reversíveis de fosforilação que ocorrem em resposta a alterações, dependentes do receptor, nos mensageiros intracelulares (Hosey e Lazduski, 1988). Portanto, mesmo que estes canais não sejam necessariamente operados pelo receptor, eles estão sujeitos à regulação por processos dependentes do receptor.

Outros canais ainda não caracterizados em detalhes, para células glandulares, estão sendo assunto de muito interesse. Entre eles: canais aniônicos (Cl^-) em células acinares e canais de Na^+ ativados pela voltagem. No entanto, estudos adicionais com a utilização de técnicas eletrofisiológicas de "*voltage-clamp*", "*patch-clamp*" e a utilização de DNAs das proteínas dos canais, se faz necessário para melhor esclarecer o envolvimento dos canais iônicos no mecanismo de ação de hormônios, vitaminas, secretagogos, neurotransmissores, etc.

I.8. MECANISMO DE AÇÃO DO FSH NA CÉLULA DE SERTOLI

O FSH e a testosterona são essenciais no processo espermatogênico em ratos, entretanto, o mecanismo de ação desses hormônios na espermatogênese ainda não está completamente esclarecido (Arslan et al., 1993). Tem sido descrito que a célula de Sertoli pode ser considerada como a célula alvo para esses hormônios, já que estas, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" contém receptores para FSH e andrógenos (Steinberger, 1971; Steinberger e Steinberger, 1971; Steinberger et al., 1975 e 1978; Mulder et al, 1976).

Os receptores localizados na superfície celular sofrem mudança conformacional ao ligarem-se com substâncias hidrofílicas gerando um sinal intracelular e, como consequência alterando o comportamento da célula alvo. Existem duas vias gerais conhecidas através das quais os receptores da superfície celular podem produzir sinais intracelulares. Uma é a ativação ou a inibição de enzimas ligadas a membrana plasmática que podem catalisar a

produção de um mediador intracelular solúvel que serve como sinal (Brown e Birnbaumer, 1990). O outro caminho é a abertura ou o fechamento de canais iônicos na membrana plasmática os quais podem gerar um sinal também de duas maneiras: 1) Podem causar um pequeno e transitório fluxo de íons que brevemente variam a voltagem na membrana plasmática. Este caminho opera em células eletricamente ativas onde variações no potencial são acompanhadas por mudanças de condutância indicando que a permeabilidade está alterada para vários íons (Brown e Birnbaumer, 1990). 2) Podem causar um maior influxo de íons para o citosol e iniciar uma resposta intracelular. As células não ativadas eletricamente possuem receptores na superfície celular funcionalmente ligados aos canais de cálcio na membrana plasmática; a ligação do ligante ativa esses receptores, abre canais e permite o cálcio entrar no citosol onde funciona como segundo mensageiro (Hosey e Lazdunski, 1988; Brown e Birnbaumer, 1990).

Em ratos imaturos normais, a interação do FSH com receptores na membrana plasmática resulta na ativação da adenil-ciclase, estimulação do acúmulo intracelular de AMPc, ativação da proteína quinase e síntese protéica aumentada (Steinberger et al., 1978). Por outro lado, o FSH também inibe a atividade da fosfodiesterase dependente de AMPc, oferecendo um caminho alternativo para o aumento da concentração intracelular de AMPc (Means et al., 1976). Assim, a regulação destas duas enzimas (AC e fosfodiesterase) resulta num acúmulo intracelular de AMPc com consequente estimulação da proteína quinase dependente de AMPc, a qual fosforila proteínas em virtualmente todos os compartimentos subcelulares (Means et al., 1980) e, aumenta a síntese de proteínas testiculares.

Por outro lado fortes evidências de um grande número de hormônios, secretagogos, fatores de crescimento e muitas substâncias biologicamente ativas parecem mediar a ação hormonal por um mecanismo não relacionado a mudanças intracelulares de AMPc, mas sim, por mudanças no metabolismo do cálcio e de fosfolípidios (Nishizuka et al., 1984).

Foi visto que existem duas vias principais responsáveis pela alteração na concentração de Ca^{++} livre intracelular em resposta a um estímulo: 1) influxo de cálcio, dependente do

aumento da permeabilidade ao cálcio pela membrana plasmática, via abertura de canais e a consequente entrada de cálcio a favor de seu gradiente eletroquímico (Hosey e Lazdunski, 1988) e, 2) liberação de Ca^{++} de reservatórios intracelulares pela $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$ (Berridge, 1984). Atualmente, os sistemas de efluxo de cálcio como a bomba $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$ da membrana plasmática e o sistema bidirecional de troca $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{++}$, estão sendo considerados com maior atenção como importantes reguladores da concentração intracelular de cálcio livre (O'Donnell e Owen, 1994).

A descoberta inicial que os hormônios tem efeito no metabolismo dos fosfoinositídeos foi feita por Hokin e Hokin em 1953 e 1955. Desde então, foi observado que um grande número de hormônios e neurotransmissores que usam cálcio como segundo mensageiro hidrolisam fosfoinositídeo de membrana. Esta perturbação dos fosfolipídios de membrana pode representar um mecanismo fundamental de transdução que inicia uma cascata de sinais resultando na mobilização de cálcio, ativação da proteína quinase C, liberação do ácido araquidônico e estimulação da guanil-ciclase para formar GMPc (Berridge, 1984). O traço característico desse mecanismo é a hidrólise de fosfoinositídeos mediada por receptor para produzir dois mensageiros, o DG e o IP_3 , ambos funcionam como segundo mensageiros intracelulares para iniciar uma cascata de eventos. O IP_3 atua mobilizando cálcio e atua através da calmodulina para fosforilar um grupo específico de proteínas e o DG estimula a fosforilação de um outro grupo de proteínas celulares (Berridge, 1984).

Alguns estudos examinaram o papel do FSH e da proteína G na regulação do turnover dos fosfoinositídeos em cultura de células de Sertoli de ratos imaturos. Esses pesquisadores demonstraram que o FSH não afeta o acúmulo de fosfato inositol nem na presença de fatores conhecidos em potenciar os efeitos do FSH como a testosterona e o ácido retinóico (Quirk, 1988). Complementaram estes resultados o trabalho de Monaco, 1988 que demonstrou que não só o FSH não tem efeito no turnover dos fosfoinositídeos mas, que inibe o acúmulo do inositol fosfato (IP) estimulados por fatores derivados do soro. Já as glicoproteínas estruturalmente relacionadas, LH e gonadotrofina coriônica humana (hCG) aumentam o

acúmulo de fosfato inositol em células da granulosa de ratas (Davis et al., 1986a) e porca (Dimino et al., 1987) e, em células do corpo lúteo bovinas (Davis et al., 1987; Davis et al., 1986b) e que nessas células a mudança na concentração de Ca^{++} interno segue a estimulação do LH (Davis et al., 1986b; Asem et al., 1987).

Numerosos eventos morfológicos e bioquímicos como a mudança na forma, secreção de ABP e produção de 17- β -estradiol em células de Sertoli em cultura são regulados pelo FSH. O AMPc está envolvido como segundo mensageiro da ação do FSH sob esses aspectos. Outros sistemas de transdução de sinais intracelulares, como o cálcio, estão envolvidos (Fritz, 1978 e Bardin et al., 1988) no mecanismo de ação do FSH, entretanto pouco é conhecido sobre os canais de Ca^{++} e os níveis de Ca^{++} citosólico nas células de Sertoli ou sobre o efeito agudo do FSH neste íon chave.

Outros eventos como o influxo de cálcio estimulado por FSH em proteolipossomas e em células de Sertoli em cultura é regulado através da abertura de canais de cálcio independentes da voltagem e por canais ativados pela voltagem regulados pelo receptor de FSH não relacionados a proteína G (Grasso e Reichert, 1989). Em contraste, a síntese de estradiol estimulada por FSH, o fluxo de cálcio para as células de Sertoli em resposta ao FSH não é mediado nem direto nem indiretamente pela toxina colérica (TC) ou toxina pertussis (TP) e, nem requer a ativação da AC mas sim, que o próprio receptor de FSH funcione como um canal de cálcio (Grasso e Reichert, 1990).

Embora investigações anteriores tenham comprometido o cálcio intracelular como intermediário nas mudanças do citoesqueleto (Means et al., 1980) ou no mecanismo de transdução de sinais do FSH (Grasso e Reichert, 1989; Joffre e Roche, 1988), nem os níveis basais de cálcio citosólico nem o efeito do FSH na estimulação da concentração de cálcio citosólico nas células de Sertoli estão completamente esclarecidos.

Estudos mais recentes tem demonstrado a ação do FSH relacionada com o trânsito de cálcio extracelular, bem como, os mecanismos que estabelecem essas alterações (Gorczyńska e Handelsman, 1991; Gorczyńska e Handelsman, 1993). Assim, nesses estudos a ação do

FSH nas células de Sertoli envolve um aumento rápido, específico e sustentado do cálcio citosólico que requer cálcio extracelular. Este aumento intracelular de cálcio foi abolido por bloqueadores de canais de cálcio específicos para DHP (verapamil, nicardipina), canais de cálcio não dependentes da voltagem (rutenium vermelho) e para todos os canais de cálcio (cobalto) inferindo desse modo que a captação de cálcio estimulada por FSH nas células de Sertoli envolva canais de cálcio dependentes da voltagem, independentes da voltagem e canais de cálcio abertos pelo receptor na membrana plasmática (Gorczyńska e Handelsman, 1991).

O mecanismo de transdução dos sinais do FSH é um processo complexo e o desenvolvimento de dados em resposta a essa gonadotrofina sugerem o envolvimento de mais de um segundo mensageiro. Um dos eventos regulados pelo FSH nas células de Sertoli é o transporte de aminoácidos neutros, entretanto, o mecanismo de ação do FSH neste aspecto não está completamente elucidado.

O FSH estimula o transporte de aminoácidos neutros em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos (Irusta e Wassermann, 1974; Perez-Sanches e Wassermann, 1981). Esta ação ocorre através do sistema A de transporte dependente de Na^+ e de energia (Cruz Curte e Wassermann, 1985) e não envolve diretamente o AMPc como segundo mensageiro (Perez-Sanches e Wassermann, 1981). Tem sido demonstrado que a síntese de proteínas e o transporte de aminoácidos podem ser regulados independentemente por diferentes fatores (Spritzer e Wassermann, 1985) e que a integridade funcional dos microtúbulos e da síntese protéica é necessária tanto para o transporte basal de aminoácidos como para a manifestação completa da ação estimulatória do FSH (Wassermann et al., 1989a).

Baseados nestes resultados foi sugerido que o mecanismo de ação do FSH no transporte de aminoácidos seria mediado, pelo menos em parte, por fatores como modificações no potencial de membrana ou mudanças no fluxo de cálcio.

A utilização de bloqueadores de canais lentos de cálcio no transporte basal e no estimulado por FSH, demonstrou o envolvimento do Ca^{++} na ação do FSH na captação de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos. Nessas condições, o verapamil anulou o

efeito estimulatório do FSH no transporte (Wassermann e Loss, 1989). A utilização de técnicas eletrofisiológicas e túbulos seminíferos "SCE" tornou possível registrar os efeitos do FSH em tempos muito curtos no potencial de membrana das células de Sertoli. Esses resultados mostraram um efeito bifásico dependente da dose na membrana das células de Sertoli, caracterizado por uma rápida hiperpolarização seguida de uma despolarização. O efeito despolarizante do hormônio FSH foi prolongado na presença do aminoácido ácido metilaminoisobutírico (α -MeAIB) no meio de incubação e abolido na presença de verapamil (Wassermann et al., 1990 e Wassermann et al., 1992b). Também a quinina, que inibe canais de K^+ dependentes de ATP, aboliu a ação do FSH. Desses resultados foi concluído que em testículos de ratos imaturos o FSH estimula o transporte de aminoácidos através de um mecanismo envolvendo canais de Ca^{++} dependentes da voltagem e canais de K^+ sensitivos ao ATP. Todos os resultados conhecidos da ação do FSH no transporte de aminoácidos em testículos, foram obtidos através de experimentos "in vitro" com testículos inteiros de ratos imaturos, túbulos seminíferos "SCE", testículos enriquecidos em células de Sertoli ou ratos adultos hipofisectomizados. As técnicas até então utilizadas não permitiram o estudo da ação do FSH no transporte de aminoácidos por períodos além de 2 h de tratamento nem a análise do transporte de aminoácidos nas células de Sertoli em tempos imediatos (minutos).

As técnicas utilizadas nestes trabalhos para o estudo da ação do FSH sobre o transporte de aminoácidos, embora simples e eficientes, não tornaram evidente a ação do FSH sobre as células de Sertoli nem as peculiaridades bioquímicas específicas do mecanismo de ação do hormônio (ação imediata e mediata).

I.9..RETINOL

I.9.1. Características Estruturais

A vitamina A, um nutriente lipossolúvel, foi primeiramente descoberta em ovos, leite, manteiga, óleo de fígado de peixes e mais tarde nas plantas na forma de pró-vitamina β -caroteno. Os carotenóides (pró-vitaminas) estão amplamente distribuídos nos vegetais e são convertidos em retinol através de reações enzimáticas específicas na mucosa intestinal e no

fígado. O β -caroteno é simetricamente clivado produzindo duas moléculas de retinol (Lotan, 1980; De Luca, 1977). Figura I.5.A.

O termo *retinóides* é utilizado para uma família de análogos da vitamina A. As substâncias são denominadas trans-vitamina A (álcool) ou trans-retinol, trans-retinal (a forma aldeídica da vitamina A) e, trans-ácido retinóico (ácido da vitamina A). Essas substâncias são produtos da oxidação natural do retinol (Lotan, 1980). Figura I.5.B.

Detalhes importantes em relação a potência relativa dos retinóides sintéticos específicos foram avaliados em vários sistemas de ensaio "*in vivo*" e "*in vitro*". Os principais análogos da vitamina A podem partilhar com o trans-retinol ou trans-ácido retinóico todas ou algumas das atividades biológicas. Alguns análogos são menos tóxicos e mais potentes do que os retinóides que ocorrem naturalmente, enquanto outros são inativos, indicando que existem certos requerimentos estruturais para expressar a atividade biológica (De Luca, 1977).

I.9.2. Aspectos Gerais do Metabolismo da Vitamina A

A vitamina A na dieta encontra-se na forma de retinil-ésteres ou como β -caroteno. Os ésteres são hidrolisados por esterases específicas e o retinol é então absorvido pelas células da mucosa intestinal. Em contraste, o β -caroteno é primeiro absorvido e então enzimaticamente clivado para dar duas 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 de retinol (RBP), produzida pelo fígado. No sangue a RBP circula como um complexo (na proporção de 1:1) com uma outra proteína plasmática, transtirretina (TTR), anteriormente chamada pré-albumina. Desse modo, o retinol é transportado do fígado até os tecidos alvos. A

formação desse complexo (RBP-Transtirretina), reduz a filtração glomerular e o catabolismo renal da RBP (Blaner, 1989).

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). O ácido retinóico é transportado no sangue associado à albumina. Por isso, é possível admitir que análogos sintéticos sejam também transportados associados à albumina.

Davis e Ong, 1992 investigaram em cultura primária de células de Sertoli de ratos imaturos o envolvimento dessas células na síntese e secreção de RBP. Por outro lado, tem sido demonstrado que a debilidade da espermatogênese pode ser revertida "*in vivo*" pelo tratamento com retinol, mas não com ácido retinóico. Entretanto a proteína de ligação celular de ácido retinóico (CRABP), encontra-se em níveis relativamente altos no espermátócito e espermátide, sugerindo uma necessidade do ácido retinóico nessas células.

As células de Sertoli contém pouco CRABP e altos níveis de proteína de ligação celular de retinol CRBP. Uma das hipóteses é que o retinol, do complexo retinol-RBP da circulação, mas não o ácido retinóico, podem penetrar nas células de Sertoli e que o ácido retinóico é então gerado nessas células ou nas células germinativas. Em cultura, essas células podem obter retinol do complexo retinol-RBP, quando ofertado, por um procedimento que não envolve internalização da proteína de ligação do retinol RBP (Shingleton et al, 1989). Os tecidos alvos para o retinol tem receptores onde o retinol e o complexo (retinol-RBP) se ligam especificamente. (Anônimo, 1991). Após esta ligação, em alguns tecidos, todo o complexo retinol-RBP é internalizado ou, somente o retinol entra na célula com a liberação da apo-RBP. Entretanto, o mecanismo de captação de retinol pelas células não está completamente esclarecido. Futterman e Heller, 1972 mostraram que a associação do retinol com a RBP protege o retinol dos processos oxidativos.

Os três retinóides mais comuns (retinol, retinal e ácido retinóico), possuem baixa solubilidade em água em torno de 0,1 μM . Esta solubilidade explica, em parte, resultados

anteriormente obtidos que descreveram 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 intracelular (Szuts e Harosi, 1991).

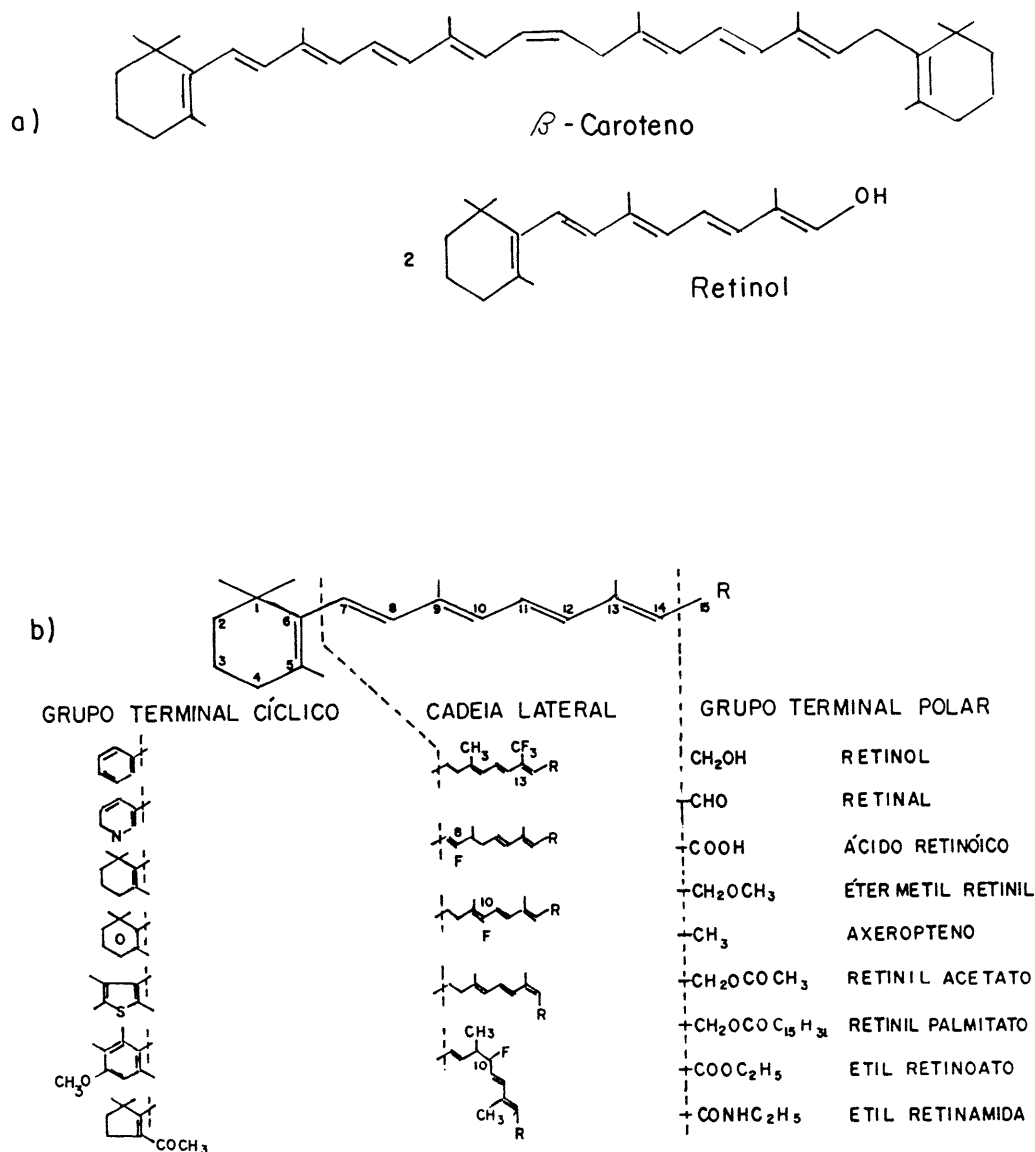


Figura I.5. A) Estrutura Química do Retinol
B) Fórmula Estrutural Básica dos Retinóides e Várias Modificações do Anel, da Cadeia Lateral e do Grupo Polar.
 Modificado de Lotan, 1980.

I.9.3. Captação Celular e Metabolismo do Retinol

Dois mecanismos inteiramente diferentes são propostos para a captação do retinol pelos tecidos do complexo retinol-RBP. Primeiro, muito similar a endocitose mediada pelo receptor, envolve a interação do retinol-RBP com um receptor na superfície celular que reconhece RBP; internalização por endocitose; e degradação do RBP, provavelmente nos lisossomas, com liberação do retinol dentro da célula. O segundo mecanismo, que parece ser único para o retinol, envolve a interação do retinol-RBP com um receptor na superfície celular que reconhece RBP; dissociação do complexo na superfície celular; internalização do retinol, a apo-RBP se dissocia do receptor sem entrar na célula; e possivelmente a volta da apo-RBP para a circulação seguida pela degradação desta no rim.

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. Estes resultados e os de Shingleton et al., 1989 que também estudaram a captação de retinol em culturas de células, sugerem que a ligação do retinol na RBP ou RBP-TTR retarda a velocidade de captação pelas células, em vez de acelerá-la. Esses dados são consistentes com a teoria que o retinol é captado pelas células após sua dissociação da RBP e sua difusão na fase aquosa, postulada por Noy e Xu, 1990.

Após entrar nas células o retinol e o ácido retinóico podem participar de várias reações metabólicas. Figura I.6.

I. 9.4. Aspectos Gerais do Retinol no Testículo

Os retinóides exercem profundos efeitos no crescimento e desenvolvimento celular dos mamíferos, eles podem ter efeitos proliferativos como anti-proliferativos. Suas ações mais conhecidas são desempenhadas predominantemente através de vários subtipos de receptores nucleares. A expressão das isoformas dos subtipos de receptores é específico para células e tecidos na modulação da transcrição do gen (Mao et al., 1993).

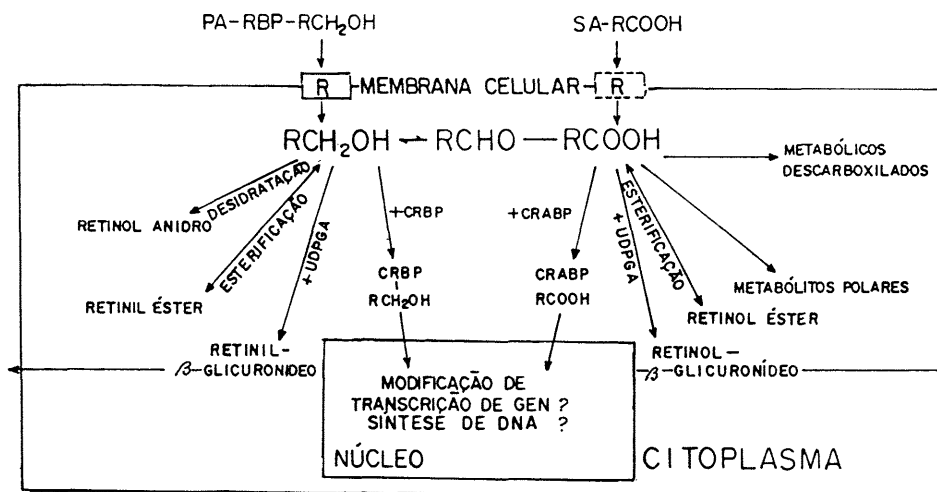


Figura I.6. Representação Esquemática dos Mecanismos de Captação do Retinol e Ácido Retinóico e dos Destinos Intracelulares destas Substâncias em uma Célula de Vertebrados.

Modificado de Lotan, 1980.

PA, pré-albumina; RBP, proteína de ligação do retinol (para transporte plasmático); R, receptor de membrana; SA, soro albumina; CRBP, proteína de ligação do retinol celular; CRABP, proteína de ligação do ácido retinóico celular.

Mais especificamente, a vitamina A na forma de retinol, é essencial para a manutenção da espermatogênese em mamíferos (Thompson et al., 1964; Mitranond et al., 1979). Foram descritos por Mitranond et al., 1979 severas mudanças citológicas nos testículos de animais de 30 dias de idade submetidos à dieta deficiente em vitamina A (VAD). A administração de ácido retinóico em animais VAD restabelece as funções vitais, mas somente o retinol e seus ésteres podem restabelecer plenamente as funções testiculares e a visão (Thompson et al., 1964; Lotan, 1980).

Os múltiplos tipos celulares presentes nos testículos são candidatos em potencial a sítios de ação do retinol. As células de Sertoli são o maior alvo de estudo dos efeitos intracelulares e do mecanismo de ação do retinol no testículo. Nesse órgão, o retinol pode ser encontrado nos macrófagos do tecido intersticial, nas gotas de gorduras das células de Sertoli e associado ao complexo de Golgi nas espermátides. A CRBP, como mencionado anteriormente, encontra-se distribuída tanto no interstício como nos túbulos seminíferos mas, níveis relativamente altos de CRBP e muito baixos em CRABP foram demonstrados nas células de Sertoli (Huggenvik e Griswold, 1981; Porter et al., 1985; Griswold et al, 1989).

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 $3\mu\text{M}$, sugerindo que mudanças nos níveis normais de retinol circulante (aproximadamente $2,0\mu\text{M}$) 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, ou seja, nessas células a captação de retinol envolve o reconhecimento do complexo retinol-RBP pela superfície celular com subsequente internalização do retinol, mas não da RBP (Shingleton et al., 1989).

A queda nos níveis de mRNA da transferrina e da glicoproteína sulfatada 2 (SCM-2) em células de Sertoli de ratos VAD não são restabelecidos pela administração de ácido retinóico, porém, o retinol administrado na dieta restabelece estes mRNA aos níveis normais (Hugly e Griswold, 1987).

No metabolismo das células de Sertoli verifica-se que o retinol é rapidamente captado e esterificado. Porém, alguns autores detectaram também a presença de pequenas quantidades de CRABP além da CRBP já descrita para essas células (Kato et al., 1985; Porter et al., 1985). Isto reforça a hipótese de Napoli e Race, 1987 que as células de Sertoli tem a capacidade de

oxidar retinol a ácido retinóico, apontando a possibilidade do retinol ser captado, oxidado e, assim atuar nos receptores nucleares de ácido retinóico.

A recente descoberta de receptores nucleares para o ácido retinóico nas células de Sertoli e em espermatídes demonstra que o ácido retinóico deve atuar como regulador gênico nestas células (Eskild et al., 1991). Visto isso, os autores postularam o conceito de exclusividade do retinol na manutenção da espermatogênese.

O modelo proposto por Griswold et al., 1989 para o mecanismo de ação do retinol nas células de Sertoli ainda é incompleto e simplista e pouco nos esclarece dos efeitos "per se" do retinol nas células de Sertoli. Figura I.7. O esquema reflete o mecanismo do retinol semelhante aos mecanismos clássicos propostos para os hormônios esteróides e tireoideos.

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. Não está esclarecido, entretanto, o mecanismo pelo qual o retinol é transportado das células de Sertoli para as germinativas. Sabe-se que provavelmente, os retinil-ésteres estejam envolvidos neste processo (Bishop e Griswold, 1987).

I.9.5. As Células de Sertoli como Alvo do Retinol

Como previamente mencionado, a vitamina A é essencial para a função testicular e espermatogênese (Huang et al, 1983). As células de Sertoli respondem diretamente à vitamina A e ao ácido retinóico com um aumento em vários parâmetros funcionais incluindo a produção de transferrina (Skinner e Griswold, 1982; Galdieri e Nístico, 1986.)

Os retinóides parecem atuar nas células de Sertoli através de um receptor de retinóide nuclear que diretamente regula a função das células de Sertoli. Desde os trabalhos de Das et al., 1978 onde observaram que em oviduto de galinha havia receptores nucleares para retinol, que também ligaria retinil-acetato, mas não ácido retinóico, surgiu a questão que o retinol poderia ser chamado de hormônio co-esteróide

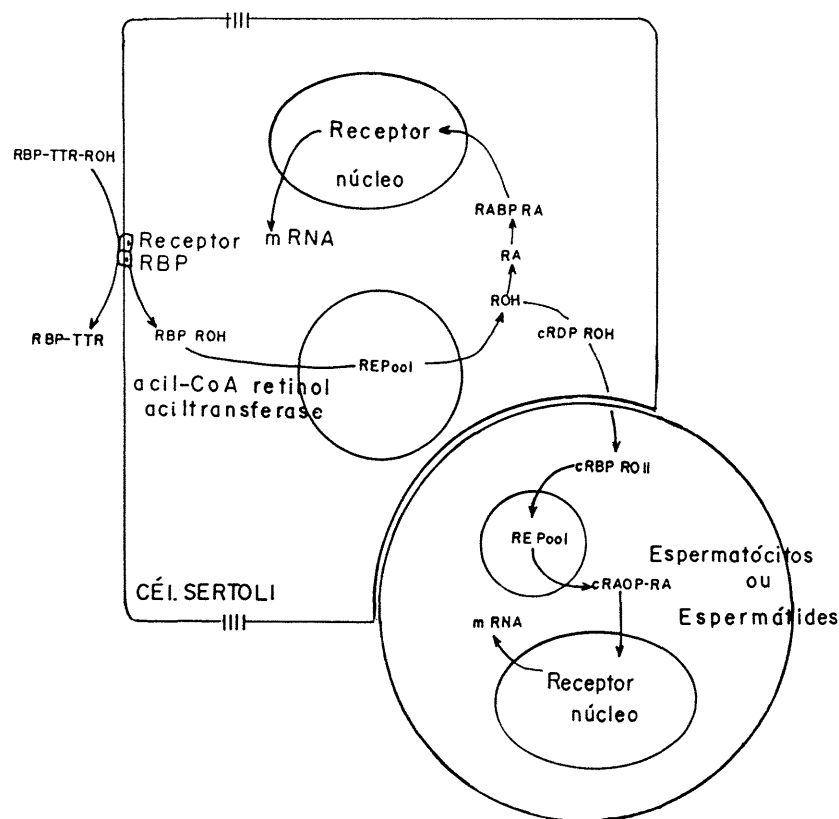


Figura I.7. Mecanismo Proposto para a Ação dos Retinóides nos Túbulos Seminíferos
Retirado e modificado de Griswold et al., 1989.

Atualmente sabe-se com muitos detalhes sobre o mecanismo molecular da ação dos hormônios esteróides. Não menos interessante foi a descoberta que as proteínas receptoras de esteróides são membros de uma família muito grande que incluem: a L-triiodotironina (T_3), vitamina A (ácido retinóico) e vitamina D (1,25-dihidróxiciferol).

Seguidos vinte anos após a identificação de proteínas receptoras específicas, um modelo geral envolvia a entrada dos esteróides nas células através de difusão e combinação com um complexo proteína-receptor citoplasmático específico, o chamado 8S. Três eventos bem definidos então ocorriam incluindo a dissociação do complexo, a dimerização da unidade de ligação do esteróide, o transporte para o núcleo, a ligação ao DNA e a aumentada produção

de mRNA de gens específicos. O modelo correntemente aceitável para o mecanismo molecular de hormônios esteróides é apresentado na Figura I.8. , onde a ligação do ligante leva a dimerização, ligação do DNA e iniciação da transcrição.

Vários aspectos do mecanismo de ação de andrógenos foi discutido por Huttaniemi e Ritzen, 1991. A regulação androgênica da ornitina descarboxilase (ODC) em células renais de camundongo foi medida pelos níveis de proteínas e de mRNA. Em contraste as células renais, o nível testicular do mRNA para o receptor de andrógenos não foi marcadamente afetado pela testosterona ou FSH (Huhtaniemi e Ritzén, 1991). O sistema regulatório específico para o testículo aparentemente não atraiu atenção suficiente, já que não houve especulações sobre o mecanismo (outros além do receptor) que possam explicar a regulação androgênica na espermatogênese.

Duas hipóteses que estão sendo apresentadas são contra a corrente de consenso do mecanismo da testosterona e da dihidrotestosterona (DHT) na modulação das funções sensitivas a andrógenos: 1) A existência de no mínimo duas "proteínas receptoras" para a testosterona e a DHT, que quando complexadas com seu ligante apropriado modulam a transcrição dos gens sensitivos a andrógenos; 2) A existência de proteínas receptoras de andrógenos em certas membranas celulares que modulam a função celular via segundo mensageiros e, como tal, não atuariam diretamente à nível da transcrição dos gens (Sheridan, 1991).

É conhecido que os esteróides também exercerem uma variedade de efeitos, em períodos curtos, no seu órgão alvo. Por exemplo, o cortisol e o estradiol tem efeitos no transporte de cátions mono e divalentes dentro de 1 ou 2 h de tratamento (Bression et al., 1986). Os glicocorticóides são hábeis em inibir enzimas lisossômicas dentro de 20 a 40 minutos e, os estrógenos podem elicitar mudanças eletrofisiológicas em neurônios e células GH₃/B₆ dentro de minutos (Ignarro et al., 1974; Richards e Hesketh, 1975; Dufy et al., 1979).

A modulação pelo estradiol e progesterona dos lactotrófos sensíveis à dopamina (DA) é mais um exemplo que a ação dos esteróides gonadais não envolvem um passo nuclear neste mecanismo (Bression et al., 1985).

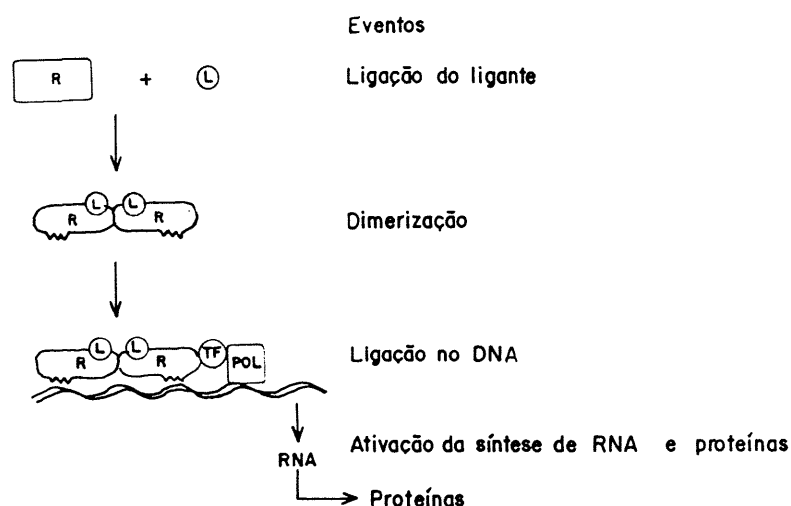


Figura I.8. Visão Geral da Regulação da Transcrição Mediada pelo Receptor.

R, receptor; L, ligante; TF, fator de transcrição; POL, RNA polimerase II.

Adaptado de King, 1992.

O mecanismo básico pelo qual os hormônios da tireóide exercem seus efeitos metabólicos não é bem conhecido, ainda que o papel desses hormônios no crescimento e no metabolismo esteja amplamente documentado (Hoch et al., 1974). Vários investigadores tem sugerido que os efeitos dos hormônios da tireóide é devido a interação destes com receptores nucleares. Ademais, tem sido mostrado que alguns efeitos da L-triiodotironina estejam diretamente relacionados a sua ocupação nuclear e ao seu período de ligação no núcleo (Segal

e Gordon, 1977). Estes autores também demonstraram que em células do coração de embrião de pinto em cultura o T_3 aumentou a taxa de captação de 2-deóxi-D [1- 3H] glicose (DOG) e que, em parte, esta estimulação foi insensível a actinomicina D, puromicina, ciclo-heximida e a hidróxiuréia sugerindo que o T_3 tem outros sítios de ação além do núcleo. É provável que outros componentes celulares liguem o T_3 especificamente em receptores na superfície celular.

Em trabalhos posteriores de Segal et al., 1989 eles propuseram que em timócitos de rato o T_3 atue à nível da membrana plasmática aumentando a atividade da AC, a elevação da concentração de AMPc e a captação de 2-deóxi-glicose (DOG). Todos esses efeitos do T_3 requerem cálcio extracelular com um consequente aumento de cálcio citoplasmático livre. Essa captação de cálcio estimulada por T_3 quase que imediata é o efeito mais rápido do T_3 neste e em outros sistemas (Segal e Ingbar, 1984, Segal et al., 1985; Segal, 1988). Portanto, os autores inferem que a regulação do metabolismo do cálcio pelo T_3 esteja associada com a ativação da Ca^{++} -ATPase da membrana plasmática, o regulador chave da concentração de Ca^{++} celular (Segal et al., 1989).

Um aspecto muito interessante é a atividade que o retinol exerce em vários processos testiculares. Muitos deles, nas células de Sertoli, também são regulados pela ação do FSH como: a síntese do PKI, do ativador de plasminogênio, da inibina e da transferrina.

Vários estudos tem demonstrado que tanto o ácido retinóico como o retinol exercem potentes efeitos na diferenciação celular e que esses efeitos, frequentemente, não estão relacionados. Eskild et al., 1991 entretanto, não descartaram a possibilidade da existência nas células de Sertoli de um receptor nuclear específico para o retinol, responsável pelos efeitos da vitamina A no controle da espermatogênese.

Nos estudos para receptores de retinóides foi encontrada uma alta homologia com os receptores de hormônios esteróides e tireoideos. Figura I.9.

Essa semelhança dos receptores surpreende devido as diferenças estruturais existentes entre os hormônios tireoideos (derivados da tirosina), dos retinóides (derivados do ácido mevalônico) e dos esteróides (derivados do colesterol). A observação de que moléculas

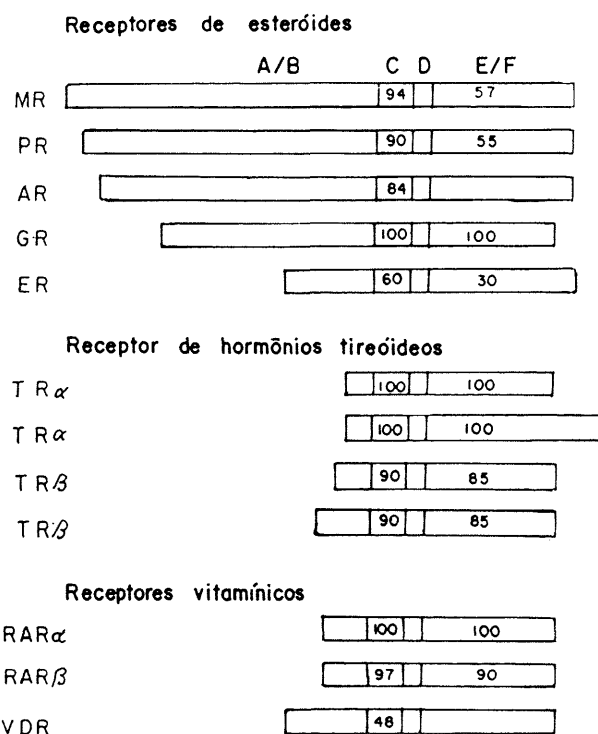


Figura I.9. Homologia entre os Membros da Família de Receptores Nucleares.

Os números dentro do E/F, onde se liga o esteróide e em C, domínio de ligação do DNA, indicam a percentagem de homologia. Os membros de cada família foram arranjados em grupos. Dentro de cada grupo, um receptor foi arbitrariamente designado a um valor de 100%. (GR; TR α ; RAR α). Por comparação dos domínios de ligação do DNA entre os grupos, se GR= 100%, TR β = 44% e RAR α = 46%. Os receptores são específicos para MR, mineralocorticóides; PR, progestinas; AR, andrógenos; GR, glicocorticóides; ER, estrógenos; TR, hormônios da tireóide; RAR, ácido retinóico; VDR, vitamina D.

Reproduzido de King, 1992.

quimicamente distintas possam interagir em receptores com estruturas análogas devem 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 gens 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; Petrovich et al., 1987; Darmon, 1990; 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 e dos carotenóides presentes na dieta (Darmon, 1990). A existência de uma família de gens 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, como por exemplo, o retinol. A existência de CRBP e a sua importância para muitas células epiteliais, como as germinativas nos testículos que degeneram mesmo em presença de ácido retinóico garantem, segundo alguns autores, a validade desta hipótese.

Algumas das ações do ácido retinóico sobre o genoma, descritas por Wolf, 1990 estão representadas na Figura I.10.

A estimulação em sinergismo com o T_3 , da transcrição do gen do hormônio de crescimento em cultura de células hipofisárias, provavelmente ocorre pela atuação cooperativa da proteína receptora do T_3 (T_3R) e do receptor de ácido retinóico (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.

A interação entre os receptores do ácido retinóico e dos hormônios da tireóide levaram Glass et al., 1989 a postular a possibilidade de interação também com outros membros da superfamília dos hormônios esteróides, resultando um novo padrão de regulação gênica. A existência de cofatores nucleares que mediarão as ações de substâncias (ativando ou inibindo) que atuam através de receptores da superfamília dos esteróides (hormônios

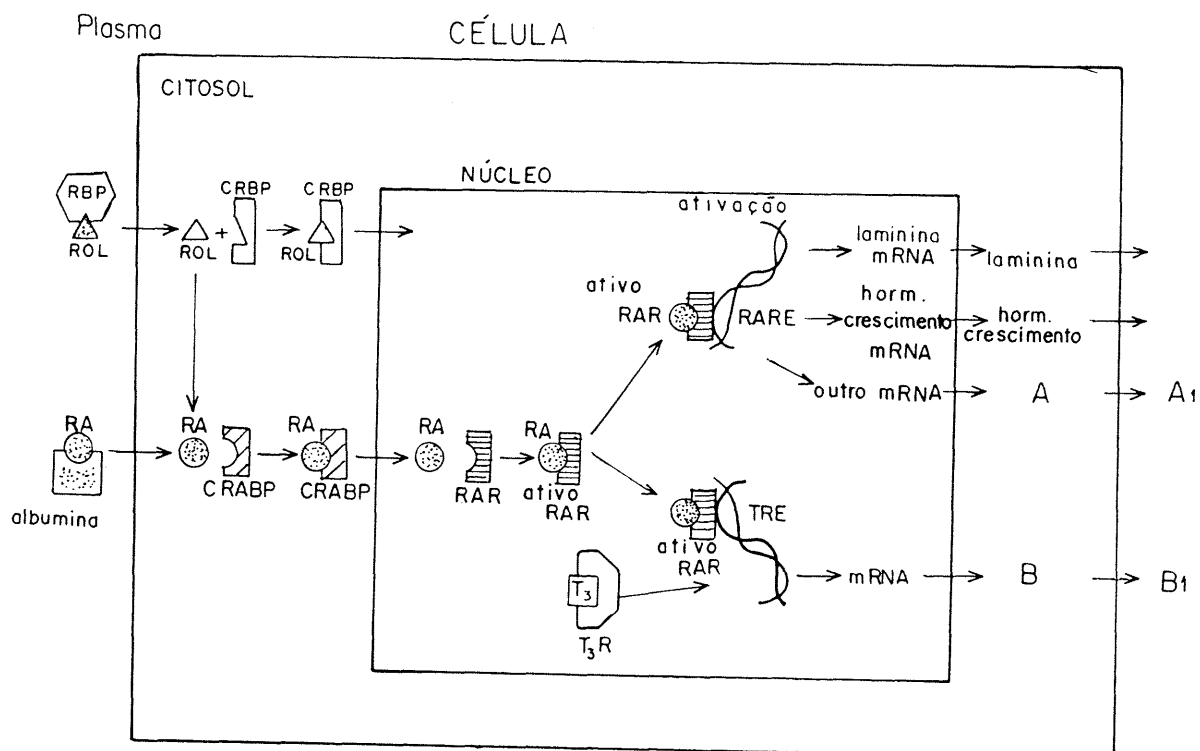


Figura I.10. Diagrama Esquemático de Algumas das Ações do Ácido Retinóico sobre o Genoma.

RBP, proteína plasmática ligadora de retinol; Rol, retinol; RA, ácido retinóico; CRBP, proteína plasmática ligadora de RA; RAR, receptor para RA; RARE, elemento responsivo ao ácido retinóico (parte da região promotora do gen que aumenta a transcrição após a ligação de RA-RAR); T_3 , tiroxina; TRE, elemento responsivo ao T_3 ; T_3 R, receptor para tiroxina. A, outras proteínas responsíveis ao RA; A₁ resposta biológica alterada; B, proteínas responsíveis aos hormônios da tireóide; B₁, resposta metabólica alterada.

Retirado de Wolf, 1990.

esteróides, tireoideos e retinóides) levanta a possibilidade da existência de um controle que determinaria a hierarquia da resposta celular a vários ligantes (Hashimoto, 1991).

A idéia de que nem todas as ações dos esteróides são mediadas através de receptores nucleares clássicos foi também discutida em dois artigos recentes (Nemere e Norman, 1991; Sheridan, 1991). Desses e de outros artigos é também claro que ações na superfície celular não estão limitados aos esteróides mas que outros compostos que atuam predominantemente no núcleo como a vitamina D₃ e a tiroxina podem também exercer importantes efeitos biológicos na periferia da membrana celular (Nemere e Norman, 1991; Segal, 1990).

I.10. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

Muitos sistemas celulares requerem, como etapa inicial de seu metabolismo, o reconhecimento específico e a ligação de moléculas biologicamente ativas. As macromoléculas, geralmente proteínas, responsáveis por este processo de reconhecimento, são denominadas receptores. Em geral, a ligação ao receptor é seguida de uma modificação conformacional induzida na proteína receptora, podendo resultar em ativação ou inibição de determinada atividade enzimática, com consequentes mudanças no metabolismo celular. Em alguns casos, a ligação de uma molécula na membrana plasmática é seguida de sua transferência ou transporte para o outro lado da membrana ou de uma abertura de canais, através dos quais podem migrar outras moléculas (Alberts et al., 1994).

A membrana plasmática é relativamente impermeável a substâncias hidrofílicas, tais como, íons e diversos metabólitos, fornecendo uma barreira de permeabilidade seletiva. Os mecanismos pelos quais estes materiais são transportados através das membranas extracelulares ou intracelulares são, geralmente, denominados **processos de transporte**.

Os solutos podem atravessar as membranas através de sistemas, os quais podem ser mediados ou não. O transporte não mediado é a simples difusão do soluto através da membrana, ao longo de seu gradiente de concentração. O transporte mediado só pode ser efetuado por proteínas capazes de se ligar reversivelmente aos substratos específicos, estas moléculas transportadoras receberam denominações como sistemas de transporte,

transportadores, carregadores, translocases ou permeases e este tipo de transporte foi classificado em várias classes.

Difusão facilitada - Um composto pode atravessar a membrana por um mecanismo que não exige o suprimento explícito de energia.

Transporte ativo - É o processo mediante o qual uma molécula atravessa a membrana contra o seu gradiente de concentração ou, no caso de íons, contra o seu gradiente eletroquímico. A energia necessária para suprir o gasto energético que ocorre neste tipo de transporte pode ser gerada da hidrólise simultânea do ATP (atividade da ATPase) ou de outro composto de alta energia, presente na superfície da proteína, que está servindo de transportador, tal processo é conhecido como transporte ativo primário e bombas. O transporte de um metabólito pode estar acoplado ao movimento simultâneo de uma segunda substância, que está se deslocando contra o seu gradiente de concentração. Esta segunda substância pode deslocar-se na mesma direção da primeira (co-transporte) ou em direção oposta (antitransporte), este processo é denominado transporte ativo secundário ou acoplado a gradiente (Alberts et al., 1994).

Nos últimos anos, tem crescido o interesse em elucidar os mecanismos de transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e esclarecer alguns aspectos cinéticos destes processos adotados por aminoácidos individuais.

Os tecidos animais possuem uma significativa concentração de aminoácidos intracelulares e esta concentração é mantida através de um processo ativo de captação. Em tecidos animais, bem como em microorganismos, os níveis intracelulares de muitos aminoácidos são regulados de maneira a atender as necessidades nutricionais da célula (Shotwell et al, 1983). O processo molecular do transporte de aminoácidos em células animais parece ser mais complexo do que a simples sequência da ligação, translocação e dissociação entre o substrato e o carregador ao nível da membrana, incluindo mecanismos regulatórios os quais adaptam a eficiência do transporte às necessidades da maquinaria intracelular (Guidotti et al., 1974).

Os eventos essenciais, para mediar a transferência do soluto através da membrana citoplasmática podem ser aceitos como compostos por 3 etapas: a) ligação do soluto de um lado da membrana, b) translocação através da membrana e, c) liberação do soluto do outro lado da membrana (Guidotti et al, 1978). Geralmente, o substrato de um lado da membrana pode afetar o fluxo de um outro substrato de duas maneiras:

a) **Na mesma direção**, pela competição de sítios receptores do carregador (cis-inibição) ou pela estimulação cooperativa do transporte (cis-estimulação) ou;

b) **Em direção oposta**, aumentando a disponibilidade de sítios receptores na própria orientação (trans-estimulação), ou reduzindo a disponibilidade de sítios receptores livres nas duas superfícies da membrana (trans-inibição) (Guidotti et al., 1978).

Muitos estudos tem revelado que existem vários sistemas de transporte cuja reatividade ao substrato, em geral parece ser semelhante entre os tecidos animais, ainda que existam algumas diferenças observadas em tecidos especializados (Christensen, 1975). O reconhecimento do substrato pelo sítio receptor de vários sistemas é frequentemente incompleto e as exigências estruturais para a aceitação de aminoácidos são pequenas. Como consequência, uma espécie de aminoácidos pode ser transportada por 2 ou 3 sistemas aparentemente independentes (Christensen, 1975).

I.10.1. Sistemas de Transporte para Aminoácidos Neutros

Os principais sistemas conhecidos que participam no transporte de aminoácidos neutros são os sistemas "A", "ASC" e "L".

As características estruturais comuns da preferência de substratos do sistema "A" e "L" levaram Christensen, em 1955, a projetar e sintetizar aminoácidos análogos aos aminoácidos naturais, com as características importantes de não serem metabolizados por células eucarióticas e serem restritos a entrada de aminoácidos possivelmente por um só sistema de transporte. A captação de aminoácidos naturais e modelos é realizada através de distintos sistemas de transporte, os quais diferem entre si por reagirem especificamente com diferentes

substratos. A partir daí, a medida da captação de aminoácidos pôde ser feita com maior margem de segurança e a investigação do transporte de aminoácidos através da membrana sofreu um grande avanço.

O análogo ácido α -metilaminoisobutírico (α -MeAIB) é usado como substrato específico para o sistema "A" e o análogo cicloleucina (cLeu) é empregado para o sistema "L". O ácido α -aminoisobutírico (α -AIB) frequentemente é usado como substrato modelo para o sistema "A", mas, sua captação pode ocorrer por múltiplos sistemas de transporte em vários tipos celulares, não devendo ser identificado somente como substrato para o sistema "A" (Shotwell et al., 1981; Bass et al., 1981; Kilberg et al., 1979; Le Cam e Freychet, 1977). Para o estudo da atividade do sistema "ASC", têm sido usados seus substratos preferenciais, alanina, serina e cisteína, no entanto, não há um aminoácido modelo específico para o estudo deste sistema (Shotwell et al., 1983).

I.10.2. Sistema "A"

Este sistema exhibe ampla reatividade para aminoácidos neutros com cadeia lateral curta, polar ou linear. Transporta preferencialmente alanina, mas também apresenta estereoespecificidade para os aminoácidos prolina, serina, glicina, metionina e para os aminoácidos modelos α -AIB, α -MeAIB e cLeu (Christensen, 1969; Guidotti et al., 1978).

O sistema "A" é dependente de sódio (Oxender e Christensen, 1963) e é energizado, pelo menos em parte, pelo gradiente eletroquímico do sódio (Christensen et al., 1973). Sua principal característica é funcionar somente por transporte ativo e ser um sistema sensível a hormônios, é muito sensível a mudanças extracelulares de pH e a inibidores metabólicos, tolera grupamentos N-metilados, o que o diferencia do sistema "ASC" e "L". A captação de aminoácidos pelo sistema "A" está frequentemente sujeita a trans-inibição por substratos intracelulares deste sistema (Shotwell et al., 1983). O sistema de transporte de aminoácidos correspondente ao sistema "A" foi descrito em uma ampla variedade de tipos celulares animais, incluindo células de aves e mamíferos (Guidotti et al., 1978), mas não é atuante em

eritrócitos, e reticulócitos (Christensen, 1969). Estudos com diafragma de rato (Riggs e McKirahan, 1973), células do coração de embrião de pinto (Guidotti et al., 1974; Elsas et al., 1975) e hepatócito de rato (Guidotti et al., 1974) indicam que a insulina afeta predominantemente ou inteiramente a atividade do sistema "A" de transporte. Em fígado perfundido de rato (Chambers et al., 1968), em fatias de fígado de rato (Tews et al., 1970) e em hepatócito isolado de rato (Le Cam e Freychet, 1976), o glucagon intensifica a captação de aminoácidos e este efeito hormonal parece estar restrito ao sistema "A" de transporte em tecido hepático. Experimentos com hepatócito isolado demonstraram que o estímulo no transporte de aminoácidos em resposta a catecolaminas mostrou-se restrito ao sistema "A" (Le Cam e Freychet, 1978). Cruz Curte e Wassermann, em 1985, observaram que em testículos de ratos imaturos o FSH estimula o transporte de aminoácidos neutros exclusivamente através de regulação efetuada sobre o sistema "A" de transporte. Em experimentos com glândulas adrenais de rato e de boi foi demonstrado que a captação de aminoácidos neutros regulados pela insulina dá-se, preferencialmente, através do sistema "A" de transporte (Wassermann et al., 1989b; Fauth et al., 1991).

I.10.3. Sistema "ASC"

É restrito a um grupo menor de aminoácidos, transporta preferencialmente alanina, serina e cisteína e exibe alta estereoespecificidade no reconhecimento da cadeia lateral dos aminoácidos (Eavenson e Christensen, 1967). É sódio dependente, mas é menos sensível do que o sistema "A" em mudar sua atividade diante de variações de pH no meio extracelular e frente a inibidores metabólicos (Christensen et al., 1967). Uma das características que o diferencia do sistema "A" é a sua não tolerância à N-metilação de alguns aminoácidos (Christensen, 1969). Este sistema possui a habilidade de ser trans-estimulado por aminoácidos intracelulares. Christensen, trabalhando com células tumorais (Ehrlich), observou que a estereoespecificidade do sistema "ASC" era maior para a saída do que para a entrada de aminoácidos, sugerindo que a alta estereoespecificidade deste sistema pode, em algumas

situações, mediar mais a liberação do que a captação de aminoácidos. Este sistema foi primeiro descrito em células de Ehrlich, por Christensen et al., 1967, como um segundo sistema de transporte dependente de sódio, o qual participa em diferentes tipos celulares, expressando-se quantitativamente de maneira variável e, geralmente, pouco representativa.

O sistema "ASC" foi demonstrado, em alguns experimentos como sendo o sistema por excelência em reticulócito de coelho (Winter e Christensen, 1965), em reticulócito de pombo (Eavenson e Christensen, 1967), em hepatócito de rato (Edmonson et al., 1979), em cultura de fibroblasto humano (Gazzola et al., 1980; Franchi-Gazzola et al., 1982) e em células de ovário de hamster chinês (Shotwell et al, 1981; Bass et al., 1981).

I.10.4. Sistema "L"

Apresenta reatividade para aminoácidos com cadeia lateral ramificada ou com anel aromático. Transporta preferencialmente leucina, mas também apresenta estereoespecificidade para os aminoácidos valina, fenilalanina, metionina e para o aminoácido modelo cicloleucina (cLeu). Entretanto, quase todos os aminoácidos neutros são transportados por este sistema em maior ou menor extensão, mesmo quando estes são substratos preferenciais de outros sistemas de transporte, por exemplo, a metionina, a qual é ativamente transportada pelo sistema "A", é também um excelente substrato para o sistema "L" (Christensen, 1975). É um sistema independente de sódio e esta é uma característica notável que o diferencia do sistema "A" e "ASC" (Christensen, 1975; McGivan et al., 1977). Este sistema diminui a seletividade para o transporte quando há uma diminuição no pH extracelular, exibe forte propriedade de troca, havendo um consistente fluxo por trans-estimulação para dentro e para fora da célula, o que provavelmente ocorre nesse sistema na presença de aminoácidos endógenos ou exógenos, com quantidades adequadas de material apolar na cadeia lateral (Harrison e Christensen, 1975; Mattheus e Zand, 1977). Entretanto, o sistema "L" não é puramente um sistema de troca, pois pode induzir à concentração de aminoácidos no interior da célula, através de um transporte que pode ser intenso e inequívoco (Christensen et al., 1974; Christensen, 1973).

O transporte de aminoácidos correspondente ao sistema "L" já foi descrito em vários tecidos como em ovário de hamster chinês, em cultura primária de hepatócito de rato (Moore et al., 1977; Shotwell et al., 1982)e, em ilhotas pancreáticas isoladas de rato (Prentki e Renold, 1983). Este sistema e o sistema "A" já foram descritos numa ampla variedade de tecidos animais, incluindo células de aves e mamíferos (Guidotti et al., 1978).

I.10.5. Regulação Hormonal do Transporte de Aminoácidos

Em experimentos "*in vitro*" vários fatores podem modificar as concentrações de aminoácidos que entram nas células para serem armazenados ou metabolizados. Entre estes fatores podem ser citados: variações de pH e temperatura, variações na concentração de aminoácidos no meio de incubação, variações iônicas, o uso de drogas e/ou adição de hormônios, a idade do animal, o período de pré-incubação, incubação, etc. Esses fatores podem variar a atividade do transporte e, em alguns casos, têm ação específica sobre um determinado sistema de transporte.

Wassermann et al., 1992a, observaram que um período de pré-incubação seria necessário para detectar o efeito do FSH sobre o transporte de aminoácidos neutros em testículos "*SCE*" de ratos imaturos. Baseados nesse fato, importantes aspectos foram estudados, como: o tempo de exposição com o hormônio, a dose de FSH, o efeito de inibidores da síntese protéica e glicoprotéica, inibidores microtubulares e o efeito de bloqueadores de canais de cálcio e, foi observado que:

- a) A ação estimulatória do FSH no transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos, num tempo imediato (2 h), não depende da integridade dos microtúbulos ou da síntese "*de novo*" de proteínas. Entretanto, a resposta testicular completa ao hormônio depende da síntese protéica ativa e da integridade funcional dos microtúbulos.
- b) O bloqueio dos canais de cálcio dependentes da voltagem anula a ação estimulatória do FSH.

Nestas condições experimentais o período de pré-incubação é fundamental independente da presença ou não do hormônio e, doses tão responsivas quanto 2,0 mU/ml exibem claramente a ação imediata do hormônio neste fenômeno.

Tem sido demonstrado que a ação do FSH é influenciada pela idade do animal. Perez-Sanches e Wassermann, 1981 observaram que o FSH estimulou a captação de aminoácidos em ratos de 10, 15 e 20 dias de idade e aos 5 e 25 dias de idade este efeito não foi observado. Estudos realizados nesta área tem evidenciado que tanto a captação basal como a estimulada pelo FSH variam significativamente e, ao atingir a maturidade, o FSH não induz nenhum efeito estimulatório sobre o transporte de aminoácidos em testículos de ratos e camundongos (Irusta e Wassermann, 1974; Ozza et al., 1982).

O uso de algumas drogas empregadas em muitos estudos, tais como inibidores da síntese protéica, como a puromicina ou ciclo-heximida, bloqueadores da síntese de RNA, como a actinomicina D, tunicamicina, a qual inibe a glicosilação de glicoproteínas, inibidores da polimerização dos microtúbulos pela colchicina e bloqueadores de canais iônicos em geral, alteram a concentração intracelular de aminoácidos, o qual pode afetar a atividade do sistema "A". Essas variações intracelulares devem ser consideradas para o estudo da regulação do transporte (Shotwell et al., 1983).

Alguns trabalhos demonstraram que o T_3 aumentou a captação dos aminoácidos não metabolizáveis α -aminoisobutírico (AIB) e ciclileucina (cLeu) em timócito isolado de rato. O efeito do T_3 na captação destes aminoácidos foi rápido e não foi inibido pelo tratamento das células com ciclo-heximida (Goldfine et al., 1975). Por outro lado, o T_3 também mostrou um efeito estimulatório na captação de 2-deóxi-glicose em células do coração de embrião de pinto em cultura. Neste parâmetro o T_3 elicitou sua ação através de um evento envolvendo duas fases. Nas primeiras 6 h de incubação com o hormônio a ação estimulatória sob a captação de DOG não foi alterada em células previamente tratadas com actinomicina D, puromicina e ciclo-heximida. Entretanto, entre às 6 e 24 h estes agentes preveniram o estímulo da captação de DOG em culturas tratadas com T_3 (Segal e Gordon, 1977).

Em vários tecidos a estimulação do transporte de aminoácidos mostrou-se independente da síntese protéica pela insensibilidade a inibidores ou por uma indução muito rápida, como para envolver a síntese "*de novo*" de proteínas, como exemplo, o efeito da insulina no tecido mamário de camundongo (Lobitz e Neville, 1977). Entretanto, nos estudos de Edmonson et al., 1980 o período inicial de 15 a 30 minutos de estimulação pelo glucagon não foi alterado pelo tratamento com ciclo-heximida, visto que o aumento na atividade do transporte depois de 30 minutos foi abolido por este inibidor.

Irusta e Wassermann em 1974, estudaram a ação da ciclo-heximida na captação de α -AIB- ^{14}C em testículos de ratos imaturos (21 dias) e adultos (90 dias), pré-incubados "*in vitro*", com ciclo-heximida durante 1 hora, numa concentração a qual inibiu a síntese protéica e observaram que esta substância era efetiva em bloquear parcialmente tanto a captação basal de α -AIB- ^{14}C como a estimulada pelo FSH. Além disso, Perez-Sanches e Wassermann em 1981, verificaram o efeito da tunicamicina sobre a ação do FSH em testículos enriquecidos em células de Sertoli, em ratos de 17 dias de idade e observaram que inibindo a síntese de glicoproteínas com tunicamicina havia uma diminuição na captação de α -AIB- ^{14}C , tanto nos grupos controles como nos grupos tratados com FSH. Também, Bernard e Wassermann, 1982 observaram que a administração "*in vivo*" de FSH causava um aumento "*in vitro*" da incorporação de glicose, D-glicosamina ou D-manose nas glicoproteínas de testículo de ratos normais ou enriquecidos em células de Sertoli e que este efeito era bloqueado pela pré-incubação dos testículos com tunicamicina.

Outros hormônios como, por exemplo, a prolactina (PRL) aumentam a captação de α -AIB- ^{14}C através de um mecanismo que requer a síntese de RNA e de proteínas. A adição de puomicina, ciclo-heximida e actinomicina D aboliram a resposta da PRL no transporte de aminoácidos em explante de glândula mamária de camundongo (Rillema et al., 1992).

Vários estudos tem proporcionado abundantes informações sobre o efeito de hormônios no transporte de aminoácidos em células e tecidos. Os organismos superiores requerem um controle regulatório adicional do transporte de aminoácidos para ajustar o fluxo

de nutrientes entre os diferentes tipos celulares e, a regulação por hormônios é um dos mecanismos pelos quais o fluxo de nutrientes pode ser coordenado. (Shotweel et al., 1983).

Numerosos trabalhos já publicados com referência à regulação hormonal sobre o transporte de aminoácidos, usando vários tipos de células evidenciaram uma correlação entre o estímulo da captação de aminoácidos pelo hormônio e um simultâneo aumento na síntese macromolecular, na produção de energia ou na divisão celular. Por outro lado, o transporte também pode ser inibido pelo hormônio, como no caso da inibição da captação de aminoácidos pelo tecido muscular na presença de hormônios glicocorticóides (Wool, 1960; Kostyo e Schimdt, 1963).

Na superfície externa da membrana plasmática estão localizados os receptores para hormônios peptídicos e catecolaminas. Como primeiro passo, os hormônios ligam-se a receptores específicos, interagindo com a sua célula alvo. Para muitos hormônios peptídicos, o passo seguinte da ligação hormônio-receptor envolve pelo menos um caminho comum intracelular, usando AMPc ou GMPc e possivelmente Ca^{++} como mensageiro intracelular. Para outros hormônios peptídicos a identidade do(s) mensageiro(s) intracelular(es) ainda não é conhecida em sua totalidade (Guidotti et al., 1978; Wassermann et al., 1992 a e b).

Os efeitos hormonais no transporte de aminoácidos representam, de algum modo, processos moleculares, os quais diferem em natureza, mecanismo de ação, sítio e tipo celular. A insulina tem efeito estimulatório na captação de aminoácidos o que já foi observado em várias preparações biológicas, como por exemplo, linfócito de timo de rato e útero de rata imatura (Guidotti et al., 1976; Goldfine et al., 1972), fibroblasto e músculo liso de rato (Guidotti et al., 1976; Hollenberg, 1976), fígado perfundido, hepatócito e cultura de células de hepatoma (Kleitzien et al., 1976).

Perez-Sanches e Wassermann, 1981, trabalhando com testículos "SCE", com animais de 15 dias de idade, observaram que adicionando a toxina da cólera "*in vitro*", a qual produziu um aumento nos níveis de AMPc intracelular, a captação de α -AIB- ^{14}C não foi modificada. Em outros tratamentos estes mesmos autores adicionaram AMPc ou metil isobutilxantina (MIX)

"*in vitro*" e também não observaram um efeito significativo na captação de α -AIB- ^{14}C , sugerindo que possivelmente não exista relação entre os níveis de AMPc e variações no transporte de aminoácidos estimulados pelo FSH. Resultados similares já haviam sido observados por Irusta e Wassermann em 1974 utilizando DBAMPc.

A insulina e o glucagon estimulam o transporte de aminoácidos numa variedade de sistemas celulares por um mecanismo o qual envolve a síntese protéica ativa (Lerner, 1985). Também, o estímulo no transporte de aminoácidos mediado por catecolaminas em hepatócito isolado de rato pôde ser inibido por ciclo-heximida, sugerindo que a síntese de proteínas é necessária para a sua expressão (Le Cam e Freychet, 1978).

Também tem sido demonstrado que hormônios com ação nuclear clássica como o hormônio da tireóide estimulam o transporte de aminoácidos por um mecanismo independente da síntese protéica, mas, o transporte de DOG estimulado por esses hormônios demonstrou um perfil bifásico: um inicial independente da síntese protéica e um efeito tardio (após 6 h) dependente da síntese de novos carregadores (Goldfine et al., 1975; Segal e Gordon, 1977).

Os hormônios esteróides como a testosterona tem demonstrado exercerem efeitos biológicos através da ligação direta em componentes na membrana plasmática, estimulando a captação de aminoácidos não metabolizáveis, a captação de deóxi-glicose (DOG) e a endocitose (Koenig et al., 1982 e 1989). A regulação desses processos de membrana envolve alterações no fluxo de cálcio, bem como, na concentração endógena de poliaminas.

Para estudar os detalhes do mecanismo de ação de hormônios no transporte de aminoácidos, tem sido utilizados aminoácidos não metabolizáveis (α -MeAIB- ^{14}C , α -AIB- ^{14}C) e, inibidores metabólicos como a puromicina, ciclo-heximida e actinomicina D. Entretanto as múltiplas ações hormonais expressadas por efeitos monofásicos ou dual ainda são assuntos para muitas investigações.

I.11. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho apresentado nessa tese foi: a) esclarecer alguns aspectos do mecanismo de ação do hormônio folículo estimulante no transporte de aminoácidos neutros em cultura primária de células de Sertoli obtidas de testículos imaturos "SCE" ; b) Estudar o mecanismo de ação da vitamina A, retinol, no transporte de aminoácidos neutros em testículos "SCE" e em cultura de células de Sertoli de ratos imaturos. Neste contexto, essa tese faz parte de uma linha de pesquisa com as hipóteses de trabalho abaixo esquematizadas.

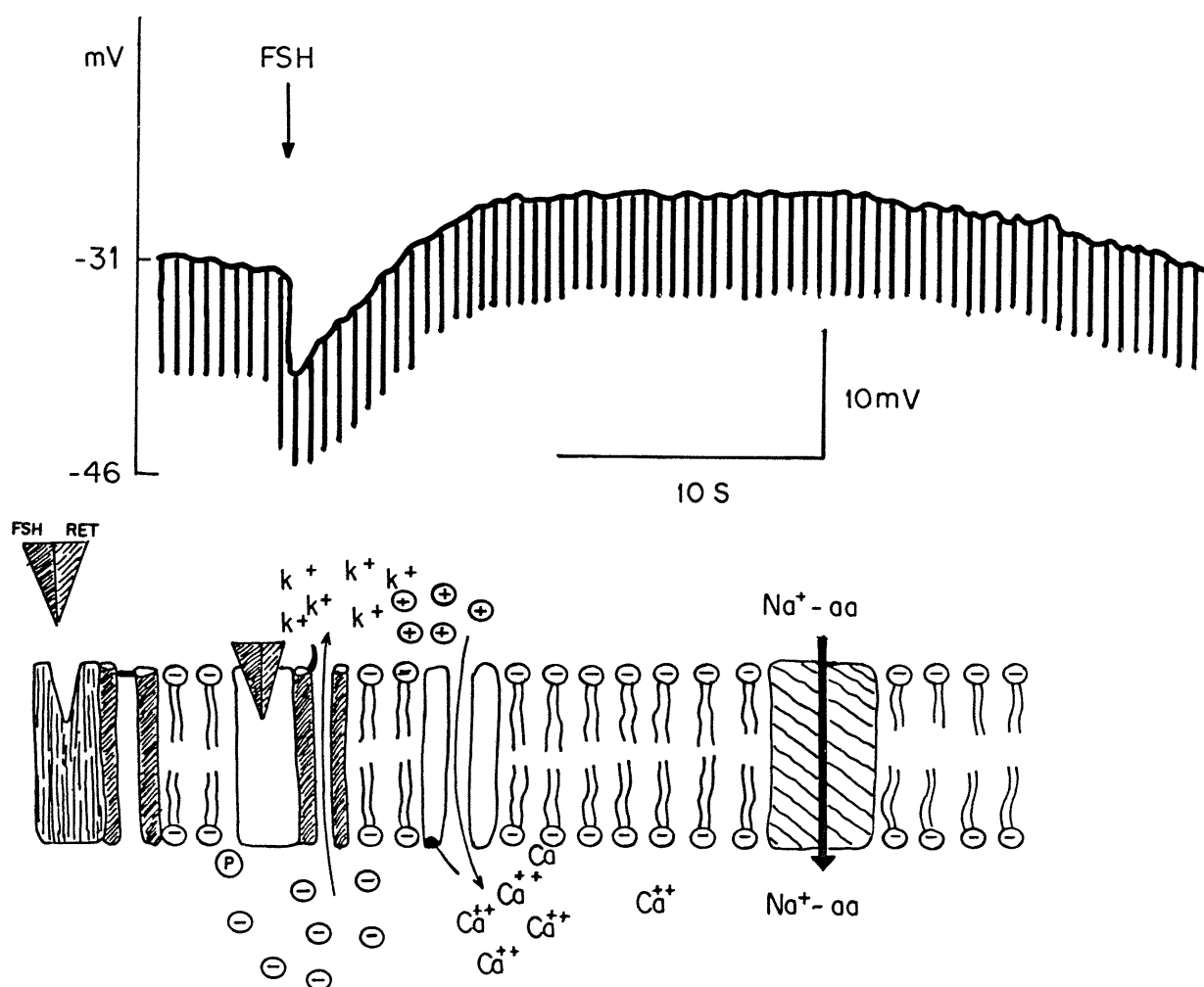


Figura I.11. Representação Esquemática da Hipótese do Mecanismo de Ação do FSH e do Retinol no Transporte de Aminoácidos Neutros.

O FSH liga-se ao receptor na membrana plasmática, abre possivelmente canais de K^+ sensíveis ao ATP e produz uma hiperpolarização. Este fenômeno causa a abertura de canais de Ca^{++} de baixa voltagem e inicia o processo de despolarização, provavelmente, o Ca^{++} ativa o co-transporte Na^+ -aminoácidos ou a troca Na^+ - Ca^{++} . (Resultados eletrofisiológicos extraídos de Wassermann et al., 1992 b).

A ação do retinol no transporte de aminoácidos ocorre por um mecanismo semelhante ao do FSH.

Conforme exposto no capítulo I, o FSH e o retinol possuem relevante função testicular durante o desenvolvimento e maturação sexual. Devido a importância desses agentes na regulação das funções metabólicas (transporte de aminoácidos e síntese protéica), os objetivos específicos dessa tese são:

- 1) Correlacionar o perfil de estímulo do FSH de diferentes espécies e origens no transporte de aminoácidos.
- 2) Analisar a ação mediata do FSH.
- 3) Investigar o efeito do retinol no transporte de aminoácidos neutros.
- 4) Caracterizar o sistema de transporte de aminoácidos regulado por retinol.
- 5) Analisar o efeito imediato do retinol no transporte de aminoácidos.
- 6) Investigar a ação do retinol na síntese protéica.
- 7) Correlacionar os parâmetros transporte de aminoácidos e síntese protéica regulados por retinol.
- 8) Analisar o efeito sinérgico do retinol e FSH no transporte de aminoácidos.
- 9) Analisar o efeito bifásico do retinol no transporte de aminoácidos.
- 10) Investigar o efeito do retinol no transporte de aminoácidos durante o período de maturação sexual.
- 11) Correlacionar o efeito da testosterona e retinol no transporte de aminoácidos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. MATERIAIS

II.1.1. Soluções Salinas e Meio de Cultura Utilizados

II.1.1.1. Solução Salina Tamponada (BSS)

Utilizada no preparo da collagenase, do inibidor de tripsina, da solução saturada de α -MeAIB (20 mM), para lavagem das células durante a digestão enzimática e, para a incubação com os aminoácidos marcados (MeAIB- ^{14}C e Leucina -U- ^{14}C).

Tabela II.1. Composição da salina tamponada (BSS)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,29 mM
KCl	5,36 mM
KH_2PO_4	1,10 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,65 mM
NaCl	136,90 mM
Na_2HPO_4	0,27 mM
Glicose	6,10 mM
Vermelho de fenol	$7,05 \times 10^{-5}$ mM
Água ultra pura	q.s.p. 1000 ml
pH	7,4

II.1.1.2. Solução Salina Tamponada sem Ca^{++} e Mg^{++} (CMF-BSS).

Utilizada no preparo da solução de tripsina

O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eram substituídos por 0,70 mM de Na_2SO_4 e o pH da solução de tripsina era acertado em 7,8 com NaOH 1N.

Tabela II. 2. Composição da salina tamponada CMF-BSS

NaCl	136,9 mM
KCl	5,36 mM
Na ₂ HPO ₄	0,27 mM
KH ₂ PO ₄	1,10 mM
Glicose	6,10 mM
Na ₂ SO ₄	0,70 mM
Água ultra pura	q.s.p. 1000 ml

II.1.1. 3. Meio de Cultura

Foi utilizado para a cultura de células o meio 199 com sais de Hank's (Sigma). O pH do meio era acertado em 7,6 com NaOH 1N ou HCl 1N.

II.1.1. 4. a) Tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb)

Foi utilizado como meio de incubação dos testículos inteiros "SCE" o tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb), pH 7,4, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. O preparo da solução foi feito a partir das seguintes soluções estoques:

Tabela II. 3. Soluções estoque para o preparo do KRb

NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM
CaCl ₂ .H ₂ O	2,50 mM
KH ₂ .PO ₄	1,19 mM
Mg.SO ₄ .H ₂ O	0,76 mM
NaHCO ₃	25,0 mM

No preparo da solução tampão, foram colocados 2 ml de cada solução estoque, acrescentando-se o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio por último e completando o volume com 40 ml de água destilada. Quando se desejava um volume maior da solução tampão, multiplicava-se a adição dos componentes por um mesmo valor. Logo após, a solução

era gaseificada com carbogênio (O_2 : CO_2 , 95:5, v/v) até que o pH atingisse o valor 7,4 o que era confirmado em pH-metro. A solução assim obtida era mantida em uma caixa de isopor com gelo durante a preparação do experimento.

A tabela a seguir apresenta as concentrações iônicas obtidas no final da preparação de KRb e os valores encontrados nos líquidos extra e intracelulares (Long, 1961).

Tabela II. 4. Concentrações iônicas do KRb, líquido intra e extracelular.

Meio mEq/l	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	HCO ₃ ⁻	HPO ₄	Cl ⁻	SO ₄ ⁻
Extracelular	140-145	4 -5	2,5	1,5	27	1,0	100	-
Intracelular	10	145-150	2,0	4,0	8	65-70	5-20	-
KRb	146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127	1,2

Nos experimentos que foram utilizados Co⁺⁺ ou Ni⁺⁺ a solução de cloreto de cálcio foi substituída por igual volume de H₂O destilada.

b) Tampão Hipossódico

Esta solução foi similarmente preparada como a solução tampão KRb, excetuando-se que o NaCl não foi adicionado obtendo-se uma solução com 25 mM de sódio no meio. O NaCl foi substituído por cloreto de colina (Merck) numa concentração de $3,08 \times 10^9$ mM (43g/ 100 ml), desta solução foram pipetados 2 ml, assim como de cada uma das demais soluções estoque e preparadas de acordo com o descrito acima para o KRb (Spritzer e Wassermann, 1985).

II.1.1. 5.Meio Bacteriológico - Caldo de carne simples

Foi utilizado para o controle de esterilidade de todas as soluções. Alíquotas das soluções estéreis eram semeadas em caldo de carne para cultura bacteriana 48 horas antes do uso.

Tabela II. 5. Composição do caldo de carne simples

Água de carne	1000 ml
Peptona	10 g
NaCl	5 g

Após a dissolução com soda 10 % até virar o tornassol a solução era autoclavada, filtrada e ajustado o pH entre 7,4-7,6 com NaOH 1N. Após uma segunda autoclavagem foi distribuída em frascos estéreis e armazenada a 5° C negativos (Pelczar et al., 1980).

II.1.2. Enzimas

- Tripsina 1/250 (Difco, Detroit, MICH, USA). Esta substância era pesada e dissolvida em solução salina tamponada sem cálcio e magnésio (CMF-BSS), de modo a obter-se uma concentração final de 2,5 mg/ml (24 U/mg). A seguir, esta solução era filtrada em atmosfera estéril e armazenada a 20 °C negativos até o momento do uso.
- Inibidor de Tripsina (de soja) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Esta substância era preparada em solução salina tamponada (BSS), numa concentração de 0,15 mg/ml (24 U/mg) em atmosfera estéril e armazenada a menos 20° C até o momento do uso.
- Colagenase tipo I A (Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO, USA). A colagenase era pesada, dissolvida em BSS até atingir a concentração de 1,0 mg/ml (174 U/mg), filtrada e estocada a menos 20° C até o momento da dispersão celular.
- Peptona (Difco, Detroit, MICH, USA). Utilizada na preparação do "caldo de carne simples" para o controle de esterilidade.

II.1.3. Hormônios

II.1.3.1. Hormônio Folículo Estimulante (FSH), de distintas origens e purezas, era previamente dissolvido em meio 199 ou em solução salina tamponada conforme o experimento empregado, e adicionado ao meio de incubação de forma a obter-se a

concentração final desejada (0,025; 0,05; 0,1; 0,2 ou 0,4 mU/ml). Foram utilizados os seguintes hormônios:

- FSH de hipófise de ovinos (Sigma), atividade específica 10 U/mg.
- FSH de hipófise de ovinos (NIADDK-oFSH-17), atividade específica 20 U/mg,
- FSH de hipófise de suínos (NIADDK-pFSH-B-1), atividade específica 2 U/mg,
- FSH de hipófise de ratos (NIAMDD-rFSH-B-2)

II.1.3.2. Propionato de Testosterona - Testolipan (laboratório Organol), adquirido em farmácia comercial. O testolipan foi diluído em óleo de milho e injetado intra-peritonal (2 mg/Kg), 48 h antes do experimento. O propionato de testosterona que era diluído em etanol foi utilizado na concentração de 4 μ M para a incubação "*in vitro*" de testículos "SCE". Uma solução de 2 μ M de propionato de testosterona foi utilizado no tratamento crônico e agudo em culturas de células de Sertoli.

II.1.3.3. Hormônio Luteinizante (LH) - Adquirido do National Institute of Health (NIH), extraído de hipófise de equinos, era previamente pesado e diluído em solução salina tamponada (BSS). Foi utilizado nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mU/ml durante o período de incubação com o aminoácido marcado conforme ilustrado no capítulo dos resultados.

II.1.4 . Retinol

O all-*trans*-retinol (Sigma) era pesado em condições adequadas e diluído em etanol imediatamente antes de ser utilizado. As soluções de incubação com retinol não tinham mais do que 0,1 % de etanol. O meio 199 contém em sua composição 0,5 μ M de retinol o que foi considerado nas concentrações utilizadas.

II.1.5. Soro Fetal Bovino (SFB) - Testado para micoplasma (LB - Laborclin - Produtos para laboratório Ltda.).

Adicionado ao meio de cultura na concentração de 1% e imediatamente esterilizado por filtração à pressão (filtros de 50 mm de diâmetro com membranas de acetato de 0,22 μm).

II.1.6. Outras Substâncias - Sulfato de níquel, cloreto de cobalto, ciclo-heximida, ouabaína e ácido α -metilaminoisobutírico foram adquiridos da Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA.

Sulfato de gentamicina [20 mg/l] laboratório Schering-Plough, adquirida diretamente de farmácias comerciais, era rotineiramente adicionada a todas as soluções de enzimas, salinas e meio de cultura, antes da esterilização das soluções.

Todos os demais reagentes eram de pureza "pró-análise" (PA).

II.1.7. Substâncias Radioativas

Foram utilizados dois aminoácidos marcados com ^{14}C . O ácido α -metilaminoisobutírico [$1\text{-}^{14}\text{C}$], $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$, com atividade específica de 50 mCi/mmol e o aminoácido leucina [$\text{U-}^{14}\text{C}$], com atividade específica de 311 mCi/mmol. Ambos aminoácidos marcados foram obtidos da Du Pont NEN Research Products e, sempre foram usados na concentração de 0,1 ou 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ (ver em resultados). Foram adicionados no meio imediatamente antes do início da incubação, tanto nos grupos controles como nos tratados, para a medida do transporte de aminoácidos e síntese protéica, respectivamente.

II.1.8. Soluções de Cintilação

Para a contagem da radioatividade das alíquotas contendo uma fase aquosa, utilizou-se o líquido de cintilação Aquasol, preparado conforme descrito abaixo.

Tabela II.6. Composição do Aquasol.

Tolueno	1000 ml
Triton X-100	500 ml
PPO	0,25 g
POPOP	8,25 g

O PPO (2,5-difenil-oxazole) e o POPOP (1,4 di) -5-fenil-2-oxazolil-benzeno foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. O tolueno e o triton X-100 foram adquiridos da Merck.

II.1.9. Esterilização de Materiais

Todo o material de vidro utilizado nas culturas de células era lavado com Extran neutro (Merck), enxaguado com água da torneira e imerso sete vezes em água desionizada e duas vezes em água bidestilada de vidro. Após, o material era envolvido em papel alumínio e esterilizado por autoclavagem a 120° C e 1 atm. por 20 minutos e, posteriormente, mantido em estufa seca a 140° C por 5 horas. O material plástico, gaze e os filtros com membranas eram autoclavados por 20 minutos a 120° C e 1 atm. O material cirúrgico era esterilizado em estufa seca a 140° C por 5 horas.

II.1.10. Esterilização de Soluções

Grandes volumes de salina, enzimas e meio de cultura eram esterilizados com filtros de 45 mm de diâmetro, à pressão, e membranas de 0,22 µm (Millipore). A esterilidade de todas as soluções era testada, por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana 48 horas antes do uso.

O meio de cultura, soluções salinas, soluções de enzimas e todas as soluções utilizadas em cultura (NaOH 1N, HCl 1N, etc.) eram preparadas com água ultra pura (Milli-Q), filtrada imediatamente antes do preparo das soluções.

II.1.11. Equipamentos

Relação dos equipamentos utilizados neste trabalho:

- Capela de Fluxo Laminar (Trox Série FLV-Classe I)

Todos os procedimentos que requeriam condições estéreis eram realizados na capela de fluxo laminar.

- Incubador (Nuaire)

Para a manutenção das células em cultura, foi utilizado um incubador equipado com controle de temperatura e entrada de CO₂ (5%) (AGA S/A). O incubador mantinha um ambiente úmido e temperatura de 34° C.

- Medidor de pH (Modelo DMPH-3 Digimed)

Para a verificação e ajuste do pH de todas as soluções, calibrado no momento do uso.

- Incubador (Fanem modelo 145)

Este aparelho, equipado com sistema de agitação e termostato, era utilizado para a incubação das células de Sertoli em cultura ou dos testículos inteiros com o aminoácido marcado conforme descrito em cada experimento.

- Balança Eletrônica (AE 163 Mettler)

Utilizada para a pesagem de hormônios e todas as substâncias que exigiam maior precisão na pesagem

- Balança Eletrônica (B160 Micronal)

Utilizada para pesagem das gônadas e todas as substâncias das quais eram preparadas as soluções no laboratório.

- Microscópio Invertido com Contraste de Fase (Nikon)

Utilizou-se um microscópio invertido para a monitorização constante das culturas celulares.

- Microscópio Ótico (Olimpus)

Foi utilizado um microscópio ótico para a contagem das células em hemocítômetro imediatamente antes da semeadura e para a monitorização das lâminas preparadas a partir de testículos normais e irradiados o que permitia o controle da efetividade da irradiação.

- Banho Maria (Fanem modelo 100)

Utilizado para a manutenção do meio de cultura, salinas e enzimas a uma temperatura de 34° C, durante a dispersão celular.

- Centrífuga (Fanem modelo 206)

Utilizada no processo de obtenção de células de Sertoli durante a digestão enzimática.

- Estufa (Fabbe-Primar modelo 246)

Para a esterilização a seco era utilizada uma estufa com capacidade de aquecimento até 200° C.

- Sonicador (Sonicator XL 2020)

O sonicador foi utilizado para o rompimento das células de Sertoli após serem coletadas das placas de cultura.

- Espectrofotômetro (DME-21 Digimed)

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro com capacidade de leitura até 700 nm.

- Espectrômetro de Cintilação (LKB modelo 1209 - Rack-Beta)

Foi utilizado um espectrômetro de cintilação líquida com eficiência de 85 a 90 % para a contagem da radioatividade.

II.2. MÉTODOS

II.2.1. Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 15, 30 e 35 dias de idade (cepa do IB-UFRGS). Para o controle da idade considerou-se como o primeiro dia de vida o dia seguinte ao do nascimento. Os animais imaturos, ainda em fase de aleitamento, eram mantidos juntamente com suas mães, em gaiolas plásticas até o momento do experimento. Os animais

eram submetidos a um ciclo normal claro/escuro (luzes acesas das 7 às 19 horas), com ração padronizada e água "*ad libitum*".

Utilizaram-se nos vários experimentos, testículos enriquecidos em células de Sertoli "*SCE*" de ratos de 15, 30 e 35 dias de idade (ver legenda dos gráficos no capítulo dos resultados) e/ou cultura de células de Sertoli obtidas de testículos "*SCE*" de ratos imaturos (15 dias de idade).

II.2.2. Obtenção de Ratos com Testículos Enriquecidos em Células de Sertoli "*SCE*"

Vinte ratas Wistar de 60 dias de idade eram separadas quatro a quatro em gaiolas próximas a uma com dez ratos de 90 dias de idade durante uma semana. Após este tempo útil na sincronização do ciclo sexual foi realizado o acasalamento, colocando-se dois machos em cada gaiola com quatro fêmeas durante três dias. A partir daí efetuou-se o controle da gestação, sendo considerado o seu início o segundo dia de acasalamento, mais ou menos um dia.

Para a obtenção de testículos enriquecidos em células de Sertoli "*SCE*", procedeu-se à irradiação dos fetos "*in útero*". As ratas mães, entre o 19º e o 21º dia de gestação, foram irradiadas com 100 rads de uma fonte de ^{60}Co por 3 minutos (Perez-Sanches e Wassermann, 1981). Esta irradiação provoca a degeneração dos gonócitos e não afeta as células de Sertoli e as de Leydig (Means et al. , 1976). Através deste processo, obtinha-se ratos com testículos enriquecidos em células de Sertoli "*SCE*", pois são desprovidas das células germinativas.

II.2.3. Controle Histológico dos Procedimentos de Irradiação

Para determinar a efetividade da irradiação tomaram-se testículos ao acaso de ratos de várias idades que foram fixados por imersão em líquido de Bouin. As gônadas foram lavadas várias vezes com álcool 70%, desidratadas em soluções crescentes de álcool (96 a 99%) e clareadas em clorofórmio. A obtenção de um bloco de parafina contendo a gônada procedeu-se pelos subsequentes banhos de parafina 58 - 60 °C (Merck) por 30 minutos. Efetuaram-se,

então, cortes transversais seriados de 10 µm em micrótomo tipo Minot (Leitz). Após a montagem dos cortes em lâminas, estas foram secadas em estufas a 37 °C durante 24 horas (Romeis, 1928). Este material, foi então utilizado para a realização das técnicas de Hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico - Schiff (PAS) (Romeis, 1928; Pearse, 1968). Figura II.1.A,B.

II.2.4. A) MÉTODOS UTILIZADOS PARA OS EXPERIMENTOS REALIZADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

II.2.4.1. Isolamento de Túbulos Seminíferos "SCE" e Obtenção de Células de Sertoli

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos imaturos "SCE" , de acordo com o método descrito por Dorrington e Fritz, 1975. com algumas pequenas modificações (Tung et al., 1984). Figura II.2.

Os animais foram mortos com éter, lavados com sabão líquido e banhados em álcool iodado. Os testículos foram retirados em condições estéreis (capela de fluxo laminar), dissecados da túnica albugínea e fragmentados com bisturi. A dissociação enzimática, dos fragmentos testiculares, com tripsina e colagenase eram acompanhadas de agitação e, durante as trocas de soluções entre um procedimento e outro eram aspiradas com pipetas Pasteur para ajudar a liberação das células. Ao final desse tratamento enzimático, a preparação de células resultante foi lavada três vezes com BSS, usando-se uma pipeta Pasteur para ressuspender e dispersar os agregados. Após, as células foram suspensas em um volume conhecido de meio de cultura.

Uma alíquota de suspensão celular foi retirada para a determinação quantitativa por contagem em hemocitômetro com azul de tripan, processo pelo qual pode-se estimar a quantidade e a viabilidade celular para a cultura.

Sendo as culturas de células de Sertoli primária, os experimentos eram realizados em cultura de células isoladas obtidas de uma ou mais ninhadas de ratos Wistar de 15 dias de idade.

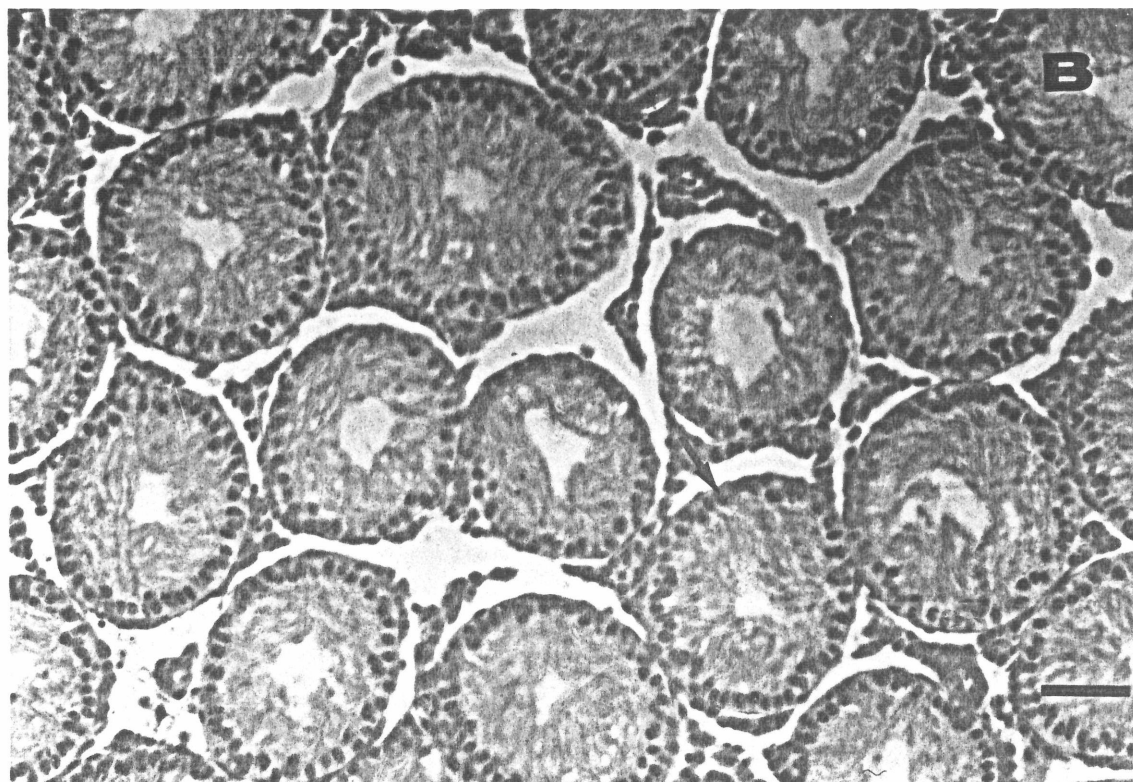
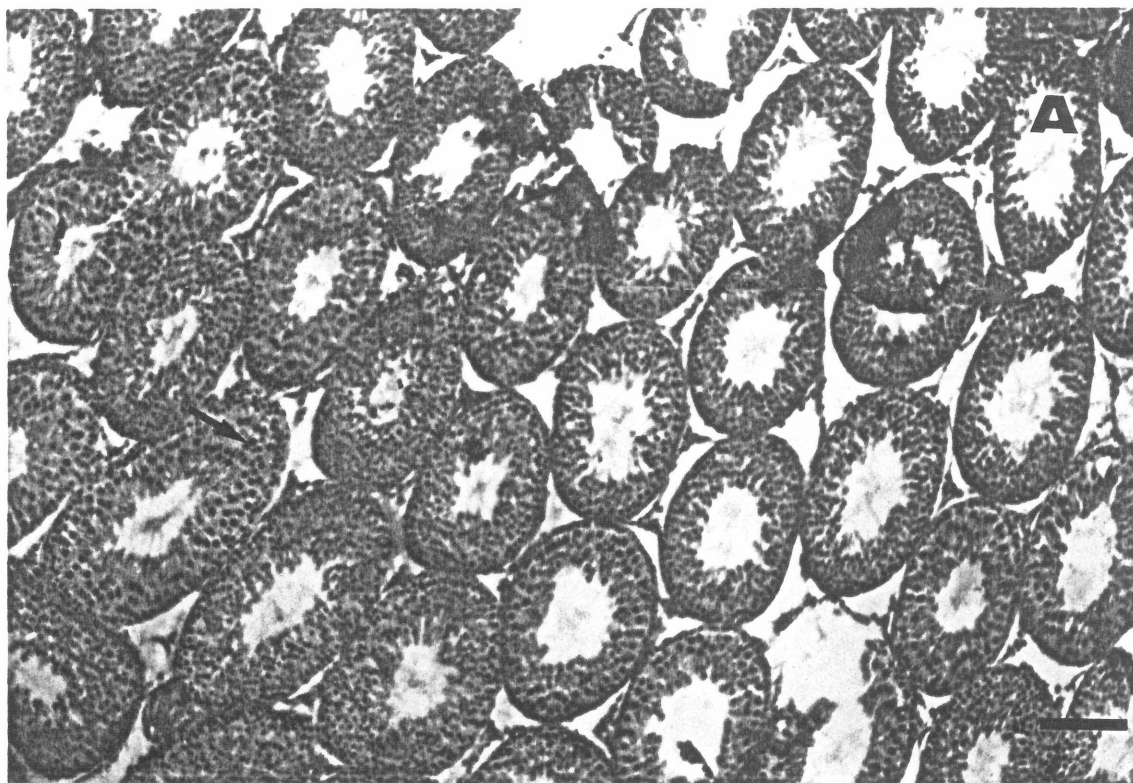


Figura II.1.) Determinação da Efetividade da Irradiação com ^{60}Co "in útero".

Ambas preparações histológicas foram feitas em testículos de ratos após atingir a maturidade sexual.

Figura II.1.A) Testículos de ratos normais(200 x)

➤ Mostra o epitélio germinativo

Figura II.1.B) Testículos de ratos irradiados (200 x)

➤ Mostra os núcleos das células de Sertoli

Barra de calibração: 10 μ m

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.2.4.2. Cultura Primária de Células de Sertoli

As células eram sempre semeadas em substrato plástico. Foram usadas as seguintes densidades celulares: 1×10^6 (para alguns procedimentos histológicos, ver legendas das figuras) e $3,5 \times 10^6$ células por placa, conforme explicado em cada experimento, e cultivadas por 24 h em meio 199 com 1% de soro fetal bovino (SFB). Após, as culturas foram lavadas com BSS e cultivadas por mais 48 h em meio sem soro. As culturas foram sempre mantidas a 34° C em atmosfera úmida e controle de CO₂. Os tratamentos com FSH, LH, retinol, propionato de testosterona, glicose, bloqueadores de canais de cálcio, bloqueadores da síntese protéica e o transporte de aminoácidos somente foram iniciados após as primeiras 72 h em cultura.

II.2.4.3. Determinação da Pureza das Culturas de Células de Sertoli

Em culturas provenientes de testículos enriquecidos em células de Sertoli, obtêm-se preparações sem células da série espermatogênica (Beaumont, 1960). O isolamento destas células por digestão com tripsina e collagenase, produz agregados celulares com menos de 0,5 % de células peritubulares (Toebosch et al. , 1989).

II.2.4.4. Determinação do Conteúdo lipídico nas Culturas

A presença de gotas lipídicas nas células em cultura foi determinada pela coloração histoquímica pela técnica de Sudan Negro (Lison, 1960; Pearse, 1968).

Tabela II. 7. Coloração histoquímica - FIXAÇÃO

Meio de incubação			
Paraformaldeído 4 %			
"A" Tampão fosfato monobásico	0,2 M	pH 7,4	
"B" Tampão fosfato dibásico	0,2 M	pH 7,4	
"C" Tampão "A"		19,0 ml	
Tampão "B"		81,0 ml	

Partes iguais dos tampões e paraformaldeído 4 % (0,1 M tampão fosfato e paraformaldeído 2 % - Tampão "C"). Figura II.3.

Tabela II. 8. Revelação

Incubar com tampão "C" por 1 hora
Hidratar as células com tampão fosfato 0,2 M
Lavar com álcool 70 %
Colocar Sudan Negro (0,3 %) de 1 a 2 minutos
Colocar no álcool 50 % por 1 minuto
Colocar uma gota de glicerina e a lamínula

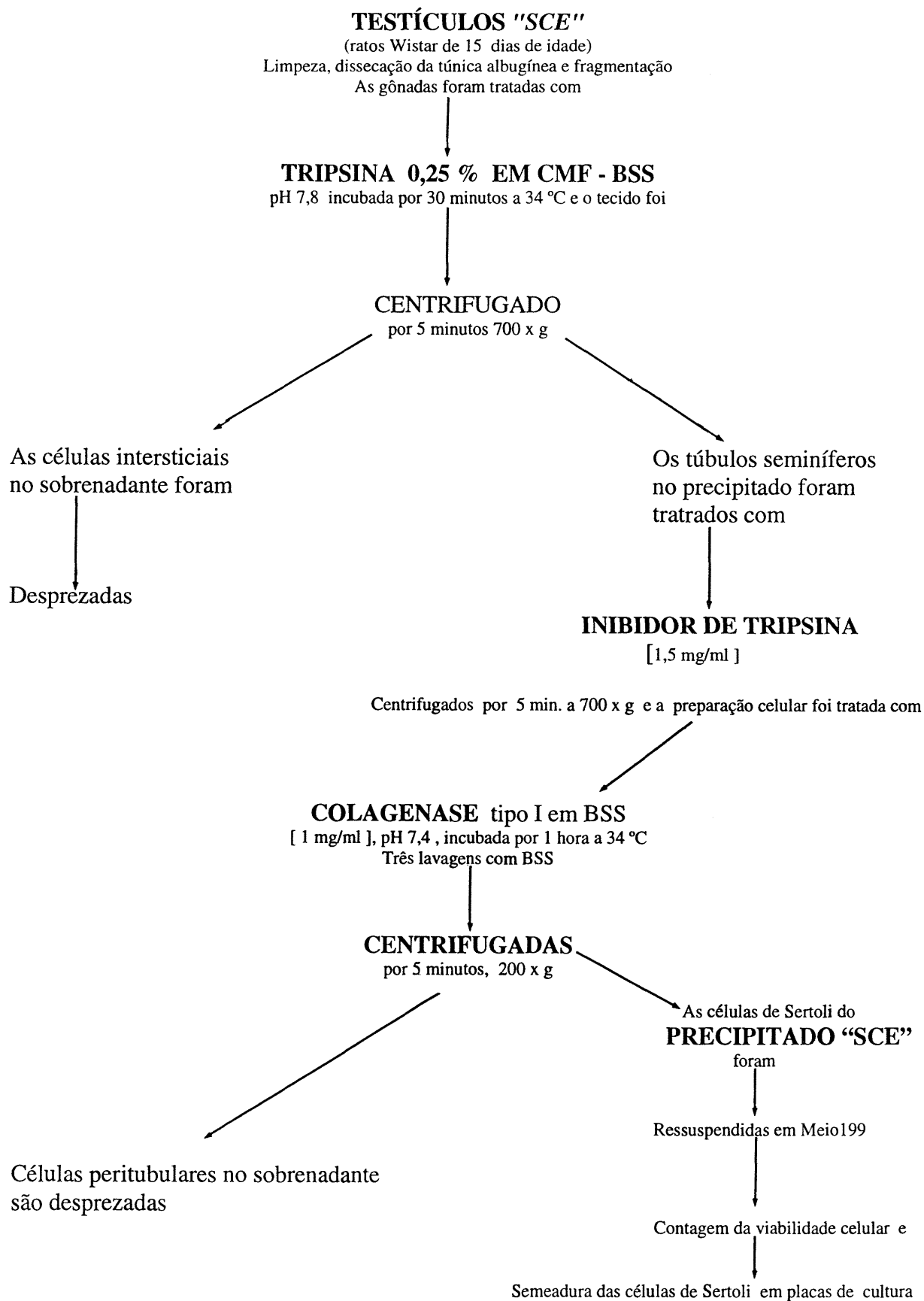


Figura II.2. Representação Esquemática do Processo de Obtenção de Células de Sertoli

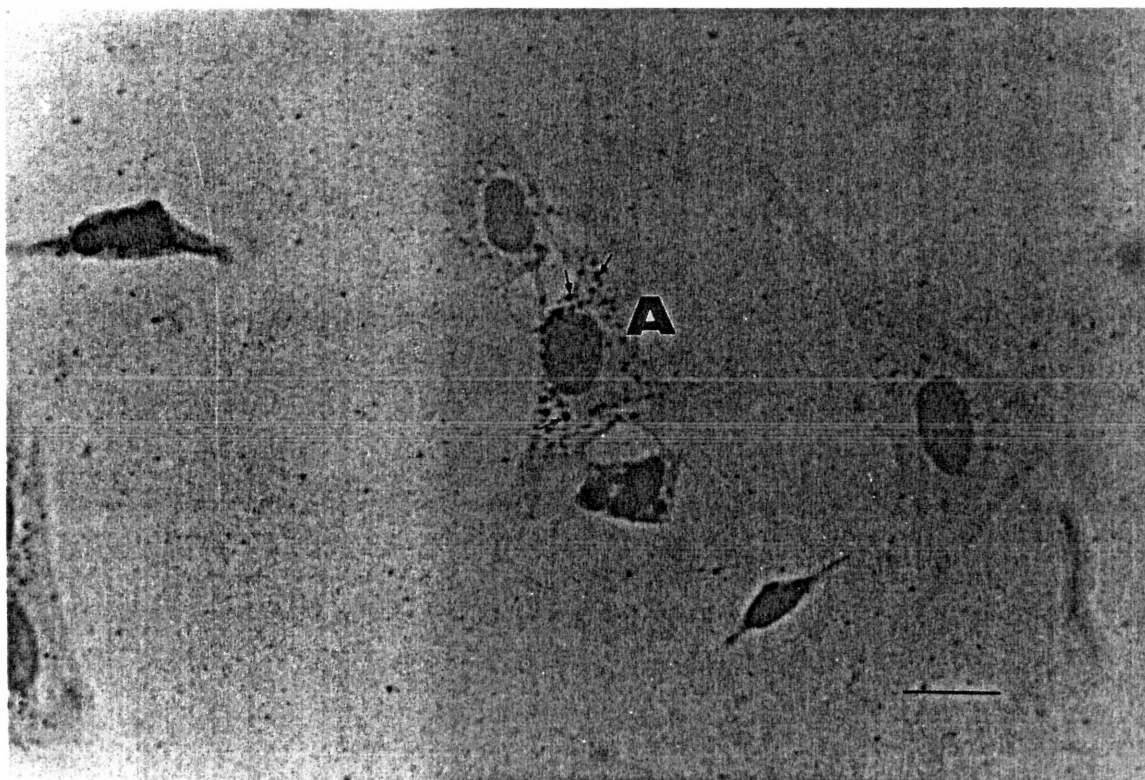


Figura II.3. Determinação do Conteúdo Lipídico pelo Método do Sudan Negro.

(1×10^6 células/ placa de 35 mm) (400 x). Barra de calibração: 5 μ m

A= Célula de Sertoli

\= Gotas Lipídicas

II.2.4.5. Determinação Quantitativa das Células em Cultura pelo Método da Hematoxilina-Eosina. Figura II.4.

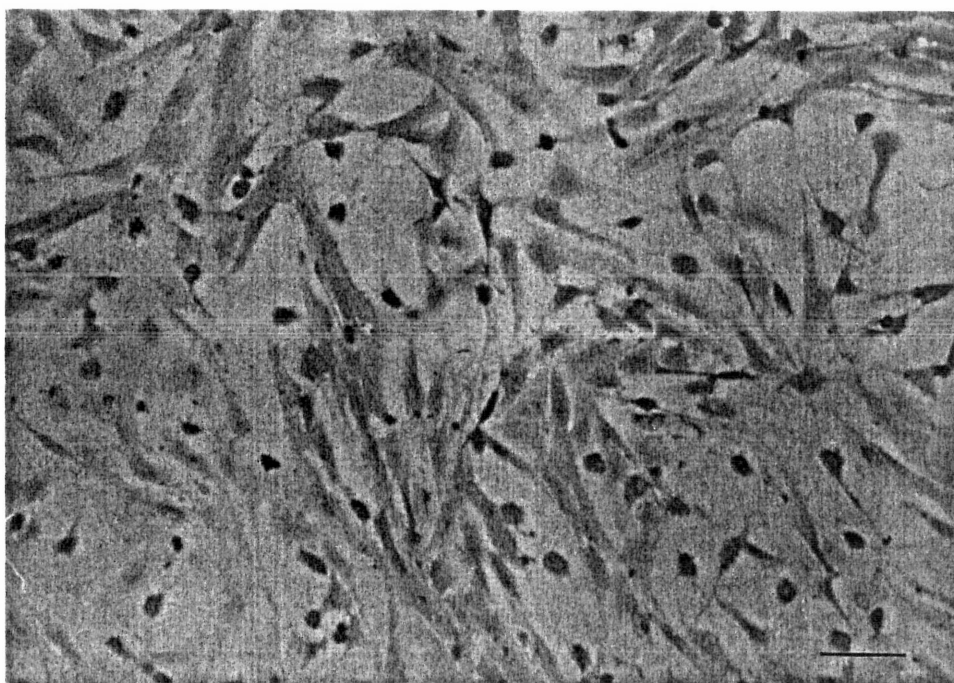


Figura II.4. Determinação Quantitativa das Células em Cultura pelo Método da Hematoxilina-Eosina

Cultura primária de células de Sertoli provenientes de testículos "SCE".

(1×10^6 células/ placa de 35 mm) (160 x)

Barra de calibração: 10 μ m

II.2.4.6. Monocamada de Células de Sertoli "SCE" após 72 h em Cultura.

Figura II.5.

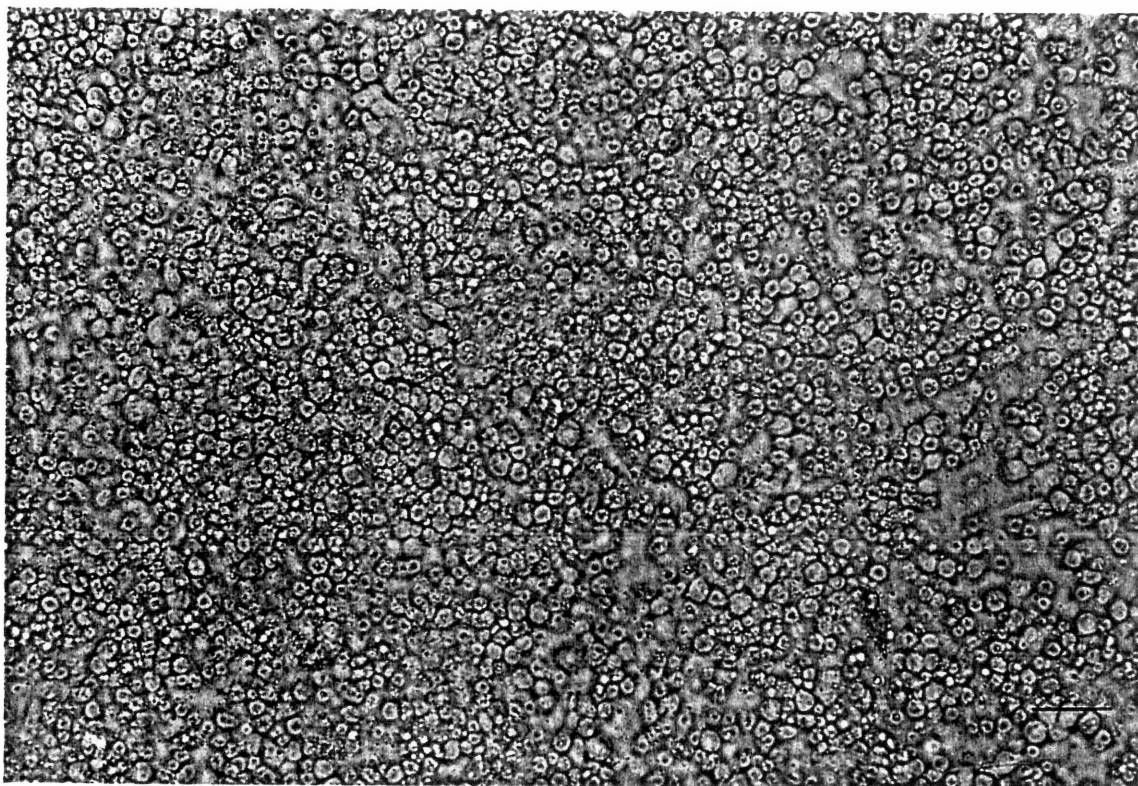


Figura II.5. Monocamada de Células de Sertoli "SCE" Cultivadas por 72h
Aumento (200 x). Barra de calibração: 10 μ m.

II.2.5. TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA

II.2.5.1. Células de Sertoli Tratadas com FSH

O tratamento das células era iniciado sempre após 72 h em cultura. O FSH diluído em meio 199 era adicionado nas culturas por diferentes tempos de pré-incubação (15 minutos até

12 horas). Nos experimentos em tempos longos (1 h até 12 h), o meio era substituído de duas em duas horas por um meio fresco contendo o hormônio na concentração desejada. As células eram mantidas nas mesmas condições com controle de CO₂ e temperatura durante todo o período de pré-incubação com hormônio. As doses e os tempos de tratamento estão descritos na legenda de cada experimento.

Para a medida do transporte de aminoácidos (ácido α -metilaminoisobutírico [1-¹⁴C]) e da síntese protéica (leucina [U-¹⁴C]) era feita uma solução fresca com ou sem hormônio em salina tamponada (BSS), a 34 °C e a respectiva substância marcada (0,1 ou 0,2 μ Ci/ml). As células eram então incubadas com agitação em 1 ml de solução conforme o período e a dose do hormônio especificado em cada experimento.

II.2.5.2. Células de Sertoli Tratadas com LH

O LH - NIH, previamente pesado e diluído em BSS foi adicionado nas culturas "SCE" durante o período de incubação com o aminoácido α -MeAIB-¹⁴C por 15 min. Nos diferentes grupos experimentais foram utilizadas as doses de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mU/ml, conforme descrito na legenda dos gráficos no capítulo dos resultados.

II.2.5. 3. Células de Sertoli Tratadas com Retinol

Após 72 h das células de Sertoli em cultura, uma solução de retinol diluído em etanol era adicionada ao meio 199 por diferentes períodos de tratamento (15 minutos até 12 horas). A concentração final do solvente no meio de cultura era sempre menor que 0,1 % . As células eram mantidas na estufa de CO₂ até o momento da incubação. As doses e os tempos de tratamento estão descritos em cada experimento.

Para a medida do transporte de aminoácidos (ácido α -metilaminoisobutírico [1-¹⁴C]) e da síntese protéica (leucina [U-¹⁴C]) era feita uma solução de 1 ml de BSS contendo ou não retinol na concentração desejada e o respectivo aminoácido marcado (0,1 ou 0,2 μ Ci/ml). A

incubação foi realizada a 34 °C com agitação de acordo com o tempo especificado em cada experimento.

II.2.5.4. Células de Sertoli Tratadas com FSH e Retinol

Para os experimentos realizados com FSH e retinol era feita uma solução de FSH, em meio 199, na concentração desejada e acrescentava-se o retinol previamente dissolvido em etanol até atingir a concentração necessária. Os procedimentos de pré-incubação e incubação eram semelhantes aos descritos em II.2.5.1. e II.2.5.3. Todo o manuseio feito com retinol, desde a pesagem, preparo de soluções, sua adição aos meios de cultura, etc, era feito sem incidência direta de luz.

Para os tratamentos descritos no ítem II.2.5, após o término da incubação a solução radioativa era aspirada e o sistema de transporte era bloqueado pela adição de 1 ml de solução salina saturada com α -metilaminoisobutírico (20 mM), misturada rapidamente e desprezada esta solução. Era adicionado 1 ml de água destilada e as células eram congeladas a 20 °C negativos para determinação da captação de aminoácidos (Cruz Curte e Wassermann, 1985), extração e posterior dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al., 1951.

Para os experimentos de síntese protéica, a incorporação de leucina [U - ^{14}C] em proteínas após o período de incubação, era bloqueada pela adição de TCA 10% gelado direto na placa . As células eram congeladas a 20°C negativos para medida da radioatividade (Borland et al., 1984). Culturas paralelas (Duclos et al., 1993) eram feitas para a extração de proteínas com NaOH (1N) e posterior dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al., 1951.

II.2.5.5. Células de Sertoli Tratadas com Propionato de Testosterona

O propionato de testosterona diluído em etanol foi utilizado no tratamento crônico e agudo de culturas de células de Sertoli. Para o tratamento crônico, as células foram pré-incubadas por 3 h com BSS contendo 2 μ M de testosterona.

No período de incubação, uma solução fresca de BSS, testosterona (2 μ M) e o aminoácido α -MeAIB- 14 C foi utilizada durante 15 min. em um banho com agitação a 34 °C.

O efeito agudo da testosterona no transporte de aminoácidos neutros foi observado através da incubação das culturas com testosterona 2 μ M por 15 min. na presença do α -MeAIB- 14 C.

II.2.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

II.2.6.1. Coleta e Rompimento das Células

Após congeladas a 20 °C negativos por 24 h, as células foram coletadas por raspagem das culturas do substrato plástico, utilizando-se um bastão de borracha (Cell Scraper - Costar). Nesse procedimento, as células eram aspiradas com pipetas Pasteur siliconizadas e transferidas para tubos de ensaio. As placas eram lavadas duas vezes com 0,5 ml de água destilada e posteriormente todo o homogenizado era sonificado (30 segundos, 40 mA) e centrifugado (10 minutos, 800 x g) para a dosagem da captação de aminoácidos.

II.2.6. 2. Determinação da Radioatividade

Uma alíquota de 25 μ l do sobrenadante celular foi utilizada para a dosagem da captação de aminoácidos (Cruz Curte e Wassermann,. 1985). Do restante do homogenizado celular foi realizada a extração de proteínas e 200 μ l de amostra foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry et al., 1951, usando albumina de soro bovino como padrão.

Para a determinação quantitativa da incorporação de leucina [U- 14 C] em proteínas, o precipitado celular foi filtrado em membranas de fibra de vidro (Sigma) e lavados com água destilada e etanol. Os filtros foram secados em estufa a 37 °C por 24 horas e posteriormente colocados em líquido de cintilação para a medida da radioatividade (Borland et al., 1984).

II.2.6.3. Expressão dos Resultados e Análise Estatística

Para os experimentos realizados em culturas de células de Sertoli os resultados foram expressados em cpm/mg de proteínas. As comparações entre os diversos grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan's (Sokal e Rohlf, 1969). As comparações entre dois grupos experimentais foram realizadas pelo teste t de Student, conforme o modelo experimental proposto. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um "p" igual ou menor do que 0,05 (Snedecor e Cochran, 1973).

II.2.7. B) MÉTODOS UTILIZADOS PARA OS EXPERIMENTOS EM TESTÍCULOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI ("SCE")

II.2.7.1. Obtenção dos Testículos "SCE"

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os testículos removidos por incisão abdominal e dissecados do epidídimo. A seguir, efetuou-se a determinação do peso gonadal em uma balança eletrônica Micronal B-160 e, logo após, retirou-se a túnica albugínea e as glândulas foram então incluídas no meio de incubação. Durante o tempo de obtenção dos testículos, estes foram mantidos em papel de filtro embebido em KRb e acondicionados em placas de Petri mantidas sobre o gelo até o momento da incubação.

II.2.7.2. Incubação dos Testículos

De cada animal, um testículo foi tomado como tratado (alternadamente direito e esquerdo) e o contralateral como controle. Os testículos foram colocados, individualmente, em tubos plásticos numerados, contendo 1 ml de KRb ou KRb hipossódico (conforme experimento), em ausência (controle) ou presença de retinol (20 µM) e/ou níquel (100 µM), e/ou ouabaína (100 µM) e/ou cobalto (1,2 mM), e/ou testosterona (4 µM), e/ou glicose (14 mM) nos grupos tratados. Os distintos modelos experimentais utilizados encontram-se detalhadamente descritos no capítulo dos resultados e nas figuras respectivas. A seguir os

testículos foram pré-incubados em um agitador metabólico a 34 °C, numa atmosfera de carbogênio (O₂ , CO₂ , 95: 5 v/v), durante um período de 30 ou 60 minutos.

Imediatamente após a pré-incubação, os testículos foram trocados para um meio, igual ao da pré-incubação, acrescentando-se o retinol (20 µM) e 0,1 ou 0,2 µCi/ml do α-metilaminoisobutírico [1-¹⁴C]. Após esta etapa, os frascos foram colocados novamente no agitador metabólico a 34 °C e atmosfera de carbogênio, iniciava-se o período de incubação até 60 minutos. Figura II.6. (mesmo procedimento também era usado para a obtenção de testículos de ratos adultos).

II.2.7.3. Grupos Experimentais

Cada experimento foi realizado com o grupo controle e um ou três grupos tratados. Cada grupo era composto por 5 gônadas (ver figuras).

II.2.7.3.1. Efeito da pré-incubação na ação do retinol na captação de α-MeAIB-¹⁴C

II.2.7.3.2. Influência da inibição do sistema "A" no transporte de α-MeAIB-¹⁴C

II.2.7.3.3. Influência dos bloqueadores de canais de Ca⁺⁺ no efeito estimulatório do retinol na captação de α-MeAIB-¹⁴C

II.2.7.3.4. Efeito do tratamento crônico com testosterona em testículos "SCE" de ratos imaturos

II.2.7.3.5. Efeito da glicose em testículos "SCE" de ratos de 35 dias de idade

II.2.7.3.6. Ação do retinol na captação de α-MeAIB-¹⁴C em testículos de ratos durante a maturação sexual

II.2.7.4. Medida da Radioatividade e Expressão dos Resultados

Imediatamente após a incubação, as glândulas foram removidas do meio de incubação e a radioatividade remanescente à superfície foi retirada com papel de filtro umedecido em KRb. A seguir, os testículos foram colocados em frascos com tampa hermética contendo 1 ml de água destilada, alternadamente congelados a 20 °C negativos e fervidos durante 3 minutos.

Essas variações de temperatura tiveram por objetivo romper as membranas celulares e obter um equilíbrio entre o líquido intracelular e a água adicionada. Deste meio foram extraídas alíquotas de 25 µl que representam o meio intracelular. Igualmente, do líquido de incubação foram extraídas alíquotas de 25 µl que representam o meio extracelular. Essas alíquotas foram adicionadas a frascos contendo 3 ml do líquido de cintilação Aquasol. A radioatividade das alíquotas foi avaliada num espectrômetro de cintilação líquida LKB (Rack-Beta) com eficiência de 85 a 90%.

Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade no tecido e no meio de incubação, avaliada pelo número de contas por minuto (cpm), por ml do líquido tissular/ número de contas por minuto por ml do líquido de incubação (T/M).

$$T/M = \text{cpm} \times \text{ml do líquido tissular} / \text{cpm} \times \text{ml do líquido de incubação}$$

II.2.7.5. Análise Estatística

Os resultados experimentais foram comparados estatisticamente pela análise de variância de uma e duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan's (Sokal e Rohlf, 1969). Quando apropriado foi utilizado o test t de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um "p" igual ou menor do que 0,05 (Snedecor e Cochran, 1973).

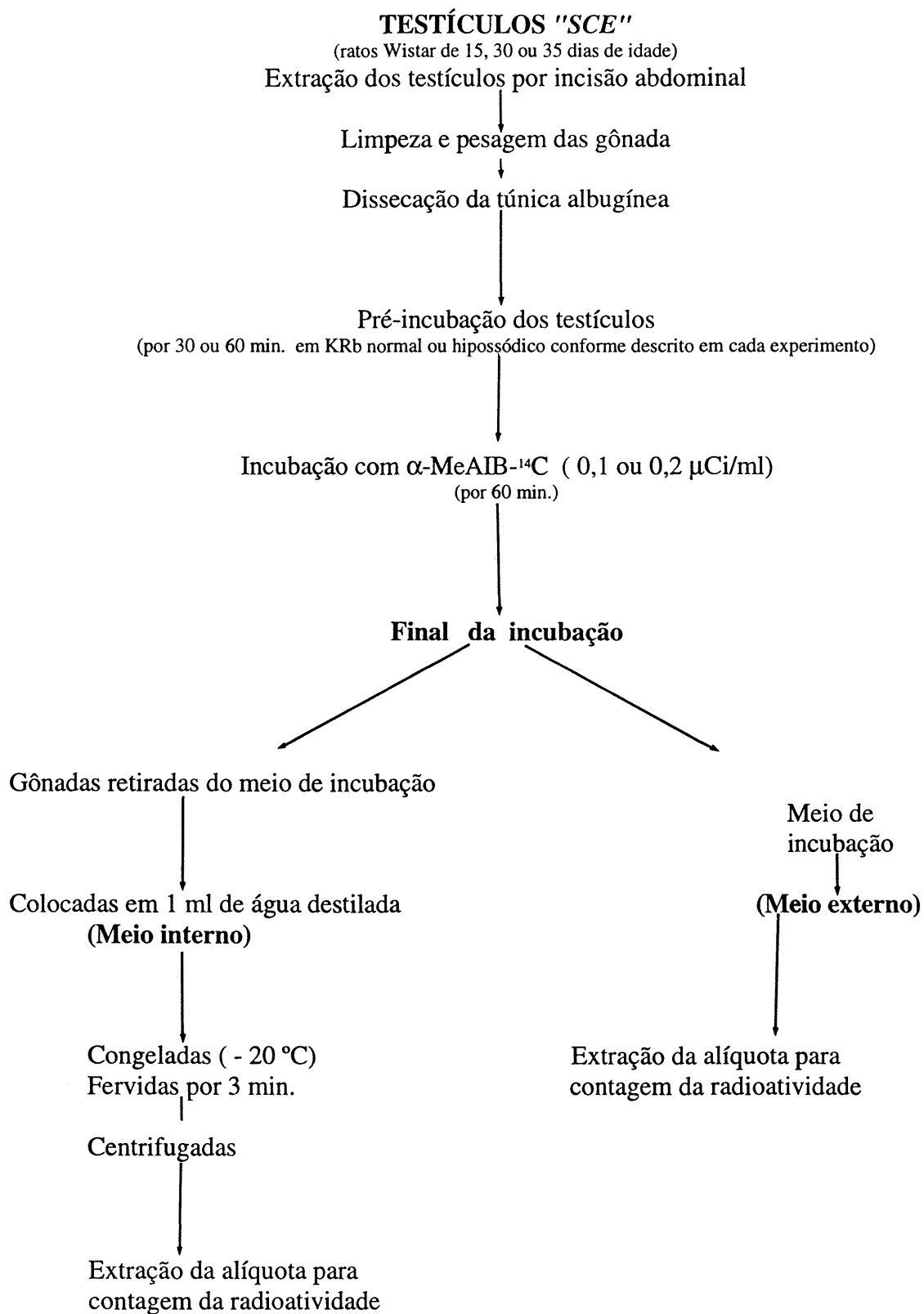


Figura II.6. Representação Esquemática do Processo de Obtenção e Incubação dos Testículos "SCE"

III. RESULTADOS

Para a realização deste trabalho foram realizadas incubações "*in vitro*" de testículos enriquecidos em células de Sertoli ("*SCE*") e culturas de células de Sertoli provenientes de testículos "*SCE*". Os diferentes tipos de preparações biológicas foram obtidas como descrito em materiais e métodos.

III.1. EXPERIMENTOS COM FSH EM CULTURAS "*SCE*"

Tendo como base os experimentos descritos para o FSH no transporte de aminoácidos em testículos de ratos de diferentes idades através de sistemas de ensaio "*in vivo*" e "*in vitro*", fêz-se necessário o estudo do FSH de diferentes espécies e origens, bem como, a regulação do transporte de aminoácidos neutros com tratamento hormonal extremamente longo o que, anteriormente estava impossibilitada dada a metodologia até então, por nós, utilizada.

III.1.1. EFEITO DA DOSE DE FSH DE HIPÓFISE DE OVINOS (Sigma) NO TRANSPORTE DE α -MeAIB- ^{14}C EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Células de Sertoli provenientes de testículos "*SCE*" de ratos de 15 dias de idade, foram cultivadas por 24 h em meio 199 com 1% de soro fetal bovino (SFB) e, por mais 48 h em meio 199 sem soro. Estas preparações foram mantidas sempre em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 34°C (como descrito detalhadamente em materiais e métodos).

Após a obtenção da monocamada celular, as placas eram divididas em grupos conforme o experimento. As células eram primeiramente lavadas com solução salina tamponada (BSS) e pré tratadas com ou sem hormônio e posteriormente incubadas com o aminoácido marcado.

Os resultados mostrados na figura III.1.1. foram realizados conforme o esquema: 1º) Grupos controles - Células de Sertoli incubadas com BSS e α -MeAIB- ^{14}C (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$); 2º) Grupos tratados - Estes grupos foram incubados com FSH de hipófise de

ovinos (Sigma), nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 2,0 mU/ml, respectivamente, com o aminoácido α -MeAIB- ^{14}C .

Nesta figura observa-se que o FSH estimulou o transporte de aminoácidos em culturas de células de Sertoli. Este efeito foi evidente em qualquer das doses testadas, mostrando-se ótimo quando foi incubado na concentração de 2,0 mU/ml.

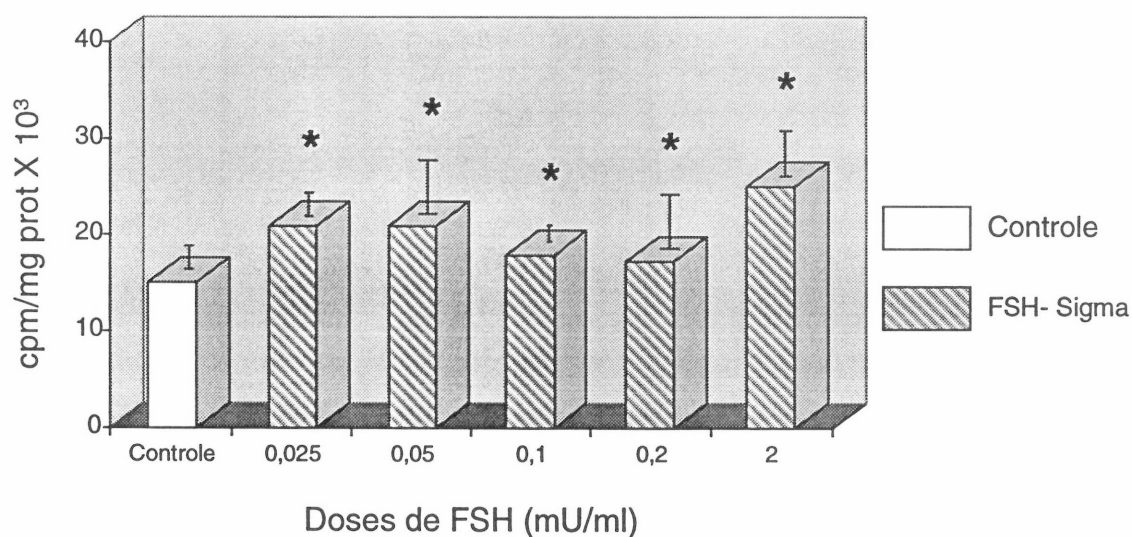


Figura III1.1. Efeito da Dose de FSH de Ovinos (Sigma) no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao basal, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FSH DE HIPÓFISE DE SUÍNOS (NIH) NO TRANSPORTE DE α -MeAIB- ^{14}C EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

O presente experimento teve como objetivo avaliar o efeito da administração de FSH de diferente origem, ou seja, National Institute of Health (NIH) e espécie (suínos) sobre o transporte de aminoácidos neutros.

Como demonstrada graficamente na figura III.1.2. houve diferença estatisticamente significativa dos grupos tratados com FSH em relação ao grupo controle. Nestas condições experimentais, semelhantes as condições utilizadas para os resultados obtidos e mostrados na figura III.1.1., a dose ótima do hormônio na manifestação do estímulo na captação de α -MeAIB- ^{14}C foi de 0,1 mU/ml.

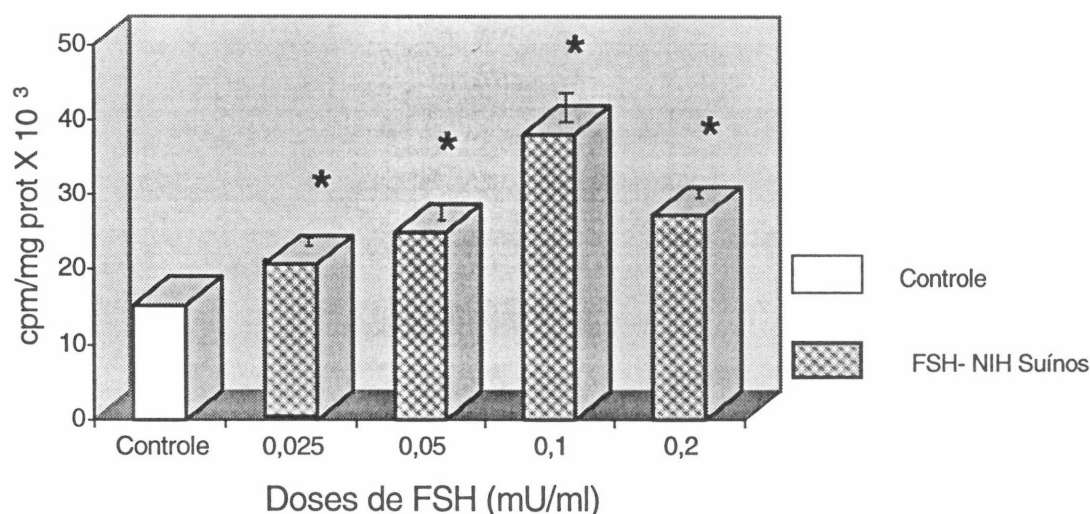


Figura III.1.2. Efeito da Dose de FSH de Suínos (NIH) no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.3. CURVA DOSE RESPOSTA DO FSH DE HIPÓFISE DE OVINOS (NIH) NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS

Estudos prévios demonstraram que o FSH aumenta o transporte de aminoácidos em culturas de células de Sertoli. Entretanto, alguns aspectos em relação a origem e espécie do hormônio parece influenciar na potência desse estímulo.

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito do FSH extraído de hipófise de ovinos pelo NIH. Para tal, foram utilizados três grupos experimentais constituídos de culturas provenientes de uma mesma preparação celular.

O FSH de hipófise de ovinos (0,1 ou 0,2 mU/ml), quando administrado nestas células por 15 min. em presença do α -MeAIB- ^{14}C , estimulou a captação deste. Os resultados são apresentados na figura III.1.3.

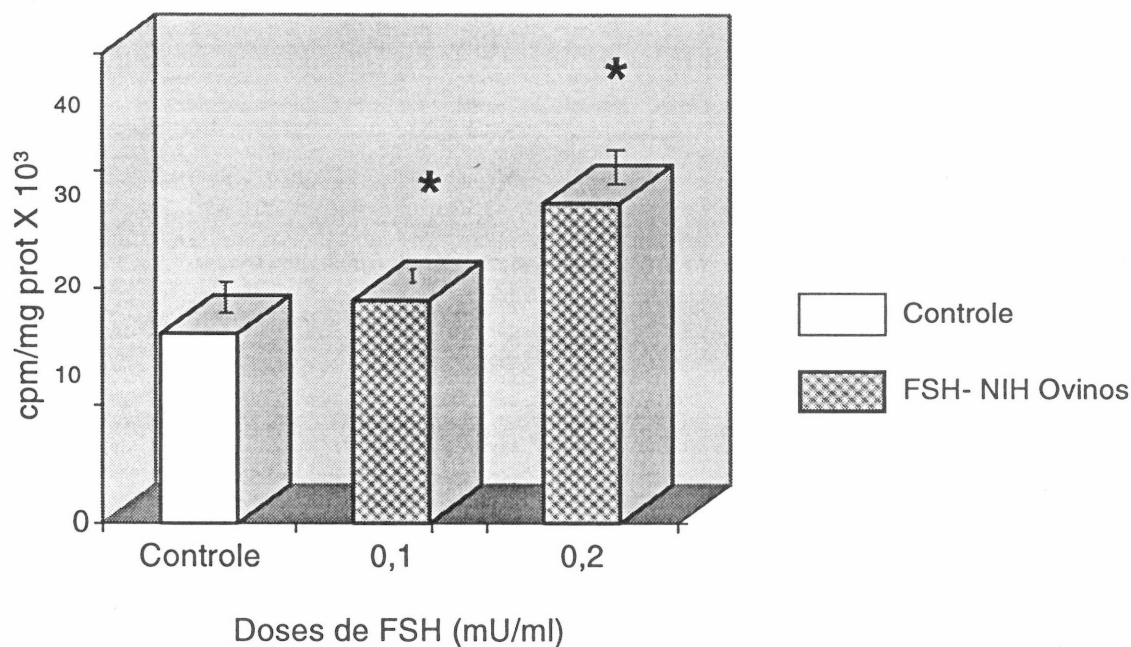


Figura III.1.3. Efeito do FSH de Hipófise de Ovinos (NIH) no Transporte de Aminoácidos Neutros

I = 15 min.

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.4. EFEITO COMPARATIVO DE DIFERENTES ORIGENS E ESPÉCIES DE FSH NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

A fim de confirmar os resultados obtidos com o uso de FSH de diferentes origens e espécies nas distintas preparações celulares, o presente experimento avaliou o efeito da administração de FSH numa única dose (0,1 mU/ml), para ser testada em células de uma mesma preparação celular. O presente experimento teve como objetivo avaliar, em tempo imediato de exposição do hormônio, a potência relativa de cada amostra de FSH.

Para tal, foram utilizadas monocamadas de culturas de células de Sertoli provenientes de testículos de ratos imaturos. As células foram incubadas em BSS contendo 0,2 μ Ci/ml do aminoácido modelo α -MeAIB- 14 C por 15 min. Os hormônios foram pesados e diluídos em BSS imediatamente antes da incubação. Em todos os grupos tratados a concentração de FSH utilizada foi 0,1 mU/ml. O experimento foi dividido em cinco grupos e submetidos ao seguinte ensaio: 1º) Grupo controle - Células incubadas com BSS; 2º) Grupo FSHp-NIH - As células foram incubadas com o hormônio FSH de hipófise de suínos do NIH.; 3º) Grupo FSHr-NIH - As células foram incubadas com o hormônio FSH de hipófise de rato do NIH; 4º) Grupo FSHo-Sigma - As preparações celulares foram incubadas com FSH extraído de hipófise de ovinos pela Sigma Chemical Company (Sigma); 5º) Grupo FSHo-NIH - As células foram incubadas com o hormônio extraído de hipófise de ovinos pelo NIH.

Os resultados demonstrados na figura III.1.4 corroboram os dados de estudos anteriores, onde a administração de FSH em sistemas de ensaios semelhantes, estimula a captação de aminoácido neutros. Entretanto, observa-se que não só as diferentes espécies animais de onde foram extraídas as amostras de FSH, mas também, o grau de pureza obtido pelos laboratórios citados, influenciam diretamente na potência relativa de estímulo no transporte de aminoácidos. É de chamar atenção, no entanto, que o efeito observado neste sistema, foi consequência de um breve período de exposição do hormônio à sua célula alvo.

Observou-se paralelamente, diferença estatisticamente significativa de estímulo nas amostras testadas. O efeito mais nítido observado, entre as doses utilizadas, foi com a preparação que continha FSH de hipófise de suínos do NIH.

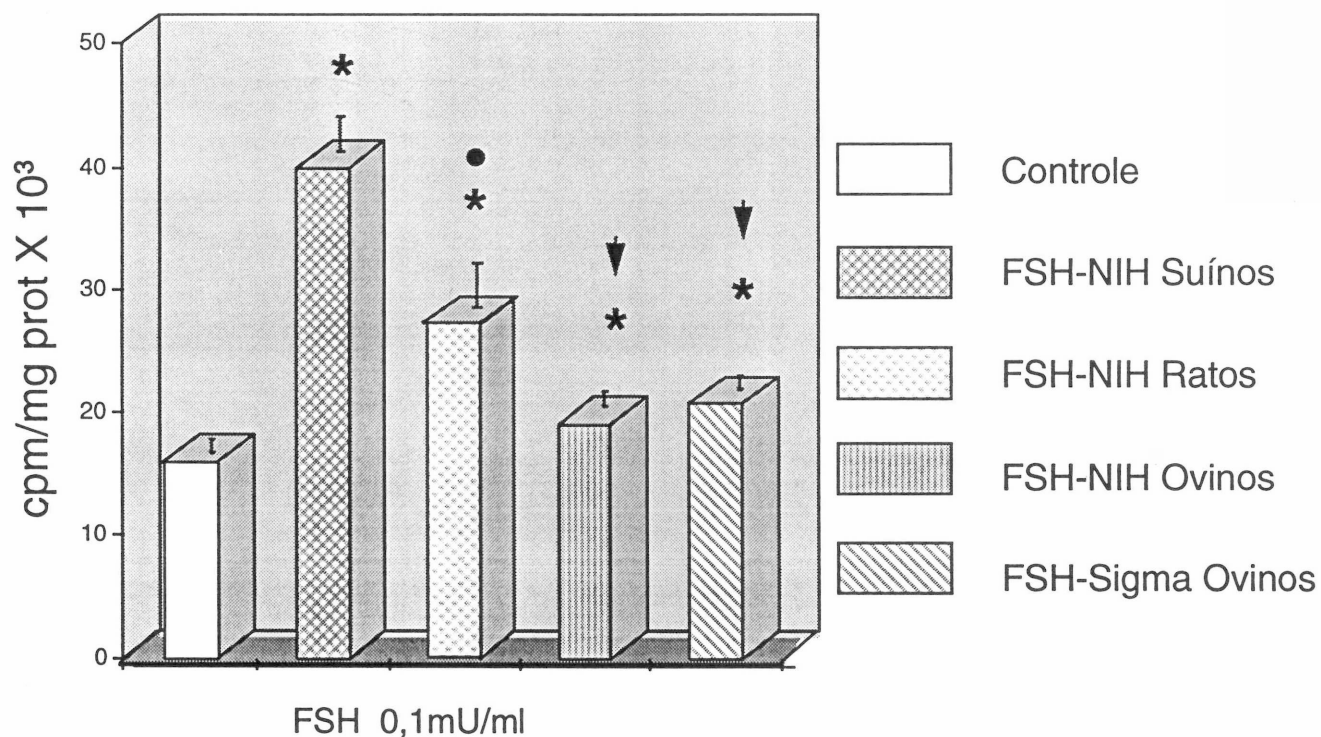


Figura III.1.4. Efeito do FSH de Diferentes Origens e Espécies no Transporte de α -MeAIB-¹⁴ em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

↓ Significativo em relação ao grupo tratado com FSH-NIH suínos e de ratos, $p < 0,01$.

• Significativo em relação ao grupo tratado com FSH-NIH suínos, $p < 0,01$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 5 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.5. EFEITO COMPARATIVO DO FSH E LH NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

As preparações de gonadotrofinas que tem sido usadas para estudar os diferentes aspectos da função testicular são de pureza limitada. Ainda não é claro se ambas gonadotrofinas (FSH e LH) são essenciais para o desenvolvimento de todas as funções testiculares, mas, as evidências experimentais demonstram que estas gonadotrofinas são necessárias para o crescimento e diferenciação das células de Sertoli (Ultee-van Gessel et al., 1987). A interpretação destas descobertas, no entanto, é dificultada devido a contaminação de preparações de FSH com LH.

O objetivo do presente experimento foi investigar o efeito, no transporte de aminoácidos, de preparações de FSH e de LH altamente purificados em culturas de células de Sertoli. As soluções contendo os hormônios foram preparadas no momento do experimento, em salina BSS e a cada grupo era acrescentado 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ e o tratamento das células foi por 15 min. a 34° C em um incubador metabólico com agitação.

A figura III.1.5 mostra o efeito no transporte de aminoácidos obtido com o tratamento de ambas gonadotrofinas. O FSH de ovinos (Sigma) e de suínos (NIH) foi solubilizado em BSS para obter a concentração de 0,1 mU/ml. O LH de hipófise de equinos (NIH) foi pesado e solubilizado em BSS perfazendo uma solução estoque da qual era sucessivamente diluída para obter as concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mU/ml. O experimento consistia dos seguintes grupos: 1°) Controle - BSS; 2°) Grupo FSH ovinos (Sigma); 3°) Grupo FSH de suínos (NIH); 4°) Grupo LH de equinos (NIH) 0,1 mU/ml; 5°) LH de equinos (NIH) 0,2 m U/ml; 6°) LH de equinos (NIH) 0,5 mU/ml e 7°) LH de equinos (NIH) 1,0 mU/ml.

O tratamento com FSH de ovinos e de suínos (0,1 mU/ml) por 15 min. produziu um aumento na captação de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ estatisticamente significativo ($p < 0,01$) em relação a captação basal. Este experimento foi, como no experimento anterior (III.1.4), mais nítido com FSH de suínos.

Nenhum efeito estimulatório no transporte de aminoácidos, estatisticamente significativo, foi observado com os grupos tratados com 0,1; 0,2; 0,5 ou 1,0 mU/ml) de LH de hipófise de equinos.

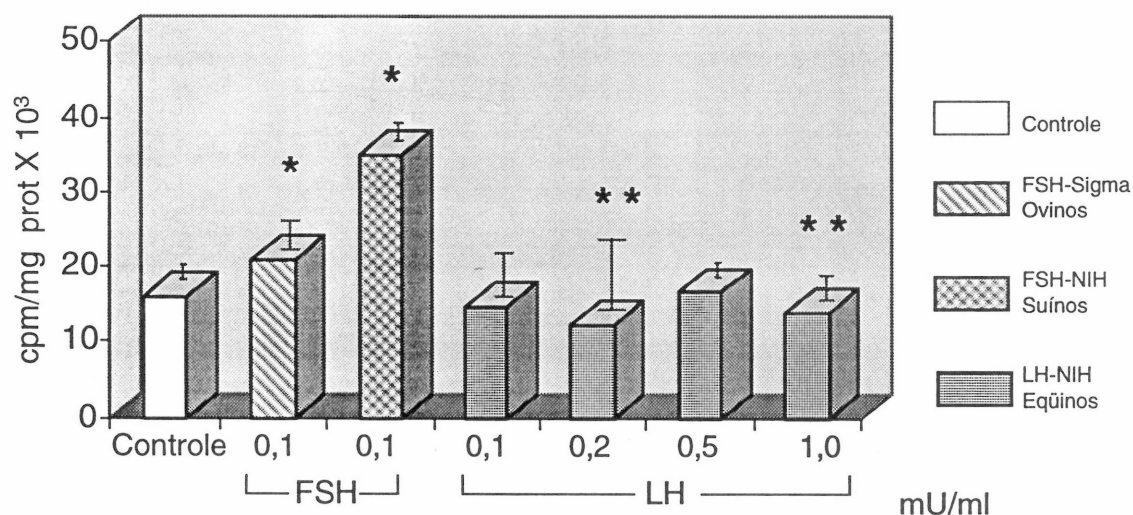


Figura III.1.5. Efeito Comparativo do FSH e do LH no Transporte de α -MeAIB-¹⁴C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,01$.

** Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.6. EFEITO DE UM LONGO PERÍODO DE PRÉ TRATAMENTO COM FSH NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS

Nos experimentos relacionados com a ação do hormônio FSH sobre o transporte de aminoácidos neutros, previamente apresentados nesse trabalho, demonstraram claramente que o FSH estimulou a captação de aminoácidos neutros em culturas "SCE" provenientes de testículos de ratos imaturos, através de um processo rápido observado durante os 15 min. de incubação com o hormônio. Na presente série de experimentos

analisou-se o efeito da pré-incubação com FSH de suínos (0,1 mU/ml), no transporte de aminoácidos em culturas de Sertoli. Figura III.1.6.

Os períodos de pré-incubação tiveram duração de 15 min. até 12 horas. Nos tempos prolongados (mais de uma hora), os meios de cultura eram trocados de 2 em 2 horas, renovando o FSH na concentração de 0,1 mU/ml. Desta maneira tentava-se imitar a secreção pulsátil de FSH pela hipófise de rato. A captação de aminoácidos foi analisada, como nos casos anteriores, durante 15 min. com 0,2 μ Ci/ml de α -MeAIB- 14 C em BSS sem a presença do FSH.

Os resultados mostrados na figura III.1.6. revelam que a taxa de captação de aminoácidos nos grupos tratados com FSH, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos controles durante qualquer dos períodos de experimentação. A captação de aminoácidos nos grupos pré-incubados com FSH, mostrou um comportamento linear semelhante a captação basal.

Estes resultados sugerem que o estímulo do transporte de aminoácidos produzido pelo FSH realiza-se através de um efeito imediato e monofásico ligado diretamente a um efeito na membrana, ou seja, a pré-incubação prolongada com FSH não influencia no transporte de aminoácidos.

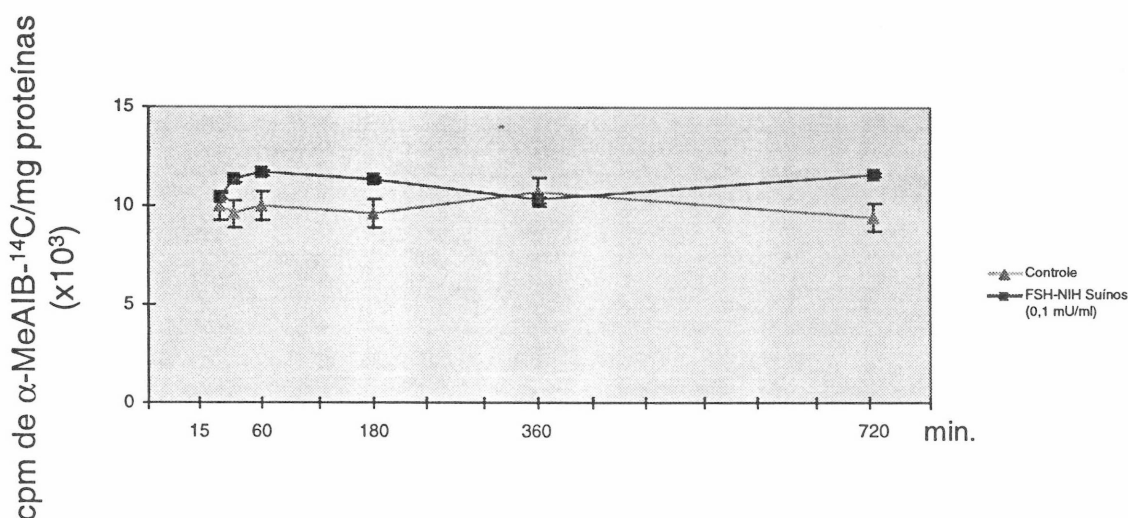


Figura III.1.6. Influência do Tempo de Pré-Incubação com FSH de Suínos - NIH no Transporte de α -MeAIB- 14 C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.1.7. EFEITO DO FSH SOBRE A INCORPORAÇÃO DE LEUCINA - [^{14}C]

EM PROTEÍNAS DE CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Além do transporte de aminoácidos neutros, o FSH influencia a síntese de proteínas e glicoproteínas testiculares. Entretanto, estes dois efeitos do FSH (transporte de aminoácidos e síntese protéica) em testículos de ratos imaturos, são regulados por diferentes fatores. Baseados nesses resultados o objetivo do presente experimento foi analisar o efeito do FSH na síntese protéica em culturas de células de Sertoli com um pré-tratamento longo (até 12 h) com FSH de suínos (NIH) 0,1 mU/ml.

Este experimento foi realizado semelhante ao modelo utilizado no item III.1.6., isto é, foi realizado um pré-tratamento de 15 min. até 12 h com FSH (suínos - NIH; 0,1 mU/ml), trocando-se os meios de 2 em 2 horas por um meio com hormônio fresco. Após a pré-incubação as amostras foram incubadas por 15 min. com 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de leucina - ^{14}C e a incorporação deste aminoácido a proteínas foi determinada.

Os resultados graficamente expressados na figura III.1.7. demonstram um aumento na taxa de síntese de proteínas testiculares estimulada por FSH como determinado pela incorporação de leucina - ^{14}C em proteínas. O aumento estatisticamente significativo da síntese protéica produzida por este hormônio é atingido em três horas de pré-incubação com FSH (0,1 mU/ml) e é mantido no mínimo até 12 h. É demonstrado neste experimento que a pré-incubação com FSH produziu um estímulo na síntese protéica e que este estímulo é observado mesmo sem a presença de FSH na incubação (ao contrário do que ocorreu com o hormônio no transporte de aminoácidos).

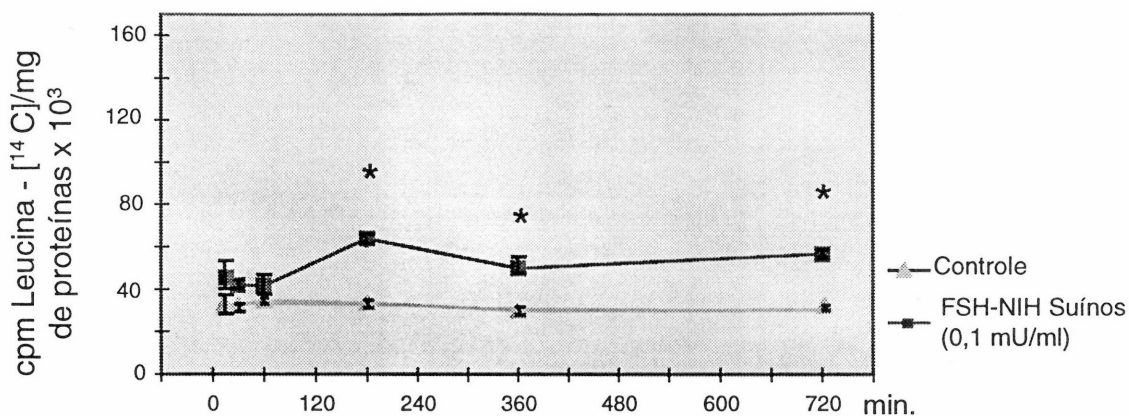


Figura III.1.7. Efeito do FSH de Suínos - NIH sobre a Incorporação de Leucina -¹⁴C em Proteínas de Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2. ANÁLISE DO EFEITO DO RETINOL NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS

O retinol estimula vários aspectos funcionais nas células de Sertoli, entre eles, a manutenção da espermatogênese e a síntese de proteínas testiculares como o ABP e a transferrina. Embora estes efeitos descritos para o retinol sejam assuntos de grande importância na bioquímica e fisiologia testicular, a elucidação de seu mecanismo de ação tem sido um constante desafio.

Tendo como base as ações descritas para o retinol em diversos tipos celulares, inclusive em células de Sertoli, estudou-se o efeito do retinol na regulação do transporte de aminoácidos neutros.

III.2.1. INFLUÊNCIA DA PRÉ-INCUBAÇÃO NA AÇÃO DO RETINOL NA CAPTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM TESTÍCULOS "SCE"

Testículos "SCE" de ratos imaturos foram pré-incubados durante 30 min. em Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) na presença ou não de retinol (20 μ M). Logo após, os

testículos foram incubados por 60 min. em KRb fresco com retinol e α -MeAIB- ^{14}C (0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Com o objetivo de avaliar a provável influência da pré-incubação na ação do retinol sobre o transporte de aminoácidos, foram estudados três grupos: 1º) Controle - testículos "SCE" em KRb; 2º) Sem retinol na pré-incubação - testículos "SCE" em KRb; 3º) Com retinol na pré-incubação - Testículos "SCE" em KRb e retinol.

A figura III.2.1 mostra o efeito da pré-incubação na ação do retinol no transporte de α -MeAIB- ^{14}C . Verificou-se que o retinol estimulou o transporte de aminoácidos neutros e, que o período de pré-incubação, nesse sistema de ensaio, aumentou o efeito estimulatório no transporte de aminoácidos.

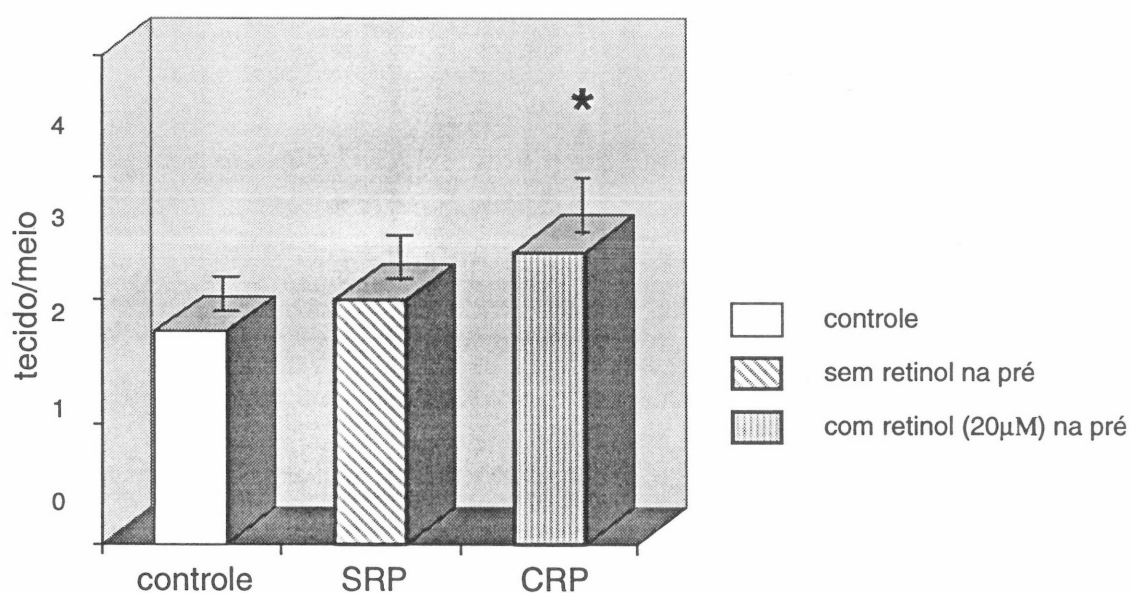


Figura III.2.1. Efeito da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE"

PI = 30 min.

I = 60 min.

Retinol: 20 μM

* Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M.

Cada grupo consistia de 5 gônadas.

SRP = Sem retinol durante o período de pré-incubação.

CRP = Com retinol durante o período de pré-incubação.

III.2.2. INFLUÊNCIA DA PRÉ-INCUBAÇÃO NA AÇÃO DO RETINOL NA CAPTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Células de Sertoli provenientes de testículos "SCE" de ratos de 15 dias, foram cultivadas por 24 h em meio 199 com 1 % de SFB e por mais 48 h em meio 199 sem soro, sempre em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 34° C (como descrito no capítulo materiais e métodos).

Estas preparações celulares, separadas em grupos foram lavadas com solução salina tamponada (BSS) e tratadas por 15 min. com diferentes doses de retinol e analisado o efeito do período de pré-incubação sobre o transporte de aminoácidos. Para isto foram estudados quatro grupos: 1º) Controle - células de Sertoli pré-incubadas e incubadas em BSS; 2º) Grupo retinol 20 µM contendo retinol na pré-incubação e na incubação; 3º) Grupo retinol 20 µM contendo retinol só na incubação; 4º) Grupo retinol 10 µM só no período de incubação.

A figura III.2.2. ilustra os resultados obtidos do efeito da pré-incubação na ação do retinol (10 e 20 µM) no transporte de α -MeAIB-¹⁴C (0,2 µCi/ml) em culturas de células de Sertoli. Neste sistema de ensaio, observa-se que o retinol em qualquer das doses utilizadas estimulou significativamente o transporte de aminoácidos neutros em relação ao grupo controle. Também verificou-se que o período de pré-incubação não influencia na resposta do retinol no transporte em relação aos grupos que não tiveram pré-incubação com retinol.

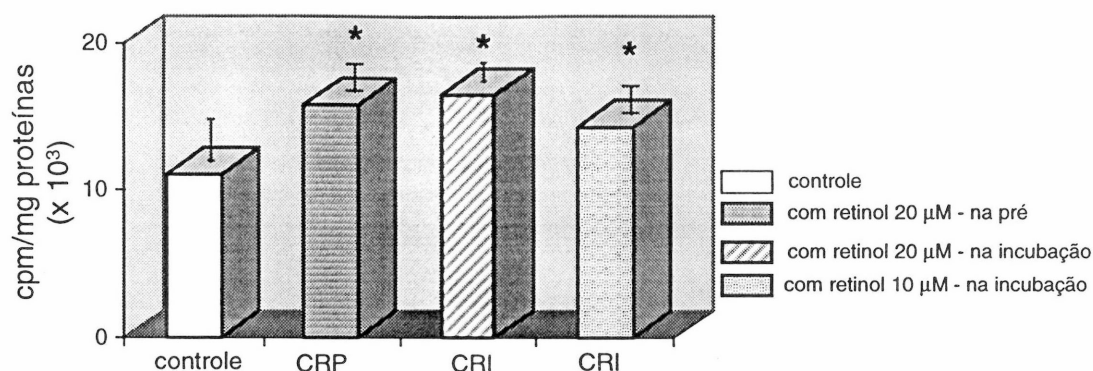


Figura III.2.2. Efeito da Pré-Incubação na Ação do Retinol na Captação de α -MeAIB-¹⁴C em Culturas de Células de Sertoli

PI = 15 min. para os grupos que foram tratados com retinol

I = 15 min.

Retinol 10 ou 20 μ M.

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M.

CRP = Com retinol durante o período de pré-incubação

SRP = Sem retinol durante o período de pré-incubação.

III.2.3. EFEITO DA DOSE DE RETINOL SOBRE O TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM CULTURAS "SCE"

Para este estudo foram preparados quatro grupos experimentais: 1º) Controle - células de Sertoli incubadas com BSS e α -MeAIB-¹⁴C; 2º, 3º e 4º grupos) Células de Sertoli incubadas com 5, 10 e 20 μ M de retinol e α -MeAIB-¹⁴C (0,1 μ Ci/ml).

A figura III.2.3. mostra que houve um aumento na captação de α -MeAIB-¹⁴C, em resposta ao retinol, nas concentrações de 10 e 20 μ M. Estas duas doses estimularam o transporte de aminoácidos, significativamente, em relação ao grupo controle.

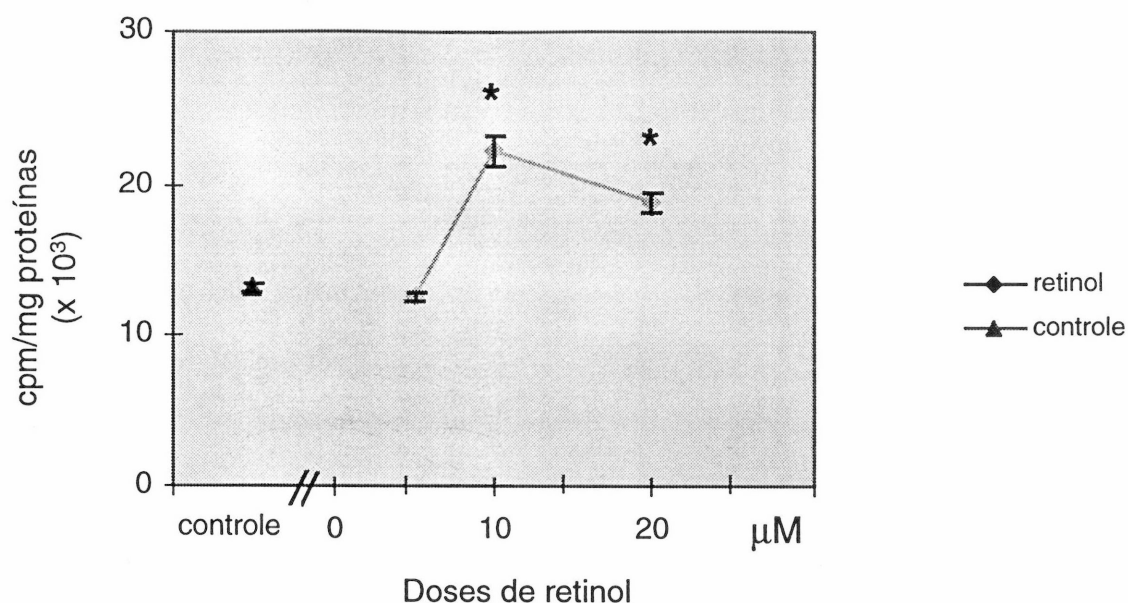


Figura III.2.3. Efeito da Dose de Retinol na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 5 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.4. CURVAS DE TEMPO DA CAPTAÇÃO DE α -MeAIB- ^{14}C EM CULTURAS "SCE"

Para investigar a influência do tempo de incubação no transporte de aminoácidos em culturas de células de Sertoli, os seguintes grupos experimentais foram estudados:

1º) Grupos controles - Três grupos de cinco culturas foram incubados por períodos de 5, 10 e 15 min. com BSS e o aminoácido modelo α -MeAIB- ^{14}C (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$); 2º) Grupos tratados com retinol - Três grupos de cinco culturas foram incubados nos períodos de 5, 10 e 15 min. com BSS, retinol 10 μM e α -MeAIB- ^{14}C (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$).

Após ser determinada a concentração ótima de retinol (10 μM) através da curva de dose resposta descrita no item anterior, investigou-se o melhor tempo de ação do retinol na captação de aminoácidos. Os resultados mostrados na figura III.2.4, indicam

que o retinol induziu um aumento estatisticamente significativo no transporte de aminoácidos aos 15 min. de incubação.

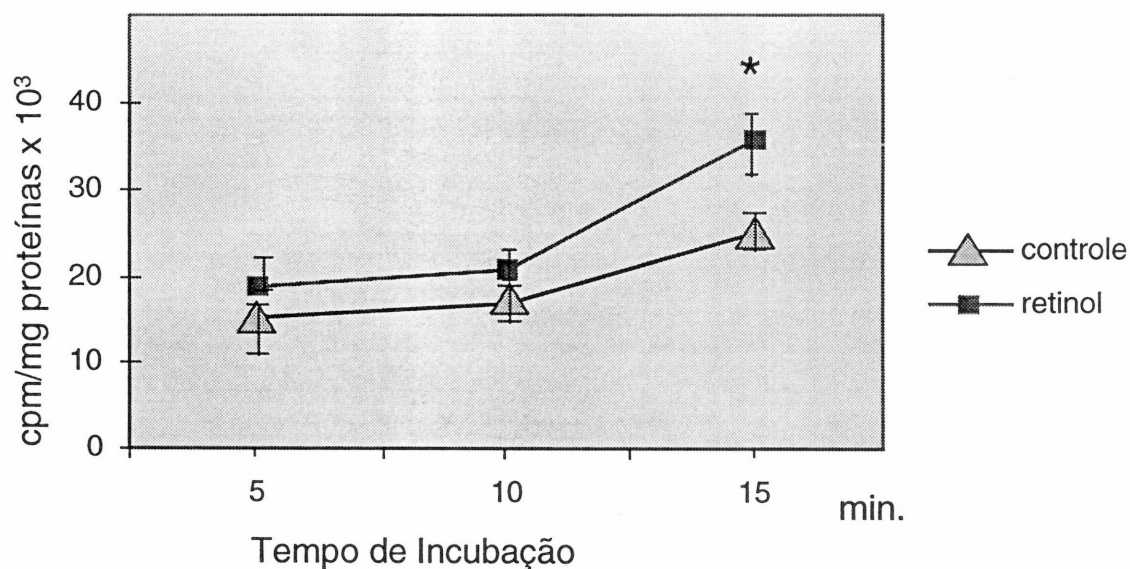


Figura III.2.4. Influência do Tempo de Incubação na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli

Retinol: 10 μM

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 5 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.5. IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS ESTIMULADO POR RETINOL EM TESTÍCULOS "SCE"

Testículos "SCE" de ratos imaturos foram pré-incubados durante 30 min. em KRb ou KRb hipossódico na presença ou não de retinol (20 μM). Logo após, as gônadas foram incubadas por 60 min. nos respectivos meios frescos com ou sem retinol e α -MeAIB- ^{14}C (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$).

Com o objetivo de identificar o sistema de transporte de aminoácidos neutros estimulados por retinol, realizaram-se três experimentos: 1º) Grupo controle - Testículos

"SCE" incubados em KRb e KRb mais retinol (20 μ M); 2º) Grupo hipossódico - Testículos "SCE" incubados em KRb hipossódico e KRb hipossódico mais retinol (20 μ M); 3º) Grupo ouabaína - Testículos "SCE" incubados em KRb ouabaína (100 μ M) e, KRb, ouabaína mais retinol (20 μ M).

A figura III.2.5. mostra que o retinol estimulou significativamente a captação do aminoácido modelo α -MeAIB- 14 C. Esta figura também mostra que em meio hipossódico houve um decréscimo significativo da captação de α -MeAIB- 14 C basal e estimulada por retinol.

A influência da inibição da Na⁺-K⁺-ATPase sobre o transporte de α -MeAIB- 14 C basal e estimulado por retinol foi observada através da pré-incubação por 30 min. em KRb na presença ou não de ouabaína (100 μ M) e retinol (20 μ M). Após o período de pré-incubação, as gônadas foram incubadas por 60 min. com os respectivos meios frescos acrescidos de α -MeAIB- 14 C (0,1 μ Ci/ml). Dos resultados mostrados na figura III.2.5., verifica-se que a ouabaína produziu 29 % de inibição no transporte basal e anulou o efeito estimulatório do retinol sobre a captação de α -MeAIB- 14 C.

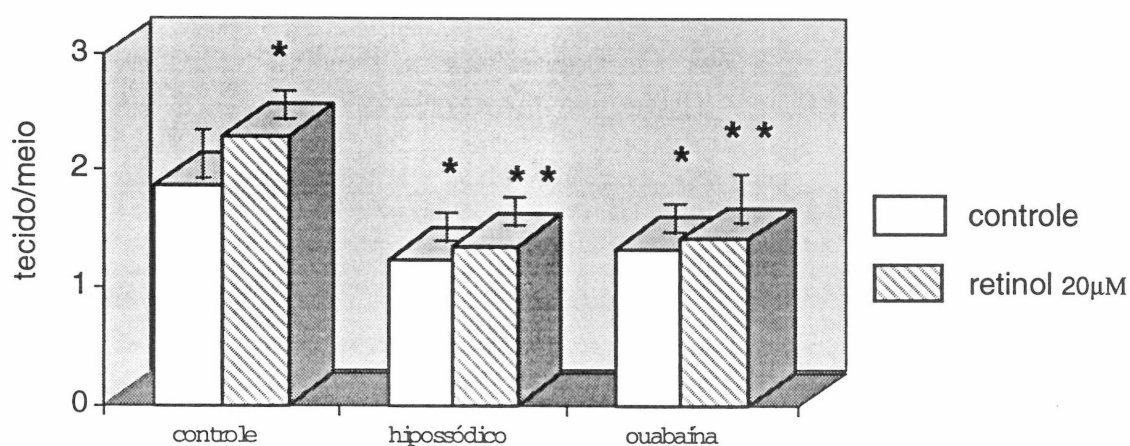


Figura III.2.5. Influência da Inibição do Sistema "A" de Transporte de Aminoácidos no Efeito Estimulatório do Retinol na Captação de α -MeAIB- 14 C em Testículos "SCE"

PI = 30 min. para os grupos retinol, hipossódico e ouabaína.

I = 60 min.

Retinol: 20 μ M

Meio hipossódico: Concentração de Na^+ (25 mM)

Ouabaína: 100 μM

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

** Significativo em relação ao seu grupo controle correspondente.

Os valores representam as médias \pm E.P.M.

Cada grupo consistia de 5 gônadas.

III.2.6. EFEITO DO Co^{++} E DO Ni^{++} SOBRE A AÇÃO ESTIMULATÓRIA DO RETINOL NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM TESTÍCULOS "SCE" DE RATOS IMATUROS

Testículos "SCE" de ratos imaturos foram pré-incubados durante 30 min. em KRb com ou sem retinol (20 μM). Logo após, as gônadas foram incubadas por 60 min. nos respectivos meios frescos com ou sem retinol e $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$).

Com a finalidade de estudar a influência dos bloqueadores de canais de cálcio no efeito estimulatório do retinol na captação de aminoácidos, os seguintes grupos experimentais foram elaborados: 1° e 2°) Controle - Testículos incubados em KRb e KRb mais retinol; 3° e 4°) Cobalto - Testículos incubados em KRb contendo cobalto (1,2 mM) e, KRb contendo cobalto e retinol; 5° e 6°) Níquel - Testículos incubados em KRb contendo níquel (100 μM) e, KRb contendo níquel e retinol.

O efeito dos competidores dos canais de cálcio na ação estimulatória do retinol sobre o transporte de aminoácidos, está representado na figura III.2.6. O cobalto (1,2 mM), reduziu significativamente a captação de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$), estimulada por retinol.

A figura III.2.6. também mostra que o níquel, um bloqueador dos canais de cálcio dependentes da voltagem (tipo "T"), inibiu o efeito do retinol no transporte de aminoácidos neutros.

Observa-se que houve uma marcada redução na resposta do retinol nos grupos cobalto e níquel, enquanto que o transporte basal dos controles correspondentes, mantiveram-se iguais em relação ao grupo controle.

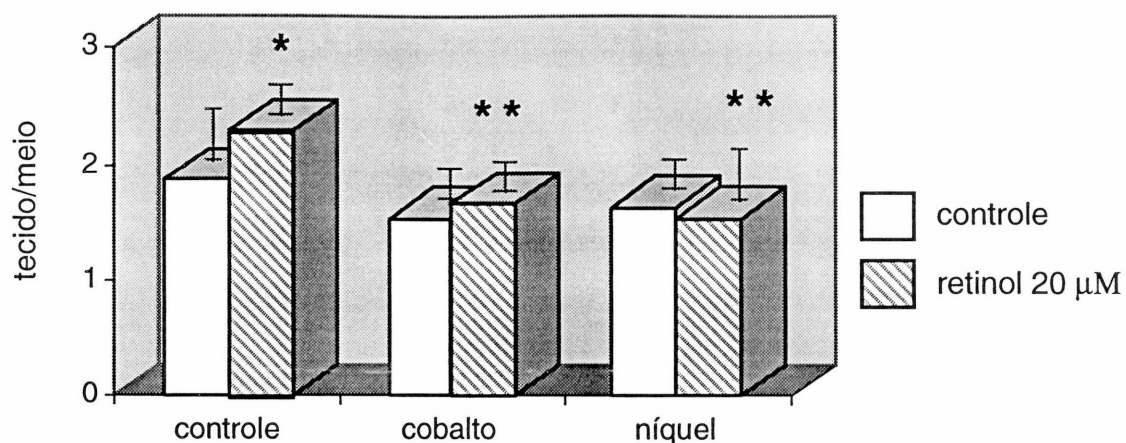


Figura III.2.6. Influência dos Bloqueadores de Canais de Cálcio no Efeito Estimulatório do Retinol na Captação de α -MeAIB- 14 C em Testículos "SCE"

PI = 30 min. para os grupos retinol, cobalto e níquel.

I = 60 min.

Retinol: 20 μ M

Cobalto: 1,2 mM e Níquel: 100 μ M

III.2.7. EFEITO DO RETINOL SOBRE A INCORPORAÇÃO DE LEUCINA- 14 C EM PROTEÍNAS

Células de Sertoli provenientes de testículos "SCE" de ratos de 15 dias de idade, foram cultivadas por 24 h em meio 199 com 1% de SFB e por mais 48 h em meio 199 sem soro, sempre em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 34 °C (como descrito no capítulo materiais e métodos).

Para estudar o estímulo da incorporação de leucina- 14 C a proteínas em culturas de células de Sertoli expostas ao retinol 10 μ M por diferentes períodos, elaboraram-se os grupos a seguir: 1º) Quatro culturas foram usadas para medir a síntese protéica basal incubadas 15 min. com leucina- 14 C (0,2 μ Ci/ml); 2º) Outros seis grupos contendo quatro culturas, cada grupo foi tratado com retinol (10 μ M) por períodos de 15, 30, 60, 180, 360 e 720 min., respectivamente. Após o período de pré-incubação, um meio novo com BSS contendo leucina- 14 C (0,2 μ Ci/ml) foi utilizado para incubar por 15 min. todos os grupos previamente tratados com retinol.

Como demonstrado na figura III.2.7. a exposição contínua de retinol levou a um aumento agudo da síntese protéica variando nos diferentes períodos de 224 a 303% em relação aos níveis basais. O efeito estimulatório do retinol na síntese protéica é observado a partir dos 15 min. de tratamento e, é máximo por volta das 3 h, mantendo-se nesse nível até 12 h de pré incubação. Levando em conta os períodos longos de tratamento que estudamos com FSH e retinol, tanto para o estudo de síntese protéica como para a análise da segunda fase do transporte de aminoácidos, surgiu a pergunta se essas células incubadas por períodos longos (mais de 2 h) em BSS não estariam em jejum celular aumentando por essa razão (Guidotti et al., 1978) o transporte ou a síntese protéica. Nas culturas basais (sem retinol), as células de Sertoli mantinham uma taxa relativamente constante de síntese protéica (variando nas diferentes culturas entre 10 e 15% nos períodos de 15 a 6 h). Figura III.2.7.B.

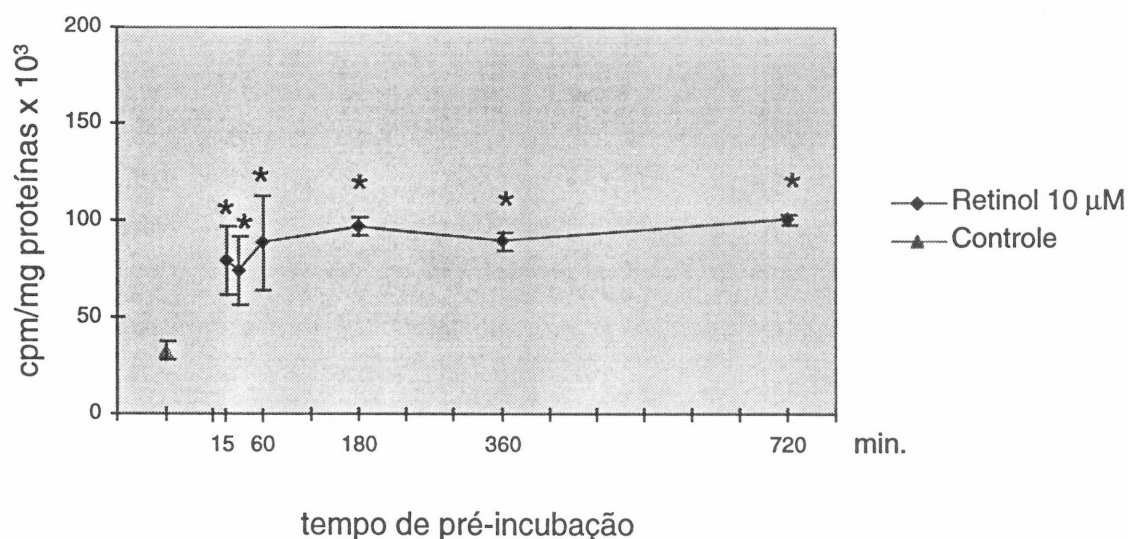


Figura III.2.7.A. Efeito do Retinol Sobre a Incorporação de Leucina-¹⁴C em Proteínas de Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

Retinol: 10 μM

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

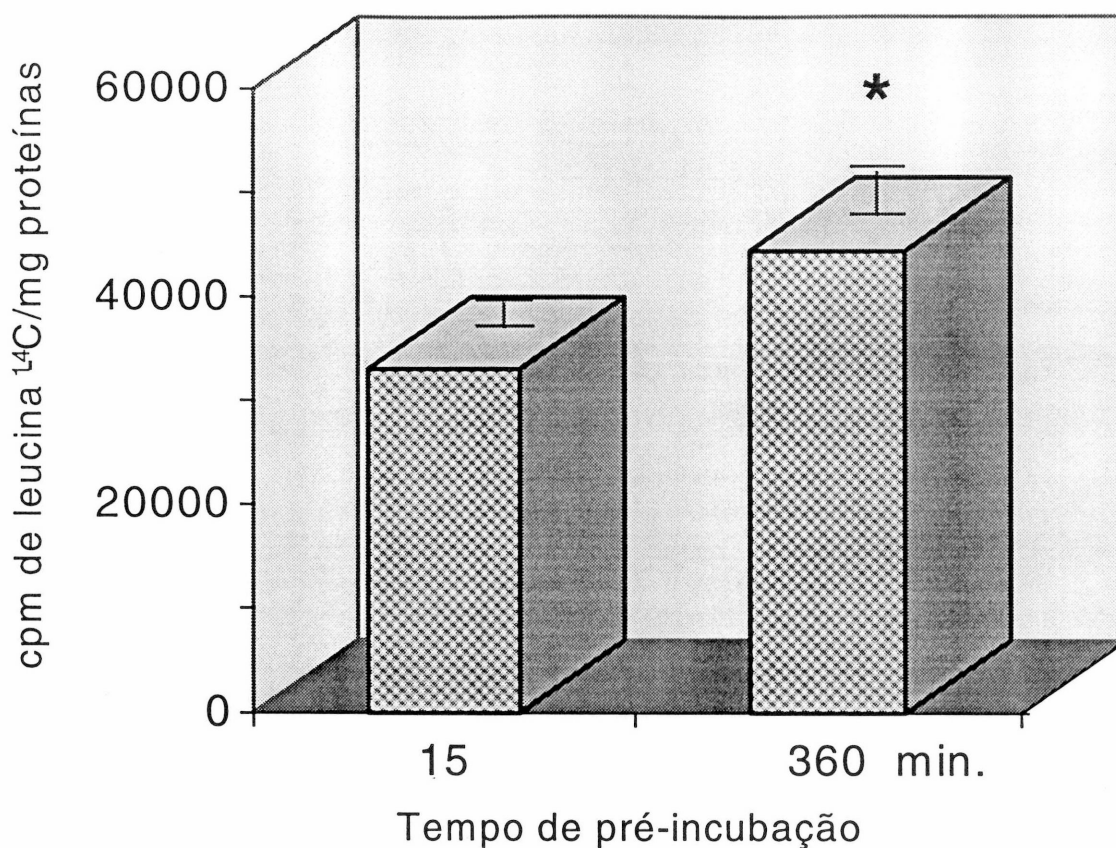


Figura III.2.7.B. Efeito do Tempo de Pré-Incubação em BSS na Incorporação de Leucina-¹⁴C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

* Significativo em relação ao grupo pré-incubado por 15 min., $p < 0,05$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.8. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CICLO-HEXIMIDA NA SÍNTESE PROTÉICA E NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

Levando em consideração os objetivos do trabalho, em relação ao mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos, fêz-se necessário investigar a influência da ciclo-heximida na inibição da síntese protéica sobre o transporte estimulado por retinol. Para tanto, organizaram-se os seguintes grupos:

A) Inibição da síntese protéica em culturas de células de Sertoli. 1º) Grupo controle - culturas incubadas com BSS e leucina - ¹⁴C (0,2 μ Ci/ml); 2º) Grupo ciclo-heximida

(10 $\mu\text{g/ml}$ - Culturas de células de Sertoli pré-incubadas por 1 h com ciclo-heximida e incubadas por 15 min. com ciclo-heximida e leucina - ^{14}C preparados em BSS.

B) Efeito da ciclo-heximida no transporte basal de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ em culturas de células de Sertoli: 1º) Grupo controle - culturas incubadas com BSS e $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$); 2º) Grupo ciclo-heximida - Culturas pré-tratadas 1 h com ciclo-heximida (10 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas em meio fresco com ciclo-heximida e $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ por 15 min.

A figura III.2.8.A. apresenta a incorporação de leucina - ^{14}C em proteínas fortemente inibida por ciclo-heximida. Nestas circunstâncias a ciclo-heximida bloqueou a síntese protéica em 95 %. O transporte basal de aminoácidos ($\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$) na figura III.2.8.B., foi inibido em aproximadamente 30 % analisado em condições semelhantes a da síntese protéica (PI= 1 h com ciclo-heximida e I= 15 min. com ciclo-heximida 10 $\mu\text{g/ml}$).

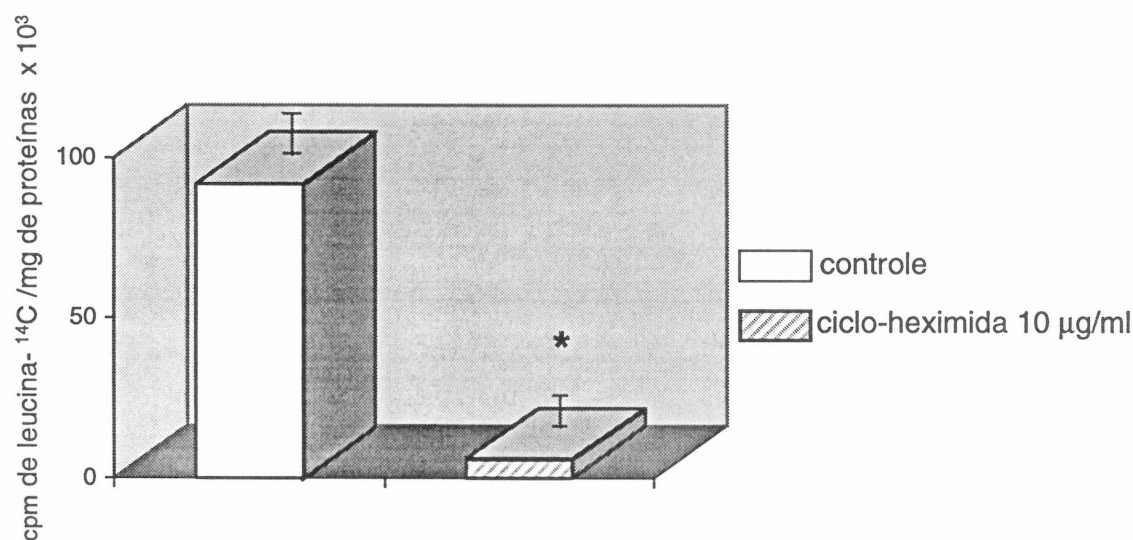


Figura III.2.8.A. Inibição da Síntese Protéica em Culturas de Células de Sertoli

PI = 1 h para o grupo tratado com ciclo-heximida (10 $\mu\text{g/ml}$).

I = 15 min. com leucina- ^{14}C (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$)

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,001$.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 6 culturas de uma mesma preparação celular.

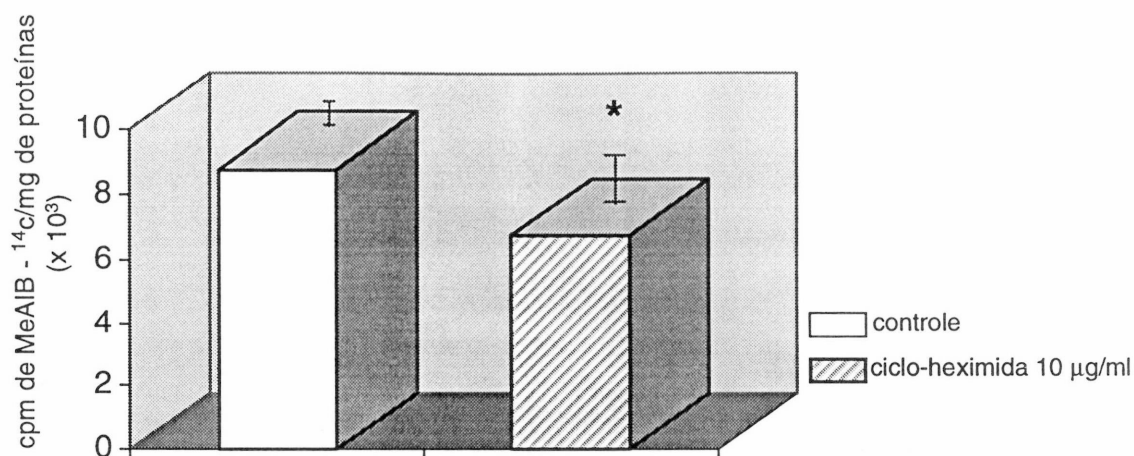


Figura III.2.8.B. Efeito da Ciclo-Heximida no Transporte Basal de α -MeAIB¹⁴C em Culturas de Células de Sertoli

PI = 1 h com ciclo-heximida (10 µg/ml)

I = 15 min. com α -MeAIB-¹⁴C (0,2 µCi/ml)

* Significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.9. EFEITO DA CICLO-HEXIMIDA NA AÇÃO DO RETINOL NO TRANSPORTE DE α -MeAIB-¹⁴C

A fim de determinar se a síntese protéica estava envolvida no mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos, foi primeiramente caracterizado uma dose de ciclo-heximida efetiva na inibição da síntese protéica e na inibição do transporte de aminoácidos basal (figura III.2.8.A e B) e, o tempo necessário para observar este fenômeno. A partir destes dados, os seguintes grupos experimentais foram estudados: 1º) Grupo controle - culturas de células de Sertoli incubadas em BSS com α -MeAIB-¹⁴C (0,2 µCi/ml); 2º) Grupo retinol - células incubadas com retinol (10 µM) e o aminoácido α -MeAIB-¹⁴C; 3º) Grupo ciclo-heximida - culturas de células de Sertoli pré-incubadas 1 h com ciclo-heximida (10 µg/ml) e incubadas em meio novo com ciclo-heximida e α -MeAIB-¹⁴C; 4º) Grupo retinol mais ciclo-heximida - culturas de células

de Sertoli pré-tratadas por 1 h com ciclo-heximida e incubadas em meio fresco com ciclo-heximida, retinol e α -MeAIB- ^{14}C .

A ciclo-heximida (10 $\mu\text{g/ml}$) foi efetiva na redução (37,5 %) da captação de α -MeAIB- ^{14}C em culturas de células de Sertoli não tratadas com retinol. Pode também ser observado nesta figura (III.2.9.), que o tratamento prévio com ciclo-heximida não influenciou o efeito estimulatório rápido (15 min.) do retinol mesmo quando adicionada nas culturas 1 h antes do retinol.

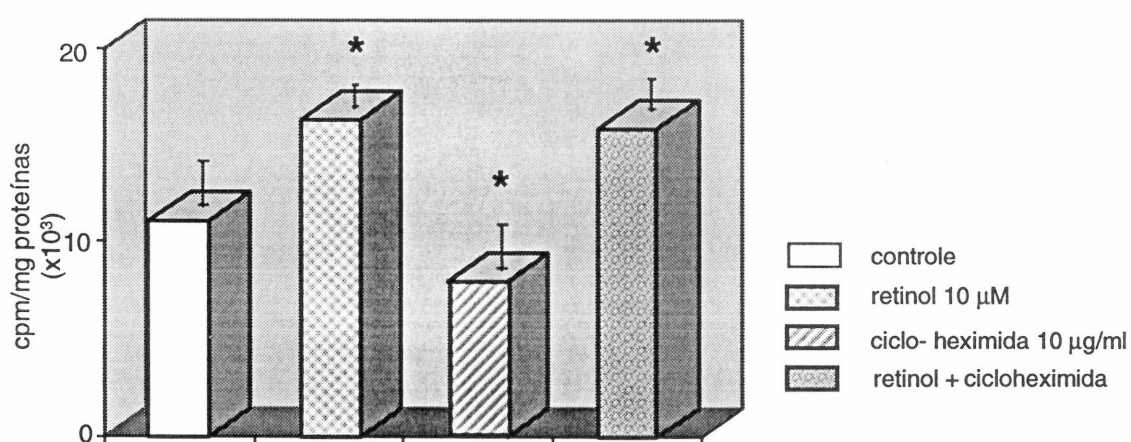


Figura III.2.9. Efeito da Ciclo-Hexamida na Ação do Retinol no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C

PI = 1 h para os grupos tratados com ciclo-heximida

I = 15 min.

Retinol: 10 μM

Ciclo-Hexamida: 10 $\mu\text{g/ml}$

* Significativo em relação ao controle, $p < 0,01$.

** Significativo em relação ao grupo ciclo-hexamida

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 5 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.10. INFLUÊNCIA DO TEMPO LONGO DE TRATAMENTO COM RETINOL NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

O efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácidos tanto em testículos "SCE" como em culturas de células de Sertoli provenientes de testículos "SCE", previamente apresentados nesse trabalho, demonstraram o efeito rápido do retinol os quais foram analisados em períodos de incubação entre 15 min. e no máximo 90 min.

Na série de experimentos demonstrados na figura III.2.10. analisou-se o efeito da pré-incubação com retinol (10 μ M) no transporte de aminoácidos em culturas de células de Sertoli.

Os períodos de pré-incubação com retinol variaram de 15min. até 12 h. O transporte de aminoácidos foi analisado através da incubação das células por 15 min. com α -MeAIB- 14 C em BSS sem a presença de retinol.

Os dados mostrados na figura III.2.10. revelam que o tratamento com retinol não alterou o transporte de aminoácidos com relação a captação basal em nenhum dos tempos estudados.

Estes resultados demonstram que o transporte de aminoácidos estimulado por retinol é monofásico e corrobora a hipótese do efeito imediato do retinol na membrana ou na superfície da membrana plasmática. O tratamento longo com retinol (mais de 1 h), não influenciou no transporte de aminoácidos.

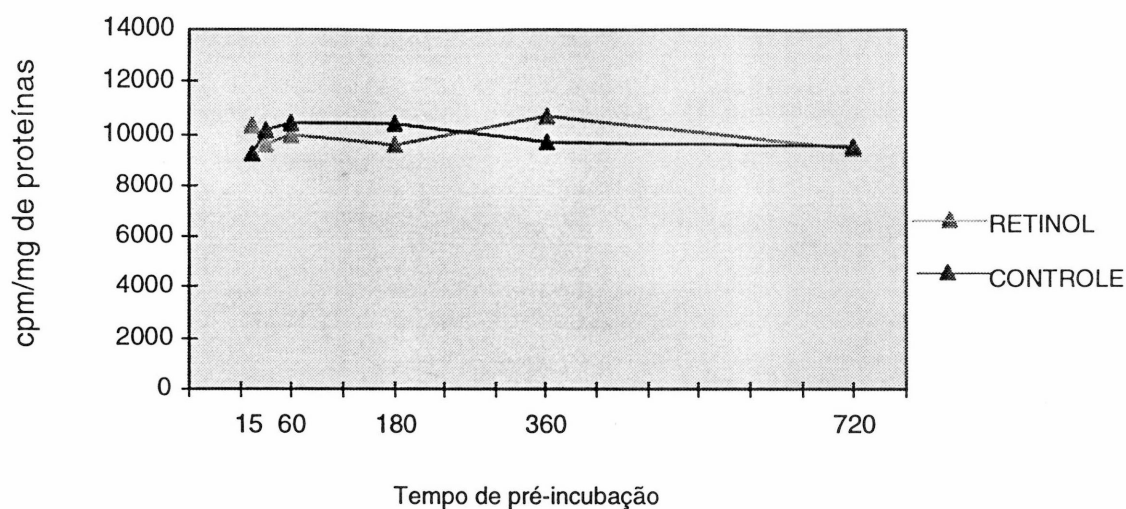


Figura III.2.10. Influência do Tempo de Pré-Incubação com Retinol no Transporte de α -MeAIB¹⁴C em Culturas de Células de Sertoli Incubadas por 15 min. sem Retinol

Retinol: 10 μ M

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.11. EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL E FSH NO TRANSPORTE DE α -MeAIB-¹⁴C EM CULTURAS "SCE"

Com a finalidade de analisar o efeito aditivo do retinol e do FSH no transporte de aminoácidos já que ambas substâncias estimulam o transporte nas condições experimentais aqui descritas. Foi acrescentado em cada grupo 0,2 μ Ci/ml de α -MeAIB-¹⁴C. Os seguintes grupos experimentais foram estudados: 1º) Controle - culturas de células de Sertoli incubadas com BSS; 2º e 3º grupos) Grupo FSH 0,1 mU/ml e grupo FSH 0,4 mU/ml - células incubadas com BSS, FSH 0,1 mU/ml e FSH 0,4 mU/ml, respectivamente; 4º) Grupo retinol - culturas de células de Sertoli incubadas com BSS e retinol na concentração de 10 μ M; 5º e 6º) Grupos retinol mais FSH 0,1 mU/ml e retinol mais FSH 0,4 mU/ml - As culturas foram incubadas com BSS contendo retinol (10 μ M) e FSH 0,1 mU/ml ou retinol e FSH 0,4 mU/ml mais o aminoácido modelo.

Os dados desta figura (III.2.11), mostram o efeito estimulatório do FSH (ambas as doses) e, do retinol no transporte de aminoácidos estatisticamente significativos em relação a captação basal. Por outro lado, o efeito do retinol no transporte de aminoácidos nas células de Sertoli não é aditivo nem para a dose mais responsiva no transporte nestas células nem com a dose máxima de FSH utilizada para o estudo desse parâmetro.

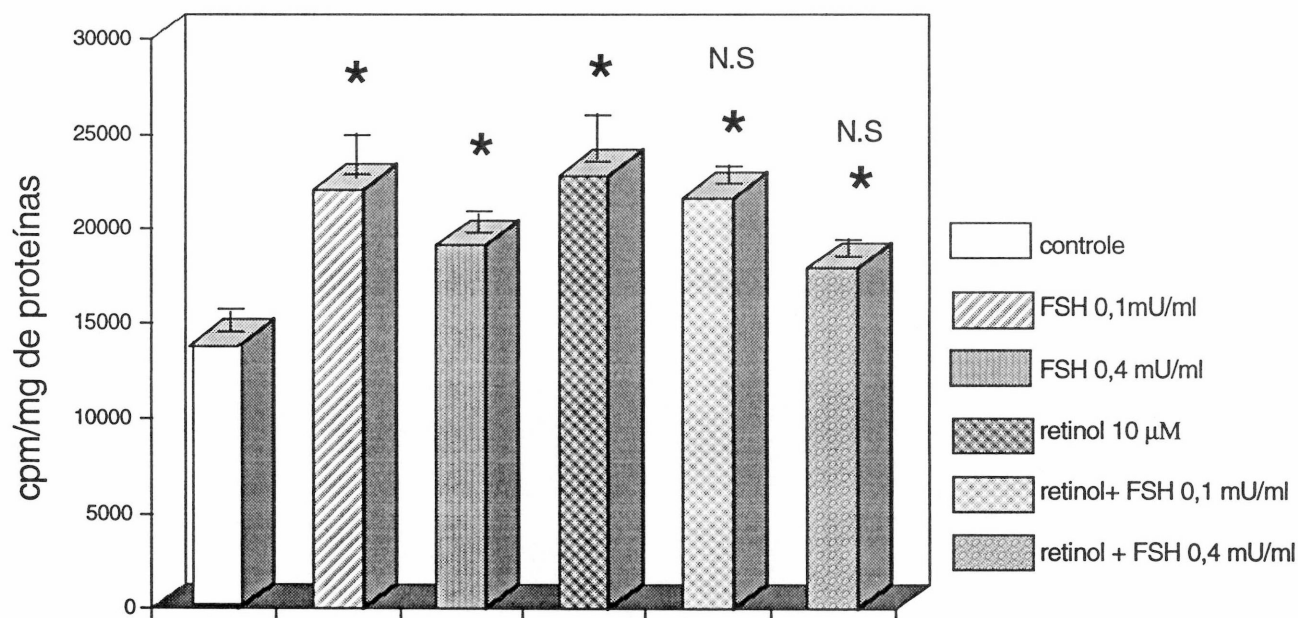


Figura III.2.11. Efeito Não-Aditivo da Ação do Retinol e FSH no Transporte de α -MeAIB- ^{14}C em Culturas de Células de Sertoli

I = 15 min.

FSH de suínos NIH

* Significativo em relação ao grupo controle.

N.S.: Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo FSH correspondente.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

III.2.12. AÇÃO DO RETINOL NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM TESTÍCULOS "SCE" DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL

Com a finalidade de esclarecer alguns aspectos do mecanismo de transporte de aminoácidos regulados por retinol estudou-se, a dependência da maturação testicular na captação de α -MeAIB- ^{14}C .

Testículos "SCE" de ratos de 15, 30 e 35 dias de idade, foram pré-incubados por 30 min. em KRb contendo retinol (20 μM). Após este período, um meio novo com retinol e α -MeAIB- ^{14}C (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) foi utilizado para incubar as gônadas por mais 60 min. Para avaliar a provável influência da idade do animal na ação do retinol sobre o transporte de aminoácidos, foram estudados três grupos de animais de diferentes idades:

- a) Com testículos "SCE" de ratos de 15 dias de idade
- b) Com testículos "SCE" de ratos de 30 dias de idade
- c) Com testículos "SCE" de ratos de 35 dias de idade

A figura III.2.12. mostra a captação de α -MeAIB- ^{14}C em testículos "SCE" de ratos de 15, 30 e 35 dias de idade. A administração de retinol (20 μM) por um período de 90 min. (PI = 30 min. e I = 60 min.), produziu um marcado e significativo aumento na captação de aminoácidos em testículos de ratos imaturos (15 dias de idade). A taxa de captação do aminoácido marcado em testículos de ratos de 30 e 35 dias de idade caiu drasticamente tanto nos grupos controles como nos tratados.

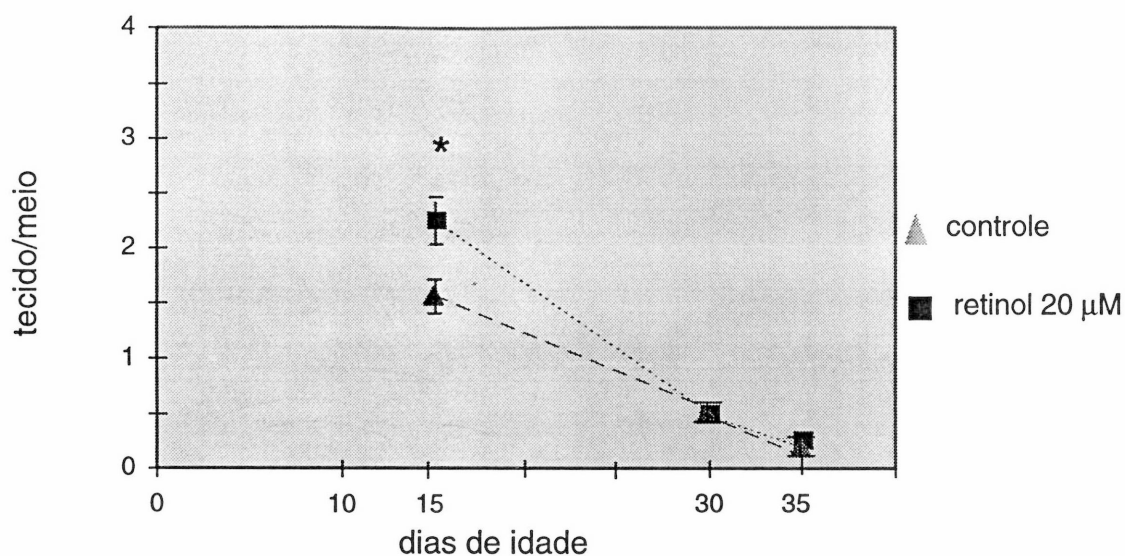


Figura III.2.12. Efeito do Retinol no Transporte de Aminoácidos Neutros em Testículos de Ratos Durante a Maturação Sexual

PI = 30 min. para o grupo retinol.

I = 60 min.

Retinol: 20 µM

Os valores representam as médias \pm E.P.M.

Cada grupo consistia de 5 gônadas

* Significativo em relação ao grupo controle correspondente

III.2.13. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE α -MeAIB- 14 C EM TESTÍCULOS "SCE"

Quatro ratos de 13 dias de idade (da mesma ninhada), foram injetados com propionato de testosterona (2 mg/Kg corporal), por 48 h. Após este tratamento, os testículos foram removidos por incisão abdominal, pesados e pré-incubados por 60 min. com 4 µM de testosterona previamente diluída em KRb conforme descrito em materiais e métodos. Um meio novo contendo testosterona e α -MeAIB- 14 C (0,2 µCi/ml) foi utilizado para incubar as glândulas por mais 60 min. Com o objetivo de testar o efeito da testosterona no transporte de aminoácidos foram realizados os seguintes grupos: 1º) Grupo controle - animais não tratados com propionato de testosterona e incubados com

KRb mais α -MeAIB- ^{14}C ; 2º) Grupo testosterona - animais que foram tratados com testosterona e foram incubados com testosterona mais α -MeAIB- ^{14}C .

A figura III.2.13. mostra que os testículos dos animais submetidos a tratamento crônico com propionato de testosterona não exibiram nenhum efeito estimulatório no transporte quando foram incubados por 60 min. com α -MeAIB- ^{14}C . Observou-se um aumento do peso testicular de 15 % após o tratamento com testosterona em relação aos animais controles. Também esses animais tratados exibiram um aumento no peso da vesícula seminal após as 48 h de tratamento (resultados não apresentados).

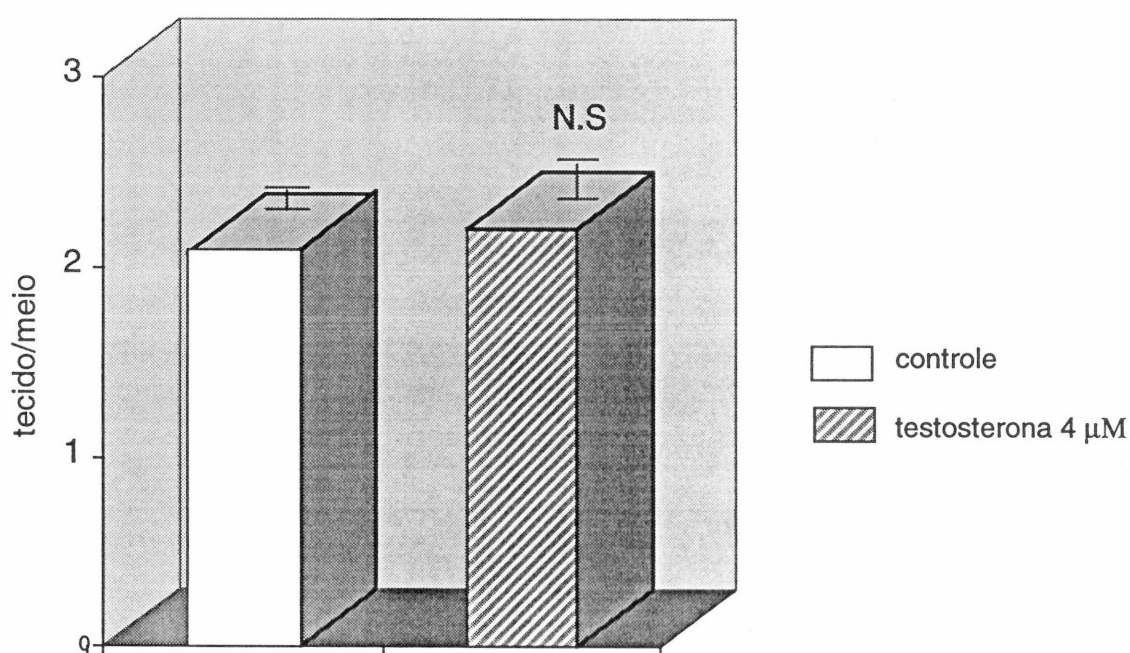


Figura III.2.13. Efeito do Tratamento Crônico com Testosterona na Captação de α -MeAIB- ^{14}C em Testículos "SCE" de Ratos Imaturos

PI = 60 min. para o grupo testosterona

I = 60 min.

N.S.: Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Os valores representam as médias \pm E.P.M.

Cada grupo consistia de 4 gônadas.

III.2.14. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO E AGUDO COM TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM CULTURAS "SCE" DE RATOS IMATUROS

Com o objetivo de analisar o efeito da testosterona ($2 \mu\text{M}$), nesse sistema de ensaio, um tratamento crônico e um agudo foi realizado para testar este hormônio. Todos os grupos continham $0,2 \mu\text{Ci/ml}$ de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$. 1º) Grupo controle - um grupo de 5 culturas foi incubado com BSS; 2º) Grupo tratamento crônico - um grupo de cinco culturas foi pré-incubado com testosterona $2 \mu\text{M}$ por 3 h e incubados por mais 15 min. com BSS fresco contendo testosterona; 3º) Grupo tratamento agudo - um grupo de cinco culturas foi pré-incubado com testosterona $2 \mu\text{M}$ por 10 min. e incubado com BSS novo contendo testosterona.

A partir dos dados apresentados na figura III.2.14., pode-se observar que a administração de testosterona crônica ou aguda, não teve qualquer efeito sobre o transporte do aminoácido modelo $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ em culturas de células de Sertoli provenientes de testículos "SCE" de ratos de 15 dias de idade.

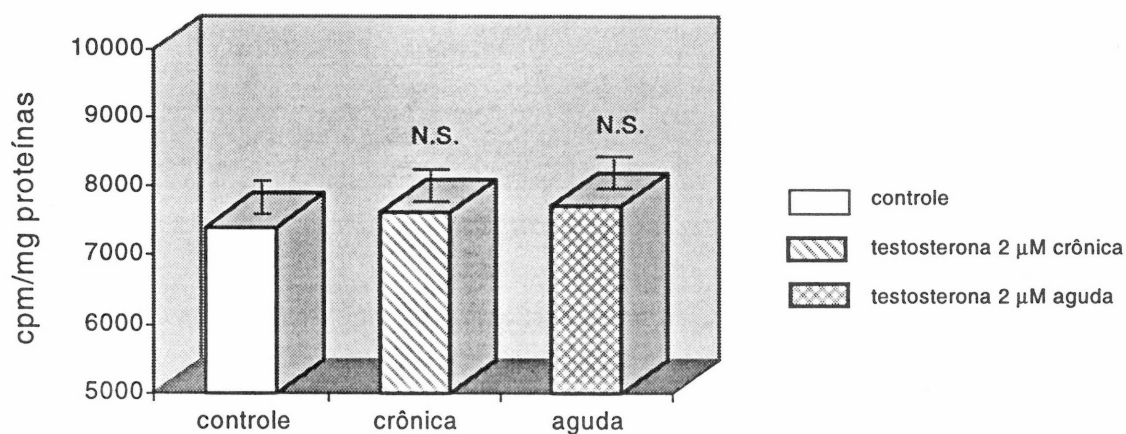


Figura III.2.14. Efeito do Tratamento Crônico e Agudo com Testosterona na Captação de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$ em Culturas Provenientes de Testículos "SCE" de Ratos Imaturos

PI = 10 min. para o grupo testosterona aguda

PI = 3 h para o grupo testosterona crônica

I = 15 min.

N.S.: Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 5 culturas de uma mesma preparação celular.

IV DISCUSSÃO

O testículo é um órgão endócrino-responsivo que requer importantes interações para a manutenção, controle do crescimento e diferenciação celular. A existência dos diferentes tipos celulares e sua potencial interação implica que as ações dos agentes endócrinos e nutricionais não envolvem simplesmente um único hormônio ou uma única célula .

Tem sido demonstrado para muitos órgãos e tecidos (Skinner, 1991) que os procedimentos de cultura de células tem gerado significantes avanços nos aspectos celulares e moleculares das funções biológicas. Sendo assim, os experimentos dessa tese foram efetuados utilizando-se testículos enriquecidos em células de Sertoli “SCE” e, um tipo celular individual - células de Sertoli - foi subsequentemente isolado e cultivado para fornecer informações mais fidedignas relacionadas com a resposta e o mecanismo de ação do FSH e do retinol em células de Sertoli altamente purificadas .

Parte I

IV. 1 . Mecanismo de ação do FSH

Os experimentos realizados por Irusta e Wassermann, 1974 e Perez- Sanches e Wassermann, 1981 demonstraram que o FSH estimula o transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos e, este efeito pode ser observado a partir do 5º dia de idade e desaparece em torno do 25º dia de idade. A relação entre a ação do FSH sobre o transporte de aminoácidos e a idade do animal também foi observada por Sickle et al, 1981 e Ozza et al , 1982 em testículos de camundongos.

O sistema “A”, energizado pelo menos em parte, pelo gradiente eletroquímico do sódio (Christensen et al., 1973), tem a principal característica de funcionar somente por transporte ativo e ser um sistema sensível a hormônios (Shotwell et al., 1983). Cruz Curte e Wassermann em 1985 identificaram o sistema "A" como responsável pelo transporte de aminoácidos neutros estimulados por FSH em testículos de ratos imaturos. O mesmo foi descrito para a insulina, prolactina e andrógenos em diversos tecidos (Wassermann et al.,

1989b; Rillema et al., 1992; Mills e Feit, 1976 e Koenig et al., 1982), que entre outros, estimulam a captação de aminoácidos neutros ativando a cinética de transporte através do sistema “A”.

Para a análise dos estudos do mecanismo de ação do FSH no transporte de aminoácidos foram utilizados ratos adultos hipofisectomizados ou testículos inteiros de ratos imaturos normais ou irradiados (“SCE”), previamente tratados “*in vivo*” com o hormônio (Irusta e Wassermann, 1974; Wassermann et al., 1989a; Perez-Sanches e Wassermann, 1981). Também a utilização de testículos inteiros ou túbulos seminíferos “SCE” de ratos imaturos tratados “*in vitro*” com FSH, demonstraram o efeito estimulatório do hormônio no transporte de aminoácidos (Wassermann et al., 1992 a e b). Através desses diferentes métodos algumas respostas significativas da regulação hormonal do transporte de aminoácidos neutros no testículo foram obtidas.

Os trabalhos de Wassermann et al., 1989a, 1990 e 1992a e b, demonstraram que o transporte de aminoácidos basal ou estimulado por FSH ocorre em níveis absolutos mais baixos quando a síntese protéica ou glicoprotéica é inibida por ciclo-heximida ou tunicamicina ou, quando os microtúbulos são despolimerizados com colchicina. Entretanto, o aumento proporcional do transporte de aminoácidos produzido por FSH foi mantido. O bloqueio dos canais de cálcio dependentes da voltagem, com verapamil ou através da inibição competitiva dos canais iônicos bivalentes (Co^{++} ou Ni^{++}), anularam a ação estimulatória do FSH no transporte de aminoácidos. Também a quinina, que bloqueia canais de K^+ dependentes de ATP, aboliu a ação do FSH.

Por outro lado, em experimentos electrofisiológicos foi demonstrado que a aplicação tópica de FSH (4 mU/ml), produziu um efeito bifásico caracterizado por uma hiperpolarização seguida de uma despolarização. O efeito despolarizante do FSH foi prolongado e potenciado na presença de aminoácidos (MeAIB, 5 mmol/l) e, o verapamil na dose que anulou a ação estimulatória do FSH no transporte de aminoácidos, suprimiu o efeito despolarizante do FSH. Desses resultados foi concluído que em testículo de ratos imaturos o FSH estimula o

transporte de aminoácidos através de um mecanismo envolvendo os canais de cálcio dependentes da voltagem e canais de potássio sensíveis ao ATP e que o FSH produz mudanças eletrofisiológicas que medeiam a ação estimulatória no transporte de aminoácidos (Wassermann et al., 1992a e b).

Cabe salientar, no entanto, que tanto para a pesquisa da ação direta do FSH na célula alvo no testículo, como para a verificação do efeito rápido (minutos) e tardio (em horas), no transporte de aminoácidos o cultivo de células de Sertoli torna-se imprescindível.

Com o objetivo de estudar a ação do FSH no transporte de aminoácidos na célula alvo testicular, bem como, a sensibilidade de culturas de células de Sertoli ao tratamento hormonal foram utilizados hormônios de diferentes espécies e graus de pureza. Estes resultados demonstraram que o FSH de ovinos-Sigma, FSH de ratos, suínos e de ovinos- NIH, estimularam o transporte de α -MeAIB- ^{14}C em culturas de células de Sertoli. No entanto, observa-se que as diferentes amostras atuaram de maneira mais ou menos potente.

A captação de aminoácidos obtidos com FSH de ovinos da Sigma responde sensivelmente desde a menor dose utilizada mostrando-se ótima na dose máxima durante um período extremamente curto de tratamento hormonal. De maneira semelhante foi analisado o efeito do FSH de suínos e de ovinos do NIH onde, claramente observou-se a maior sensibilidade das células ao transporte quando estas foram tratadas com FSH suíno. Estes resultados refletem não só uma influência do grau de pureza dos hormônios, semelhantes aos descritos para vários ensaios (Dorrington e Armstrong, 1975; Jia e Hsueh, 1985; Padmanabhan, 1987; Toebosch et al., 1989 e Shen e Yu, 1991) mas, também a sensibilidade do método ao hormônio no transporte de aminoácidos neutros. A resposta no transporte de aminoácidos, estimulados por FSH anteriormente demonstrados com testículos inteiros, evidenciaram significativamente a resposta ótima do hormônio com tempos e doses bem maiores (Wassermann et al., 1989a, 1990, 1992a e b).

Para melhorar a sensibilidade, vários bioensaios “*in vitro*” para os FSHs tem sido desenvolvidos para extratos de hipófise ou para preparações purificadas (Boggis e Ryle,

1972; Rao e Ramachandran, 1975; Dorrington e Armstrong, 1975; Padmanabhan et al., 1987; Van Damme et al., 1979).

Foi analisado o efeito do FSH de diferentes origens e espécies numa única concentração em culturas de células de Sertoli de uma mesma preparação celular. Os resultados obtidos neste experimento confirmam os anteriormente obtidos e ressalta o fato que além das distintas espécies animais de onde foi isolado o hormônio, há uma marcada diferença de potência relativa do hormônio sob o estímulo no transporte de aminoácidos.

Várias propostas de bioensaio para o FSH "*in vitro*" baseados na formação de estradiol, produção de AMPc, produção do ativador de plasminogênio (Shen e Yu, 1991; Rao e Ramachandran, 1975; Beer e Strickland, 1978) etc, relatam um bioensaio rápido, sensível e preciso, entretanto, a sensibilidade dos sistemas mais simples apresentados é em torno de 0,17 mU para o FSH extraído de hipófise de humanos (Shen e Yu, 1991). Por outro lado, a avaliação desses resultados extrapolados para um sistema fisiológico exige muita prudência já que a própria glândula hipofisária regula não somente a quantidade de FSH mas o tipo e a potência desta molécula (Chappel et al., 1983).

Entre os vários aspectos citados na literatura para explicar as divergências em relação a potência do FSH podemos enunciar: a) alteração no conteúdo de ácido siálico da molécula de FSH influencia a atividade da ligação ao receptor, a atividade biológica e a meia vida da molécula de FSH no plasma; b) o ambiente hormonal pode influenciar a quantidade e o tipo de FSH sintetizado e secretado pela hipófise; c) a existência de uma família heterogênea de moléculas de FSH que exibem uma atividade biológica "FSH-like", entretanto, cada forma individual exibe uma meia vida no plasma e uma habilidade potencial e peculiar de se ligar ao receptor de cada molécula; d) dentro da hipófise existe pelo menos seis formas de FSH, cada uma com um ponto isoelétrico diferente o que reflete uma carga líquida da molécula diferente em um mesmo pH (Chappel et al., 1983). Portanto, é difícil traduzir essas diferenças bioquímicas que fisiologicamente se expressam com grandes discrepâncias tornando complexa a análise de uma hipótese trabalhada.

O FSH e o LH são gonadotrofinas que exercem efeitos diferentes nas gônadas para regular e manter os processos reprodutivos. Tem sido descrito uma série de eventos fisiológicos iniciados e mantidos por essas duas gonadotrofinas (Chappel et al., 1983; Ultee-van Gessel et al., 1987; Teerds et al., 1989), entretanto, é difícil estabelecer os efeitos específicos do FSH e LH no testículo devido a heterogeneidade natural dessas moléculas e o grau de variabilidade na ligação ao receptor e expressão da potência biológica. Um dos maiores problemas envolvidos na determinação da bioatividade do FSH e do LH na função das células de Sertoli ou da granulosa é a difícil separação dessas duas gonadotrofinas.

Foi visto que o FSH e o LH altamente purificados, sozinhos ou em combinação tem efeitos na função testicular. Um aumento relativamente maior no peso testicular de ratos foi observado após três semanas de tratamento diário com FSH e LH (Ultee-van Gessel, et al., 1987). Este efeito, provavelmente reflete um aumento no número de células de Sertoli e no comprimento dos túbulos seminíferos. Estas observações confirmam os dados obtidos em testículos de ratos e camundongos imaturos (Leidl e Hansel, 1972; Bentrley et al., 1978; Davies, 1976; Meyers e Swanson, 1983). Davies, 1976, também relatou um aumento do citoplasma da célula de Sertoli e um significativo aumento na massa do tecido intersticial causado pelo FSH e um consequente sinergismo do efeito do FSH após injeção de LH.

Em culturas de células de Sertoli de ratos imaturos o FSH ou DBAMPc estimulam a secreção de ABP, entretanto, nenhum efeito é observado após o tratamento dessas células com LH (Romerts et al. 1978). Ainda que o LH estimule o ativador de plasminogênio em células da granulosa (Ny et al., 1985), esta estimulação tem sido mostrada depender de outros fatores como por exemplo: uma pré-incubação "*in vivo*" ou "*in vitro*" com FSH, bem como, um período de estimulação com o hormônio. Wang e Leung, 1983 demonstraram claramente que preparações purificadas de LH falharam em estimular a produção do ativador de plasminogênio na granulosa. Entretanto, um pré-tratamento com FSH purificado, "*in vivo*" ou "*in vitro*", induz a responsividade das células de Sertoli ao LH.

Utilizando culturas enriquecidas em células de Sertoli (“SCE”) e amostras de FSH e LH altamente purificados (NIH), analisamos o efeito do FSH e do LH no transporte de aminoácidos. A não responsividade das células de Sertoli ao LH em qualquer das doses utilizadas, diferente do observado para o FSH; pode ser explicado pela especificidade da cadeia do FSH para a ligação no receptor na sua célula alvo e, ao alto grau de pureza do hormônio FSH (Chappel et al., 1983).

Os resultados com FSH “*in vitro*” em testículos inteiros demonstraram que o efeito estimulatório dessa gonadotrofina no transporte de aminoácidos (Cruz Curte e Wassermann, 1985) é realizado através de um mecanismo independente da síntese protéica (Wassermann et al., 1989a), entretanto, embora esta metodologia expresse fortes semelhanças com o estado fisiológico, não foi possível estudar o efeito do FSH no transporte de aminoácidos e na síntese protéica por períodos além de 2 h. Para tanto, o cultivo de células de Sertoli para a análise do efeito do FSH em períodos prolongados (mais de 2 h) ou imediatos (minutos) revelou ser um método adequado para esses estudos.

Usando culturas de células de Sertoli provenientes de testículos “SCE” e um tratamento pulsátil (de 2 em 2 h) com FSH (de 15 min. até 12 h), mantendo-se a concentração do hormônio, observamos que o transporte de aminoácidos basal ou estimulado mostrou-se invariável independente do tempo de tratamento hormonal. Estes resultados demonstram que o transporte de aminoácidos estimulado por FSH é monofásico e reforça a hipótese anterior do efeito membrana do FSH na captação de aminoácidos neutros (Wassermann et al., 1992a).

Tem sido demonstrado que o FSH exerce um efeito bifásico na secreção de transferrina: um aumento rápido e imediato seguido por um declínio e então uma resposta secundária mais prolongada. Esta ação do FSH foi observada em células de Sertoli cultivadas em matriz e a quantidade de transferrina secretada durante o período total de tratamento (22 h) foi semelhante a transferrina secretada em 4 h em resposta a exposição do hormônio (Jakubowiak et al., 1988).

Por outro lado, nos resultados apresentados nesta tese, o aumento da síntese protéica em resposta ao FSH, após 3 h de tratamento, manteve-se ativo durante todo o período estudado (12 h), confirmando que o FSH na mesma dose e tratamento semelhante, estimula a síntese protéica (um evento tardio) sem influenciar no transporte de aminoácidos. Estes dois eventos (transporte de aminoácidos e síntese protéica) caracteriza um efeito monofásico do FSH no transporte de aminoácidos independente da síntese protéica.

Parte II

IV.2. Mecanismo de Ação do Retinol

Um dos efeitos mais conhecidos do retinol, no testículo, é a manutenção da espermatogênese em mamíferos. Esta hipótese tem se comprovado desde os trabalhos realizados por Thompson et al., 1964 e Mitramond et al., 1979. Em ratos, a deficiência de vitamina A resulta na interrupção da espermatogênese ativa e atrofia dos túbulos seminíferos (Huang et al., 1983 e 1989).

Existem algumas evidências sugerindo a célula de Sertoli como alvo principal da ação do retinol no testículo, isto foi demonstrado pela estimulação direta do retinol nas células de Sertoli. A ingestão de retinol ou a administração de retinol no testículo é capaz de restabelecer a espermatogênese em animais deficientes em vitamina A (VAD), tal efeito não foi sustentado, nem restabelecido pelo ácido retinóico (Thompson et al., 1964 e Lotan, 1980). Outra evidência que a célula de Sertoli é alvo para o retinol foi a demonstração que o retinol livre ou ligado ao complexo transportador (RBP-TTR-retinol), tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” é captado pelas células de Sertoli e, entre as células testiculares, estas possuem a mais alta concentração de proteínas ligadora de retinol (CRBP) (Bishop e Griswold, 1987).

Além da elucidação da célula alvo do retinol no testículo; tem-se realizado intensos estudos em relação aos eventos bioquímicos envolvidos na síntese e secreção de proteínas

estimuladas por retinol.

O estudo da regulação das funções das células de Sertoli estimulados por FSH, insulina, retinol e testosterona (FIRT) nos processos de síntese e secreção de proteínas pelas células de Sertoli, já foram descritos por vários autores (Fritz et al., 1976; Wilson e Griswold, 1979; Karl e Griswold, 1980; Skinner e Griswold, 1981; Skinner, 1991), entretanto, a dinâmica e o mecanismo molecular de síntese e secreção de proteínas ainda são pouco compreendidas.

O envolvimento do retinol nas reações de síntese protéica em células de Sertoli já foi bastante demonstrado (Skinner e Griswold 1980, 1982 e 1983; Huggenvik et al. 1987; Hugly e Griswold, 1987; Skinner, 1991) e, concomitantemente foram explorados os diferentes métodos capazes de expressar sensibilidade na investigação da regulação da síntese protéica estimulada por retinol nessas células.

O retinol efetua profundas alterações na morfologia e fisiologia testicular, entretanto, se esses eventos são proeminentes em ratos imaturos, se envolvem modificações no fluxo de cálcio (atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$, sistema bidirecional de troca $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$), ou na atividade direta de enzimas de membrana, são assuntos ainda pouco esclarecidos.

Os resultados apresentados nesta tese mostram um efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácidos neutros tanto em testículos de ratos imaturos desprovidos do epitélio germinativo (“SCE”) como em culturas de células de Sertoli provenientes de testículos “SCE”.

Na análise do tempo de pré-incubação em testículos “SCE”, verificou-se um aumento no efeito estimulatório do retinol (20 μM) no transporte de aminoácidos. O fato do período de pré-incubação não ter influenciado na resposta do retinol ao estímulo do transporte em culturas de células de Sertoli (figura III.2.2.), sugere que o transporte de aminoácidos nessas células, previamente tratadas ou não com retinol é imediato ou declina rapidamente com o tempo. Isto é semelhante ao que ocorre em córtex de rim de camundongo e em miócitos

cardíacos de ratos para o transporte de aminoácidos neutros estimulado por testosterona (Koenig et al., 1982 e 1989).

Os resultados da curva de dose-resposta do retinol mostram que as doses de 10 e 20 μ M tem um efeito estimulatório no transporte de aminoácidos e, este efeito é observado em 15 min. de incubação. Blomhoff et al., 1992, estudando a modulação da função das células β pelo retinol, observaram que concentrações fisiológicas de retinol (3 μ M) utilizadas em períodos longos de tratamento (72 h) foi efetiva na inibição da síntese de DNA medida através da captação de timidina. Por outro lado, esses autores demonstraram também que concentrações de retinol entre 10 e 30 μ M foram mais ativas do que concentrações normalmente encontradas no plasma. Estes mesmos autores também comentam que altas concentrações de vitamina A (como encontrada no plasma na hipervitaminose A e em vários experimentos “*in vitro*”) inibe a resposta imune normal e que baixas concentrações de vitamina A (como encontrada no plasma na deficiência de vitamina A ou “*in vitro*” depois da remoção da vitamina A do meio de incubação) tem o mesmo efeito.

Uma das principais limitações para os estudos “*in vitro*” usando retinol é quanto a solubilização já que no plasma o retinol é transportado ligado a proteína de ligação (RBP) e captado pelas células via receptores de RBP. No entanto, os processos de solubilização e captação do retinol pelos tecidos em geral é assunto de atual interesse (Shingleton et al., 1989; Noy e Xu, 1990 e Randolph e Ross, 1991).

Vários autores tem questionado a concentração de andrógenos requeridos para a manutenção da espermatogênese. Sob condições fisiológicas a concentração de andrógenos no testículo é mais de 20 vezes superior do que nos órgãos periféricos. Entretanto, os resultados de vários estudos mostram que a espermatogênese pode também ocorrer com aproximadamente 20% dos níveis de andrógenos testicular normal ainda que a produção de espermatozóides seja diminuída (Rommerts, 1988 e 1992).

Independente dos níveis mínimos exatos da testosterona requerida para a manutenção da espermatogênese (com ou sem FSH), é difícil entender porque as células testiculares

sensitivas a andrógenos são estimuladas de maneira diferente do que em outras células alvo (Sun et al., 1989).

Uma das teorias atuais para explicar os efeitos das altas concentrações de andrógenos é a existência de um sistema de transdução de sinais alternativo para os andrógenos, isto é, a presença de proteínas receptoras de andrógenos que em certas membranas modulam as funções celulares via segundo mensageiros e, como tal não atuam diretamente à nível da transcrição dos gens (Sheridan, 1991).

As funções indiscutíveis dos esteróides é na regulação da expressão dos gens em muitas células alvos diferentes, tem subordinado o fato que os esteróides podem exercer um efeito rápido nas propriedades das células o qual não pode ser facilmente explicado pelo efeito genômico relativamente lento (Rommerts, 1992).

Nos estudos da caracterização do sistema de transporte de aminoácidos neutros estimulados por retinol em testículos “SCE”, verificou-se que em meio hipossódico (Na^+ 25 mM) houve um decréscimo na captação basal e um bloqueio no efeito estimulatório do retinol. A captação de $\alpha\text{-MeAIB}^{14}\text{C}$ foi dependente de sódio e, a inibição da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{-ATPase}$ pela ouabaína manteve a inferência de que o transporte de aminoácidos neutros refletem uma taxa inicial de captação via sistema “A”. Esses resultados são semelhantes aos já demonstrados para outras substâncias hidrofóbicas como a testosterona. A atuação clássica da testosterona é na regulação gênica aumentando a secreção de ABP e transferrina em culturas de células de Sertoli de ratos imaturos (Quirk e Reichert, 1988). No entanto, também tem sido demonstrado um efeito estimulatório da testosterona no transporte de aminoácidos neutros em córtex de rim de camundongo e miócito cardíaco mediados pelo sistema “A” sódio e energia dependente (Koenig et al., 1982 e 1989).

O conceito que os esteróides poderiam ter uma ação não genômica surgiu nos estudos do efeito da administração de grandes doses de esteróides em animais. Inicialmente foi notado com surpresa a dificuldade em produzir um fenômeno agudo, mesmo quando doses excessivas de esteróides eram administradas. Os esteróides, particularmente a progesterona, desóxi-

corticosterona e testosterona, induziam anestesia em ratos e tinham efeitos anti-convulsivantes e, subsequentemente foi verificado que a progesterona induzia “anestesia” também em humanos (Sheridan, 1991).

Os esteróides, através de dois modos de ação na superfície celular - direto e indireto - podem modificar as propriedades funcionais da membrana plasmática.

No modo *direto*, os esteróides podem interagir diretamente com proteínas localizadas na membrana plasmática e, dependendo das propriedades funcionais dessas proteínas, as propriedades da membrana podem ser modificadas. Alternativamente, as proteínas de ligação dos esteróides localizadas na membrana celular podem influenciar outras proteínas funcionais de um modo semelhante aos receptores para os hormônios protéicos, os quais fazem a transdução dos sinais para a adenil-ciclase via proteínas-G, fosfolipase C ou canais iônicos. No modo *indireto*, os esteróides podem se ligar a proteínas de ligação extracelulares solúveis como as proteínas plasmáticas de ligação de hormônios sexuais (SHBG). Devido a uma mudança conformacional na proteína de ligação sob a influência do esteróide, a proteína extracelular pode ou não reconhecer proteínas específicas na membrana plasmática de uma maneira análoga aos hormônios protéicos. Neste modelo, a proteína de ligação extracelular dos esteróides atua como uma interface para tornar hábil a comunicação entre os sinais dos esteróides e os componentes da membrana (Rommerts, 1992).

Hormônios como a progesterona, a aldosterona e a testosterona tem efeito na superfície celular e alteram o fluxo de cálcio (Blackmore et al., 1991; Wiebe e Wood, 1987; Steinsapir et al., 1991). Para a testosterona, mais especificamente, algumas descobertas são consistentes com a hipótese que as poliaminas servem como mensageiros intracelulares para aumentar o influxo e efluxo de cálcio, estimulando a endocitose, transporte de hexoses, transporte de aminoácidos e o processo de contração-excitação em miócitos ventriculares, assim, envolvendo as poliaminas na estimulação androgênica na contratilidade e velocidade cardíaca.

Koenig et al., em 1982, demonstraram em córtex de rim de camundongo que um efeito agudo da testosterona evocava a estimulação da endocitose, do transporte de aminoácidos e de hexoses representados por uma resposta mediada diretamente pelos receptores de andrógenos localizados na superfície das células dos túbulos proximais.

Nos estudos do papel do cálcio no efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácidos neutros, verificou-se que a exposição relativamente breve (15 min), de retinol resultou num aumento de transporte de aminoácidos e os bloqueadores de canais de cálcio, cobalto e níquel, produziram uma marcada redução na resposta do transporte de α -MeAIB¹⁴C estimulado por retinol.. Os dados destes experimentos indicam o envolvimento do íon cálcio no mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos.

Na análise do efeito do 3, 5, 3'-tri-iodotironina (T₃) à nível da membrana plasmática em timócito de rato, o aumento da atividade da adenil-ciclase, da concentração de AMPc celular e da captação de 2-deóxi-glicose (DOG), tem demonstrado que todos esses efeitos requerem cálcio (Segal et al., 1985). Por outro lado, o estudo da avaliação do efeito do T₃ em timócito de ratos demonstrou que o T₃ produz um aumento muito rápido, quase imediato na captação de Ca⁺⁺ extracelular seguido por um aumento na concentração de cálcio livre no citoplasma. Este é o efeito mais rápido do T₃ neste e em outros sistemas (Segal e Ingbar, 1984; Segal, 1988). Essas recentes observações em timócitos de ratos demonstram que o cálcio é, possivelmente, o primeiro mensageiro para a ação do T₃ mediada pela membrana plasmática. Além disso, o efeito do T₃ na captação de ⁴⁵Ca⁺⁺ e na concentração citoplasmática de cálcio livre, apontam a possibilidade do envolvimento da Ca⁺⁺-ATPase regulada pelo T₃ (Segal, 1988; Segal et al., 1989).

Os trabalhos de Segal, 1990 demonstraram que em vários tecidos o efeito do T₃ “*in vivo*” e “*in vitro*” são comparáveis e que a captação de Ca⁺⁺ estimulada por T₃ é a mudança metabólica mais rápida. Essas descobertas realizadas na presença ou ausência de concentrações fisiológicas de Ca⁺⁺ (1 mM) credenciam a hipótese do Ca⁺⁺ ser o primeiro mensageiro para a ação direta dos hormônios da tireóide à nível da membrana plasmática.

Para o retinol, os resultados desta tese apontam um efeito rápido na membrana plasmática, mediado por canais de cálcio de baixa voltagem do tipo “T” (inibidos por níquel) no processo de transporte de aminoácidos neutros dependente de sódio e energia. Porém, já foi também evidenciado que o retinol estimula o influxo de cálcio quase imediato (20 segundos) (Loss, E.S., comunicação pessoal) e aumenta a endocitose da peroxidase (HRP) em células de Sertoli de ratos imaturos (Wassermann, G.F., comunicação pessoal) mas, se há um envolvimento da Ca^{++} -ATPase e das poliaminas na regulação do transporte de aminoácidos e dos processos de endocitose estimulados por retinol nas células de Sertoli, isto, ainda está sendo motivo de intensa pesquisa.

Com a finalidade de verificar se o retinol atuava à nível da síntese protéica e em que período este efeito poderia ser observado em culturas de células de Sertoli, incubaram-se células controle e tratadas por diferentes períodos (15 min. até 720 min.) com retinol. Após cada período de tratamento com retinol as células foram incubadas em solução salina (BSS) com leucina - ^{14}C por 15 min.

O tratamento de células de Sertoli com retinol provocou um aumento significativo na incorporação de leucina- ^{14}C em proteínas. O efeito estimulatório do retinol na síntese protéica analisado nesse sistema de ensaio, foi observado em todos os tempo de pré-tratamento com retinol estudado. O estímulo da síntese protéica foi observada desde os 15 min., atingiu um nível máximo por volta das 3 h e mantêve-se nesse nível até o final do experimento (12 h).

Considerando os longos períodos de tratamento (mais de 2 h) com retinol, tanto para a análise da síntese protéica como para o transporte de aminoácidos, o estímulo do transporte de aminoácidos provocado, segundo Guidotti et al., 1978, por uma regulação adaptativa ao jejum celular, foi evitado pelo fornecimento de todos os nutrientes essenciais no meio 199 administrados junto com retinol durante todos os períodos de pré-incubação (Figura VI.3.B do apêndice).

Como já foi repetidamente demonstrado, o retinol estimula a síntese de proteínas gerais em diversos tecidos (Lotan, 1980) e, a síntese de proteínas características do testículo

(Hugly e Griswold, 1987). No estudo do envolvimento da síntese protéica no transporte de aminoácidos estimulado por retinol, observamos inicialmente que a ciclo-heximida produziu uma redução significativa da síntese protéica basal. Esta substância utilizada em condições semelhantes também inibe o transporte basal de aminoácidos. Porém, o efeito estimulatório do retinol no transporte de α -MeAIB¹⁴C foi observado dentro de poucos minutos e persistiu mesmo com o bloqueio prévio da síntese protéica com ciclo-heximida.

A manutenção dos níveis de captação de aminoácidos estimulados por retinol, dentro deste período estudado, mesmo com a síntese protéica inibida, indica que durante este período a síntese “*de novo*” não é necessária para esta ação do retinol, e reafirma os dados desta tese anteriormente discutidos, que o retinol tem uma ação direta nos componentes da membrana celular.

O efeito rápido e direto do retinol na captação de aminoácidos em células de Sertoli contrasta com os efeitos da insulina e glucagon nesta função. Esses dois hormônios aumentam o transporte de aminoácidos numa variedade de sistemas celulares por uma estimulação dependente do tempo e sensitiva a ciclo-heximida (Goldfine et al., 1972; Lerner, 1985). Dados semelhantes foram descritos para o mecanismo de ação da prolactina no transporte de aminoácidos em explantes de glândula mamária de camundongo (Rillema et al., 1992).

Substância como o T₃, a vitamina D₃ e os andrógenos que são substâncias de indiscutível função na regulação da expressão dos gens também exibem efeito rápido no fenômeno de transporte de membrana envolvendo alterações no metabolismo do cálcio (Segal, 1990; Nemere e Norman, 1991; Lerner, 1985). Para os hormônios da tireóide tem-se observado um efeito sensitivo, rápido e específico no transporte de aminoácidos através de um processo envolvendo diretamente componentes de membrana e independente da síntese protéica (Goldfine et al., 1975).

Os resultados até aqui apresentados demonstram o efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácidos neutros em células de Sertoli de ratos imaturos. Para tentar

esclarecer o mecanismo pelo qual o retinol estimula o transporte, foi examinado o efeito imediato (minutos) e o efeito mediato (horas). Para isto, também foi estudado a influência do tempo longo de tratamento com retinol no transporte de aminoácidos já que a síntese protéica ativa ocorre desde os primeiros 15 min. de tratamento com retinol. Nestes experimentos, demonstrou-se que independente do período de tratamento prévio com retinol este não induziu uma segunda fase de estímulo no transporte de aminoácidos, ou seja, o efeito do retinol no transporte de aminoácidos é processado através de um mecanismo periférico localizado na ou próximo a membrana plasmática.

Após Koenig et al., 1989 terem demonstrado que a testosterona induziu uma estimulação rápida (< 1min) no transporte de aminoácidos neutros e de glicose em fatias de córtex de rim de camundongo, muito se tem discutido sobre o mecanismo de ação alternativo para substâncias de conhecida ação nuclear (Koenig et al., 1989; Segal, 1990; Nemere e Norman, 1991; Rommerts, 1992).

Embora o transporte de aminoácidos seja um processo diferente do transporte de açúcares os trabalhos de Goldfine et al., 1975, sustentaram a hipótese de que o T₃ pudesse ter modos de ação os quais não necessariamente ligariam o efeito do T₃ aos processos de transcrição e tradução.

Em células eucarióticas mantidas em cultura, no mínimo alguns fatores podem estimular o transporte de açúcares por processos insensíveis a ciclo-heximida e provavelmente não requerem a síntese “*de novo*” de proteínas. Os trabalhos de Goldfine et al., 1975, já demonstraram que o T₃ estimulou a captação de aminoácidos não metabolizáveis, e que esta estimulação, ocorreu imediatamente após a exposição do T₃, sem requerer a síntese “*de novo*” de proteínas.

Para a captação de DOG estimulada por T₃ em culturas de células de coração de embrião de pinto Segal e Gordon, 1977, demonstraram que o transporte desta hexose é imediato e linear até aproximadamente 8 h e mantém-se constante até 24 h, no entanto, é

independente da síntese protéica durante as primeiras 6 h, mas, após este período a síntese “*de novo*” de proteínas é requerida para a manutenção da captação de DOG.

No experimento realizado com doses saturantes de glicose (14 mM) no meio de incubação (Figura VI.2. do apêndice), nenhum efeito no transporte de aminoácidos foi observado quando os testículos foram tratados (PI= 30 min. e I= 60 min.) com esta ose, portanto, nenhuma correlação com o mecanismo de transporte de aminoácidos pôde ser feita.

O transporte de aminoácidos, estudado na presença de ciclo-heximida em doses que reduziram em 95 % a síntese de proteínas testiculares, foi ligeiramente inibido tanto em condições basais ou estimuladas mas, o efeito do retinol nessa condição processou-se plenamente. Resultados semelhantes já foram descritos para a ação do FSH no transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos (Wassermann et al., 1989a).

O perfil temporal da ação estimulatória do retinol e FSH na incorporação de leucina-¹⁴C em proteínas de culturas de células de Sertoli, demonstrou um efeito estimulatório máximo atingido dentro de 3 h o qual se manteve durante as 12 h estudadas. Por outro lado, a presença de retinol ou de FSH somente durante o período de pré-incubação (15 min. a 12 h), não alterou o transporte de aminoácidos, isto é, não demonstrou uma configuração bifásica.

Com a finalidade de analisar se o efeito do retinol seria aditivo ao do FSH já que ambas substâncias estimulam o transporte de aminoácidos, foi analisada a dose mais responsiva de retinol e a dose máxima do hormônio anteriormente utilizada nesse trabalho para a verificação da sensibilidade do método ao FSH.

Os resultados obtidos nestas condições, mostram que a ação estimulatória do retinol e do FSH no transporte de aminoácidos é observada aos 15 min. de incubação na presença desses agentes. Estas substâncias compartilham, pelo menos em parte, o mecanismo que regula a captação de aminoácidos já que, ambas atuam no sistema "A" de transporte através de canais de cálcio dependentes da voltagem, são independentes da síntese “*de novo*” de proteínas, e seus efeitos não são aditivos.

Como um todo, os resultados do estudo do mecanismo de ação do retinol provam que, a ação estimulatória do retinol no transporte de aminoácidos não ocorre através da ação genômica conhecida dessa substância mas, provavelmente, por um mecanismo na superfície celular. Esses resultados são semelhantes ao que ocorre com o sugerido para o T₃ em vários tecidos em ratos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Goldfine et al., 1975b; Segal e Gordon, 1977; Segal et al., 1989 e Segal, 1990).

Numerosos trabalhos também tem se expandido sob o tema efeito não nuclear da vitamina D₃ (Nemere e Norman, 1991) e dos esteróides (Koenig et al., 1989) e a análise dos processos de membrana como o transporte de aminoácidos, hexoses e endocitose tem sido monitorizados sob os aspectos do envolvimento do íon cálcio (influxo e efluxo), influência da síntese protéica, alterações no potencial de membrana e regulação desses eventos pelas poliaminas. Todos esses dados apontam para um mecanismo de ação independentes dos efeitos nucleares conhecidos, chamando atenção para um mecanismo de ação alternativo para essas substâncias, mecanismo denominado “*atividade na superfície celular*”.

Praticamente todas as características funcionais das células de Sertoli sofrem marcada mudança entre o nascimento e a puberdade. Aproximadamente aos 14 dias de idade em ratos Wistar normais a diferenciação morfológica das células de Sertoli se torna mais acentuada. Com a formação da barreira sangue-testículo (entre os 18 e 19 dias de idade), o início da secreção do fluído tubular, as proteínas e glicoproteínas secretadas pelas células de Sertoli desviam-se para o epidídimo e aparecem menos na circulação (Waites et al., 1985).

Todas as ações conhecidas do FSH no testículo como a síntese protéica e glicoprotéica gerais e específicas do testículo (Fakunding et al., 1976 e Osterman et al., 1983; Rich et al., 1983; Skinner e Griswold, 1980; Bernard e Wassermann, 1982), regulação da atividade enzimática (Fakunding et al., 1976; Tash et al., 1979) a divisão, motilidade celular, organização dos microtúbulos e microfilamentos (Solari, 1978; Marcum et al., 1978; Dedman et al., 1979) e o transporte de aminoácidos (Irusta e Wassermann, 1974) ocorrem durante o

desenvolvimento e diferenciação das células de Sertoli em ratos (Means et al., 1980; Fakunding et al., 1976 e Perez-Sanches e Wassermann, 1981).

Além dos potentes efeitos no controle da espermatogênese, vários outros processos testiculares nas células de Sertoli estimulados por retinol também são regulados pela ação do FSH (Toebosch et al., 1989). Porém, ao contrário do hormônio FSH, o retinol não é sintetizado em um órgão endócrino específico, mas produzido em diversos tecidos após o metabolismo da vitamina A e dos carotenos presentes na dieta (Chappel et al., 1983; Darmon, 1990).

Quanto ao transporte de aminoácidos, Irusta e Wassermann, 1974 encontraram uma diminuição na captação de α -AIB- ^{14}C durante a maturação sexual. O efeito do FSH no transporte de aminoácidos é idade dependente e mais pronunciado entre os 10 e 20 dias de idade (Perez-Sanches e Wassermann, 1981), semelhantes a todos os efeitos conhecidos do FSH no testículo. Com a finalidade de esclarecer alguns aspectos do mecanismo de ação do retinol no transporte de aminoácidos, estudou-se a dependência da maturação testicular sob este parâmetro.

O tratamento de testículos “SCE” de ratos de 15 dias de idade com retinol, provocou um aumento significativo na captação de aminoácidos neutros, no entanto, testículos “SCE” de ratos de 30 e 35 dias de idade nenhum efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácidos foi observado, assim como, a captação basal de α -MeAIB- ^{14}C caiu drasticamente. Por outro lado, a regulação do transporte de aminoácidos por retinol no período de maturidade sexual em ratos, até então comprovado como o maior período de atividade secretória nas células de Sertoli, merece maiores investigações.

A responsividade aguda das células de Sertoli à testosterona foi descrita por Means et al., 1976 e Hansson et al., 1976. A testosterona, por seu turno, exerce ação estimuladora sobre o anabolismo protéico em culturas de células de Sertoli de ratos imaturos, este efeito foi bem documentado pela aumentada síntese e secreção de ABP e transferrina através de um mecanismo independente e sinérgico com o hormônio FSH (Quirk e Reichert, 1988). Tal

efeito não foi observado em culturas de células de Sertoli altamente purificadas provenientes de testículos de ratos de 21 a 23 dias de idade. Neste sistema, a expressão do mRNA da subunidade α da inibina foi aumentada pelo FSH mas não por testosterona (Toesbosch et al., 1989).

Uma discussão particularmente importante é que sob condições fisiológicas a concentração de andrógenos no testículo é várias vezes maior do que a concentração periférica normal, isto torna difícil entender porque as células testiculares são estimuladas por andrógenos de maneira tão diferente das outras células alvo (Sun et al., 1989). De especial relevância para esta questão é a corrente opinião que a ação dos andrógenos em várias células alvo seja mediada por somente um receptor (Brinkmann et al., 1992). Isto pode ser possível para aqueles efeitos biológicos, onde este único receptor de andrógenos nas células testiculares requeira um nível de saturação relativamente alto antes de ocorrer a interação entre os fatores de transcrição e a transcrição do gen. Entretanto, não é possível explicar o efeito dose-dependente dos andrógenos com este paradigma quando as concentrações de andrógenos são superiores aos níveis de saturação do receptor. Para explicar este fenômeno andrógeno-dependente em altas concentrações de andrógenos, uma das hipóteses teoricamente postulada é um sistema secundário para a transdução dos sinais de andrógenos (Rommerts, 1992).

Dos resultados aqui apresentados, a utilização de testosterona (doses farmacológicas), num tratamento crônico e/ou agudo em testículos "SCE" ou em culturas "SCE" provenientes de testículos de ratos imaturos, não foi observado nenhum efeito da testosterona no transporte de aminoácidos neutros. No entanto, em outros tecidos tem sido demonstrado que a testosterona induz uma estimulação rápida do transporte de aminoácidos, da endocitose e do transporte de hexoses (Koenig et al., 1982).

Recentemente, um estudo extensivo da ação rápida da testosterona em miócito cardíaco de rato claramente demonstrou um efeito não-genômico, provavelmente, mediada através de receptores na membrana plasmática (Koenig et al., 1989). A testosterona

estimulou um aumento transitório da atividade da ornitina descarboxilase seguida por um aumento nos níveis de poliaminas, um subsequente aumento no fluxo de cálcio o qual foi seguido pela endocitose, transporte de aminoácidos e de hexoses através da membrana plasmática (Sheridan, 1991). Esses dados sugerem a existência de receptores para andrógenos na membrana plasmática, entretanto a natureza deste receptor ainda não foi determinada.

Outra questão a ser estudada sobre a relação de um possível efeito da testosterona no transporte de aminoácidos através de um mecanismo periférico semelhante ao seguido nesta tese para o retinol é a regulação parácrina testicular.

As células peritubulares do testículo secretam uma proteína sob o controle de andrógenos que modula a função das células de Sertoli. A proteína produzida pelas células peritubulares estimula as células de Sertoli a secretar ABP e transferrina semelhante ao efeito máximo combinado do FSH, insulina, retinol e testosterona (Skinner e Fritz, 1985) e este efeito tem um papel integral na manutenção dos arranjos citocelulares e no ambiente bioquímico nos túbulos seminíferos requeridos para o processo espermatogênico (Fritz, 1978), no entanto, no presente estudo não foi observada a modulação do transporte de aminoácidos pela testosterona nas células de Sertoli de testículos inteiros em que a relação célula mióide - célula de Sertoli está conservada.

V. CONCLUSÕES

Dos resultados encontrados e discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

- 1) O FSH de distintas espécies e origens estimula o transporte de aminoácidos neutros em culturas de células de Sertoli. Este efeito é rápido (minutos) e é observado apesar de uma marcada diferença na potência relativa do hormônio.
- 2) O tratamento de culturas de células de Sertoli com FSH aumenta a incorporação de leucina- ^{14}C em proteínas. Este estímulo do FSH ocorre a partir das 3 h de tratamento e perdura durante 12 h.
- 3) A presença de FSH durante um período prolongado de pré-incubação (de 15 min. até 720 min.), não altera o transporte de $\alpha\text{-MeAIB-}^{14}\text{C}$, ou seja, o FSH não tem uma segunda fase estimulatória no transporte de aminoácidos.
- 4) O retinol nas doses de 10 e 20 μM tem um efeito estimulatório no transporte de aminoácidos em culturas de células de Sertoli aos 15 min. de incubação. Usando testículos inteiros "SCE", a pré-incubação com retinol (20 μM) aumenta o efeito estimulatório no transporte de aminoácidos.
- 5) O retinol estimula o transporte de aminoácidos neutros em culturas de células de Sertoli através de regulação efetuada sobre o sistema "A" de transporte, dependente de sódio e energia.
- 6) A ação estimulatória do retinol no transporte de aminoácidos ocorre por um mecanismo envolvendo canais de cálcio dependentes da voltagem (provavelmente do tipo "T").
- 7) O retinol estimula a síntese protéica a partir dos 15 min. e este efeito é observado durante todo o período de tratamento (12 h).
- 8) Períodos longos de pré-incubação com retinol (até 12 h) não alteram o transporte de aminoácidos, ou seja, o efeito do retinol é imediato e monofásico.
- 9) A ação estimulatória do FSH e retinol no transporte de aminoácidos é obtida em 15 min. e esta ação do retinol não é aditiva com doses máximas de FSH.

10) O retinol estimula o transporte de aminoácidos através de um efeito rápido na membrana não mediado pela síntese "*de novo*" de proteínas.

11) O retinol estimula o transporte de α -MeAIB- ^{14}C em testículos "*SCE*" de ratos de 15 dias e nenhum efeito é observado em ratos de 30 e 35 dias de idade.

12) O tratamento crônico e/ou agudo com testosterona não tem efeito estimulatório no transporte de aminoácidos em testículos "*SCE*" ou em culturas de células de Sertoli de ratos imaturos.

Dos resultados obtidos, de um modo geral, conclui-se que:

O FSH e o retinol estimulam o transporte de aminoácidos através de um mecanismo parcialmente comum, já que, ambas substâncias atuam no sistema "A" de transporte envolvendo canais de cálcio de baixa voltagem; são independentes da síntese "*de novo*" de proteínas e seus efeitos não são aditivos.

VI. APÊNDICE

V.1. ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE α -MeAIB- ^{14}C BASAL E ESTIMULADO POR FSH EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Para o estudo do efeito da variação da concentração de aminoácidos (α -MeAIB- ^{14}C) sobre o transporte basal e estimulado por FSH (0,1 e 0,2 mU/ml), utilizou-se um sistema de incubação com os seguintes grupos: 1º) Controles - Células de Sertoli incubadas com BSS contendo 0,1 ou 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de α -MeAIB- ^{14}C ; 2º e 3º) Células incubadas com BSS contendo α -MeAIB- ^{14}C 0,1 ou 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ e FSH de hipófise de suínos (NIH) nas concentrações de 0,1 ou 0,2 mU/ml.

Neste experimentos as diferentes concentrações de FSH influenciaram o transporte de α -MeAIB- ^{14}C e mostrou-se estatisticamente significativo em relação aos grupos não tratados com hormônio. Ainda nesta figura pode-se observar que nas mesmas condições experimentais, quanto maior a concentração de aminoácido marcado maior a captação celular deste aminoácido. Este resultado indica que qualquer destas concentrações de aminoácidos utilizadas está distante da saturação e que, utilizando-se 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de α -MeAIB- ^{14}C o estímulo no transporte é observado em níveis proporcionalmente mais altos do que com 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$. Entretanto, com 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de aminoácido marcado o transporte estimulado é melhor observado.

Os resultados são apresentados na figura VI.1.

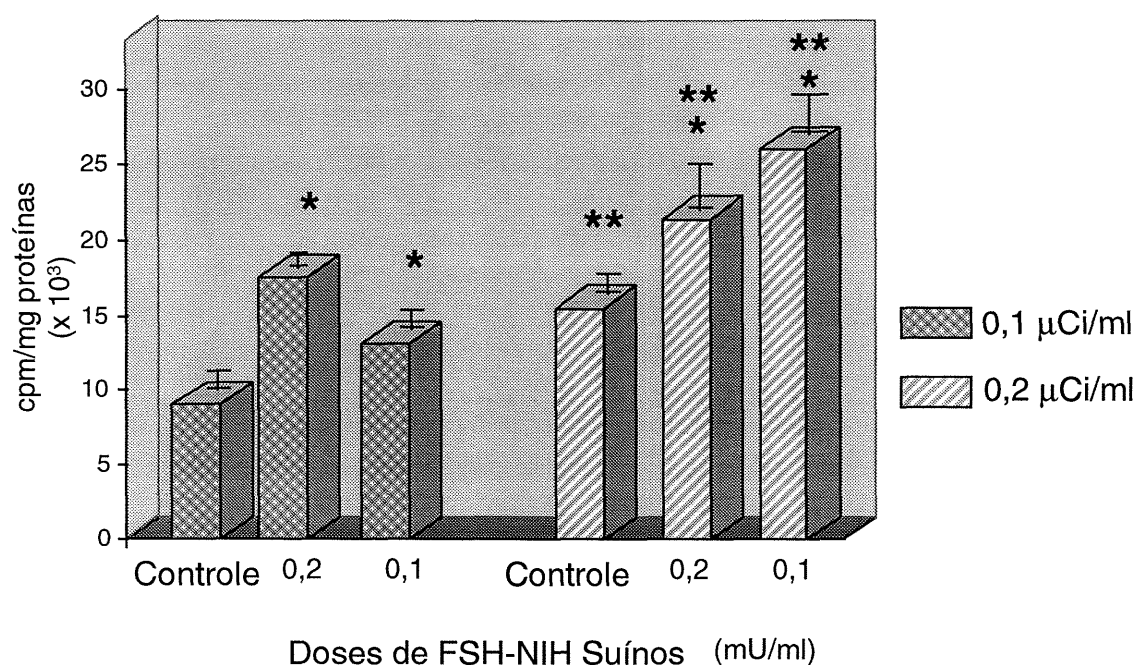


Figura VI.1. Efeito de Diferentes Concentrações de α -MeAIB- ^{14}C Estimulada por FSH em Culturas de Células de Sertoli.

I = 15 min.

FSH de hipófise de suínos - NIH

* Significativo em relação ao seu grupo controle correspondente, $p < 0,05$.

** Significativo em relação ao grupo 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ correspondente.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 3 culturas de uma mesma preparação celular.

VI.2. INFLUÊNCIA DA GLICOSE (14 mM) SOBRE O TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM TESTÍCULOS "SCE" DE RATOS DE 35 DIAS DE IDADE

Com a finalidade de tentar esclarecer alguns aspectos do mecanismo do transporte de aminoácidos testiculares e estudar até que ponto este efeito teria uma correlação com os efeitos da glicose neste aspecto, decidiu-se testar o efeito da glicose (14 mM) sobre o transporte de aminoácidos neutros em testículos "SCE" de ratos de 35 dias de idade.

Testículos "SCE" de ratos de 35 dias de idade, foram pré-incubados durante 30 min. em KRb contendo glicose (14 mM). Seguido este período, as gônadas foram incubadas em meio fresco contendo glicose e α -MeAIB- ^{14}C . Para estudar a ação da glicose sobre este parâmetro, utilizaram-se dois grupos: 1º) Controle - testículos incubados em KRb e α -MeAIB- ^{14}C (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$); 2º) Grupo - testículos incubados com glicose (14 mM) e α -MeAIB- ^{14}C .

A figura VI.2 ilustra os resultados obtidos quando testículos "SCE" de ratos de 35 dias foram incubados na presença de glicose. Observa-se que esta hexose não teve efeito sobre o transporte de α -MeAIB- ^{14}C .

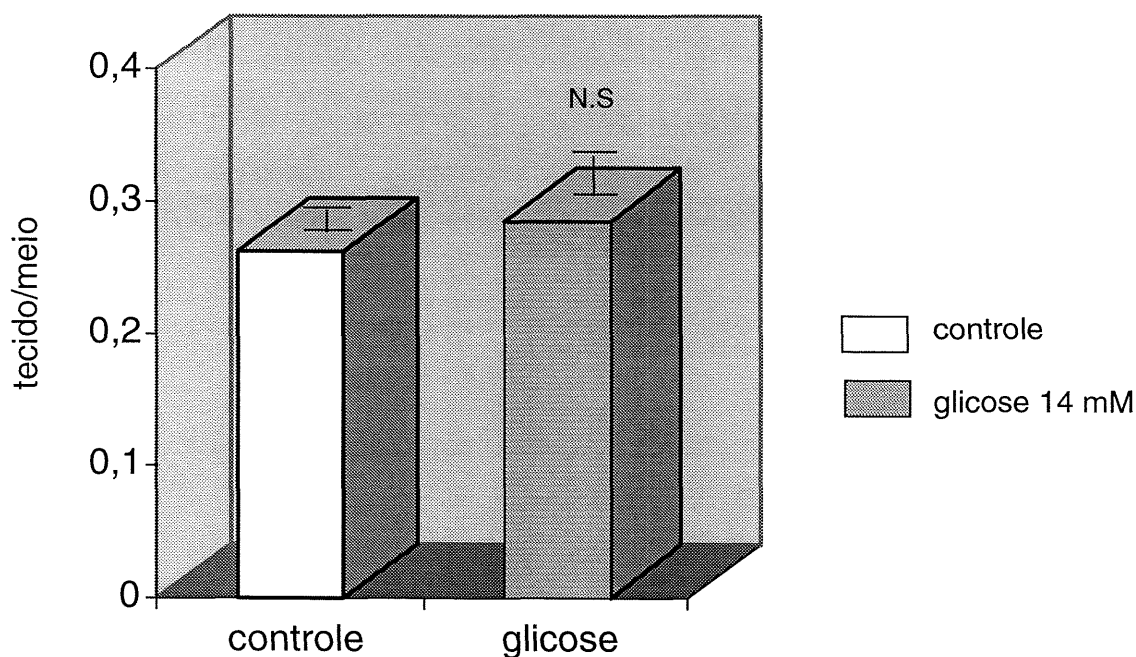


Figura VI.2. Influência da Glicose (14 mM) sobre o Transporte de Aminoácidos

Neutros em Testículos "SCE" de Ratos de 35 dias de idade

PI = 30 min.

I = 60 min.

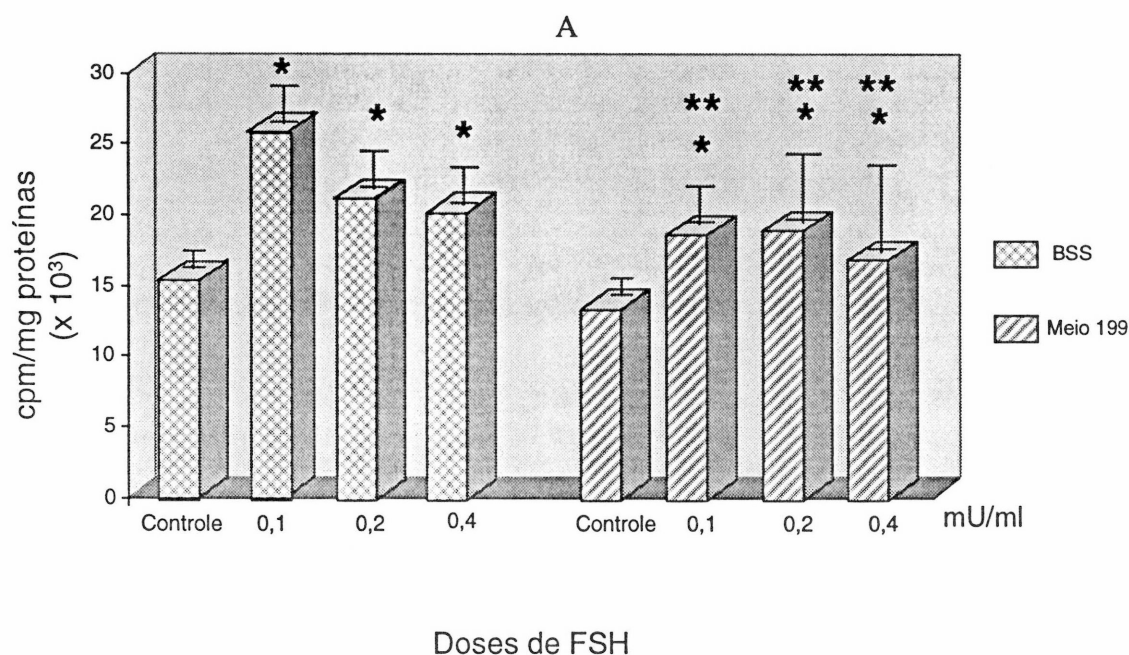
N.S.: Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle

Os valores representam as médias \pm E.P.M. Cada grupo consistia de 5 gônadas.

VI.3. INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES MEIOS DE INCUBAÇÃO NO TRANSPORTE DE α -MeAIB- ^{14}C ESTIMULADO POR FSH OU RETINOL EM CULTURAS DE CÉLULAS DE SERTOLI

Um aspecto analisado foi a influência dos meios utilizados (meio 199 ou BSS) durante o período de incubação basal e estimulado por FSH ou retinol na presença do aminoácido marcado.

Como pode ser observado, os meios utilizados para medir a captação de α -MeAIB- ^{14}C basal e estimulada por FSH (nas doses 0,1; 0,2 e 0,4 mU/ml) (figura VI.3.A), ou retinol (10 μM) (figura VI.3.B), tem influências relevantes. O transporte de aminoácidos estimulado por FSH ou retinol ocorre em níveis mais elevados quando incubados em BSS. Portanto, frente a esses resultados, todos os experimentos pré-tratados por períodos longos com FSH ou retinol foram feitos em meio 199, tanto em transporte como em síntese) e, para a incubação (15 min.), nos experimentos de síntese protéica ou transporte de aminoácidos sempre foi utilizado o BSS.



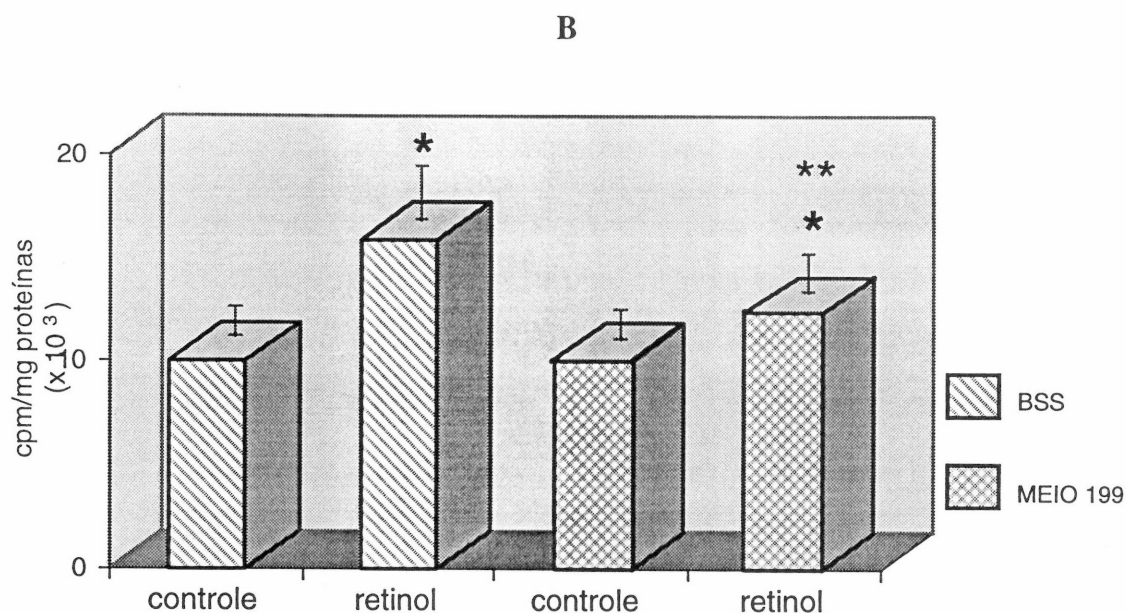


Figura VI.3. A e B. Influência dos Diferentes Nutrientes no Transporte de Aminoácidos Estimulado por FSH ou Retinol em Culturas de Células de Sertoli.

PI = 15 min.

I = 15 min.

Retinol: 10 μ M

FSH de suínos NIH

* Significativo em relação ao seu grupo controle correspondente.

** Significativo em relação ao grupo BSS.

Os valores representam as médias \pm E.P.M. de 4 culturas de uma mesma preparação celular.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, Inc 3^a ed. 1994, cap. 11: p. 508 - 546.
- AOKI, A. and FAWCETT, D.W. Impermeability of Sertoli cell junctions to prolonged exposure to peroxidase. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.7, p.63, 1975.
- ANÔNIMO, Cell-surface receptors for retinol-binding protein. *Nutrition Reviews*, Philadelphia USA, v.49, p. 218-221, 1991
- ASEM, E.K.; MOLNAR, M. and HERTELENDY, F. Luteinizing hormone induced intracellular calcium mobilization in granulosa cells: comparison with forskolin and 8- bromo-adenosine 3' 5' -monophosphate. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.120, p.853- 858, 1987.
- ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S.; SHAHAB, M. and NIESCHLAG, E. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primata (Macaca Mulatta). *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.136, p.235- 243, 1993.
- BARDIN, C.W.; YANG CHENG, C.; MUSTO, N.A. and GUNSALUS, G.I. The Sertoli cell In: Knobil, E.; Neill, J. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltda.; 1988, 85: 343-354.
- BASS, R.; HEDEGAARD, H.B.; DILLEMAY, L.; MOFFET, J. and ENGLESBERG, E. The A, ASC and L system for the transport of amino acids in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.256, p.10259-10266, 1981.
- BEER, W.H. and STRICKLAND, S. A cell culture assay for follicle stimulating hormone. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, V.253, P.3877-3881, 1978.
- BENTLEY, M.J.; GASS, G.H. and LEIDL, W. Effects of FSH and LH administration on the testes and seminal vesicles. *Andrologia*, Berlin, Germany, v.10, p.357-361, 1978.
- BEAUMONT, H.M. Changes in the sensitivity of the testis during foetal development. *International Journal of Radiation on Biology*, Bethesda, USA, 1960.
- BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, Great Britain, v. 220, p.345-360., 1984.
- BERNARD, E.A. and WASSERMANN, G.F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by in vivo administration of follicle stimulating hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, 44: 45-47, 1982.

- BIRNBAUMER, L.; CODINA, J.; YATANI, A.; MATTERA, R.; GRAF, R.; OLATE, J. THEMEN, A.P.N.; LIAO, C.F.; SANFORD, J.; OKABE, K.; IMOTO, Y.; ZHOU, Z.; ABRAMOWITZ, J.; SUKI, W.N.; HAMM, H.E.; IYENGBAR, R.; BIRNBAUMER, M. and BROWN, A. Molecular basis of regulation of ionic channels by G proteins. *Recent Progress in Hormone Research*, Orlando, USA, v.45, p.121- 208, 1989.
- BISHOP, P.D. and GRISWOLD, M.D. Uptake and metabolism of retinol in cultured Sertoli cells: Evidence for a kinetic model. *Biochemistry*, Washington, USA, v.26, p.7511-7518, 1987.
- BLANER, W. Retinol-binding protein: The serum transport protein for vitamin A. *Endocrine Reviews*, Baltimore, USA, v.10, p.308-316, 1989.
- BOGDANOVE, E.M.; CAMPBELL, G.T.; BLAIR, E.D.; MULA, M.E.; MILLER, A.E. GROSSMANN, G.H. Gonadal-pituitary feedback involves qualitative change: androgens alter the type of FSH secreted by the rat pituitary. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.95, p.219-228, 1974.
- BOGGIS, J. and RYLE, A. An *in vitro* procedure for the quantitative measurement of follicle stimulating hormone activity. *Journal Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.54, p.355-362, 1972.
- BORLAND, K.; MITA, M.; OPPENHEIMER, C.L. BLINDERMAN, L.A.; MASSAGUE, J. HALL, P.F. and CZECH, M.P. The action of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cell. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v. 114, p.240-246, 1984.
- BORLAND, K.; EHRLICH, H.P.; MUFFLY, K.; DILLS, W.L jr. and HALL, P.F. Interaction of rat Sertoli cells with a collagen lattice *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, Colchester Essex, Great Britain, v.22, p.661-669, 1986.
- BREMNER, W.J. Historical aspects of the study of the testis. In: BURGER, H. and deKRETZER, D. (eds). *The Testis*. Raven, New York, p.1-5, 1981.
- BRESSION, D.; BRANDI, A.M.; PAGESY, P.; LE DAFNIET, M.; MARTINET, M.; BRAILLY, S.; MICHARD, M. and PEILLON, F. In vitro and in vivo antagonistic regulation by estradiol and progesterone of the rat pituitary domperidone binding sites: correlation with ovarian steroids regulation of the dopaminergic inhibition of prolactin secretion in vitro. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.116, p.1905-1912, 1985.
- BRESSION, D.; MICHERD, M.; DAFNIET, M.L.E.; PAGESY, P. and PEILLON, F. Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v. 119, p.1048-1051, 1986.
- BRINKMANN, A.O.; JENSTER, G.; KUIPER, G.G.J.M.; RIS-STALPERS, C.; van LAAR, J.H.; FABER, P.W. and TRAPMAN, J. Structure and function of the human androgen receptor. In: Nieschlag E. Hobenicht UF (eds). *Spermatogenesis - fertilization - contraception: Molecular, cellular and endocrine events in the testis*, 1992. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin.

- BLOMHOFF, H.K.; SMELAND, E.B.; ERIKSTEIN, B.; RASMUSSEN, A.M.; SKREDE, B.; SKJONBERG, C. and BLOMHOFF, R. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal β cells. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.267, p.23988-23992, 1992.
- BLACKMORE, P.F.; NEULEN, J.; LATTANZIO, F. and BEEBE, S.J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.266, p.18655-18659, 1991.
- BROKELMANN, J. Fine Structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of seminiferous epithelium in the rat. *Zeitschrift fuer Mikroskopisch - Anatomisch*, v.59, p.820, 1963.
- BROWN, A.M. and BIRNBAUMER, L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annual Reviews of Physiology*, Philadelphia, USA., v.52, p.197-213, 1990.
- BYERS, S.W.; HADLEY, M.A.; DJAKIEW, D. and DYM, M. Growth and characterization of polarized monolayers of epididymal epithelial cells and Sertoli cells in dual environment culture chambers. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.7, p.59- 69, 1986.
- CHAMBERS, J.W.; GEORG, R.H. and BASS, A.D. Effects of catecholamines and glucagon on amino acid transport in the liver. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.83, p.1185- 1192, 1968.
- CHAPPEL, S.C.; ULLOA-AGUIRRE, A. and COUTIFARIS, C. Biosynthesis and secretion of Follicle-Stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, , Baltimore, USA, v.4, p.179- 211, 1983.
- CHENG, C.Y. and BARDIN, C.W. Rat testicular testibumin is a protein responsive to follicle stimulating hormone and testosterone that shares immunodeterminants with albumin. *Biochemistry*, Washington, USA, v.25, p.5276-5288, 1986.
- CHRISTENSEN, H.N. Mode of transport of amino acid into cells. In: McElrby, W.D. and Glass, M.B. *Symposium of amino acid metabolism*, p.63, 1955.
- CHRISTENSEN, H.N.; LIANG, M. and ARCHER, E.G. A distinct Na^+ requiring transport system for alanine, serine, cysteine and similar amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 242, p.5237-5246, 1967.
- CHRISTENSEN, H.N. Some special kinetic problems of transport. *Advances in Enzymology*, New York, USA, v. 32, p.1-20, 1969.
- CHRISTENSEN, H.N.; DE CESPEDES, C.; HANDLOGTEN, M.E. and RONQUIST, G. Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.300, p.487-522, 1973.

- CHRISTENSEN, H.N.; DE CESPEDES, C.; HANDLOGTEN, M.E. and RONQUIST, G. Modified transport substrates as probels for intramembrane gradients. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, USA, v. 221, p.355-379, 1974.
- CHRISTENSEN, H.N. In: *Current Topics in Membranes and Transport*. Bronner, F. and Kleinzeller, A. (eds.), vol.6, p.227-258, Academic Press, New York, 1975.
- CLERMONT, YVES. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. Bethesda, USA, v.52,p.198-236, 1972.
- COHEN, C.J.; Mc CARTHY, R.T.; BARRETT, P.Q. and RASMUSSEN, H. Calcium channels in adrenal glomerulosa cells: K⁺ and angiotensin II increase T-type Ca⁺⁺ channel current. *Proceedings National Academy Science*, Washington, USA, v.85, p.2412-2416, 1988.
- COLQUHOUN, D.; NEHER, E.; REUTER, H. and STEVENS, C.F. Inward current channels activated by intracellular Ca⁺⁺ in cultured cardiac cells. *Nature*, Hampshir, U.K., v.294,p.752-754, 1981.
- CORMACK, D.H.c1991. *Ham Histologia* , 9.ed., Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: p.509-527.
- COUROT, M and KILGOUR, R.J. Endocrine control of mammalian testicular ontogenesis. *Archivos de Biologia y Medicina Experimentales, Santiago, Chile*, v.17, p.249-255, 1984.
- CRUZ CURTE, A.. and WASSERMANN, G.F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. *The Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.106, 291- 294, 1985.
- 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. and 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.
- DAVIES, A.G. Gonadotrophin-induced changes in the Sertoli cells of the immature mouse testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, England, v.47, p.83-85, 1976.
- DAVIS, J.S.; WEAKLAND, L.L. WEST, L.A and FAREST,R.V. Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. *Biochemistry Journal*, Colchester Essex Great Britain, v.238, p.597, 1986a.
- DAVIS, J.S.; WEST, L.A.; WEAKLAND, L.L. and FARESE, R.V. Human chorionic gonadotropin activates the inositol 1,4,5-triphosphate-Ca⁺⁺ intracellular signalling system in bovine luteal cells. *FEBS Letter*, Amterdam, Netherlands, v.208, p.287, 1986b.

DAVIS, S.J.; WEAKLAND, L.L.; FARESE, R.V.; WEST, L.A. Luteinizing hormone increases inositol triphosphate and cytosolic free Ca^{++} in isolated bovine luteal cells. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.262, p.8515, 1987.

DAVIS, J.T. and ONG, D.E. Synthesis and secretion of retinol-binding protein by cultured rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, Champaign, USA, v.47, p.528-533, 1992.

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

De PHILIP, R.M.; FELDMAN, M.; SPRUILL, W.A.; FRENCH, F.S. and KIERSZENBAUM, A.L. The secretion of androgen-binding protein and other proteins by rat Sertoli cells in culture: A structural and electrophoretic study. *Annals New York Academy Sciences*, New York, USA, v.383, p. 361-371, 1982.

DEDMAN, J.R.; BRINKLEY, B.R. and MEANS, A.R. Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Bethesda, USA, v.11, p.131-174, 1979.

DIMINO, M.J.; SNITZER, J. and NOLAND, T.A. Early effects of luteinizing hormone on mitochondrial phosphoinositides in ovarian follicles. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, V.36, P.97-101, 1987.

DORRINGTON, J.H. and AMSTRONG, D.T. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol 17β synthesis in cultured Sertoli cells. *Proceeding National Academic Science*, Washington, USA, v.72, p.2677-2681, 1975.

DORRINGTON, J.L. and FRITZ, M.R. Cellular localization of 5α -reductase and 3α -hydroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testes. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.96, p.879-889, 1975.

DORRINGTON, J.H.; FRITZ, I.B. and ARMSTRONG, D.T. Control of testicular estrogen synthesis. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, v.18, p.55-64, 1978.

DORRINGTON, J.H. and AMSTRONG, D.T. Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Progress in Hormone Research*, Orlando, USA, v.35, p.301-342, 1979.

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

DUCLOS, M.J.; CHEVALIER, B.; GODDARD, C. and SIMON, J. Regulation of amino acid transport and protein metabolism in myotubes derived from chicken muscle satellite cells by insulin-like growth factor-1. *Journal of Cellular Physiology*, New York, USA, v. 157, p.650-657, 1993.

- DUFY, B.; VICENT, J.D.; FLEURY, H.; DUPASQUIER, P.; GOURDJI, D. and VIDAL, A. Dopamine inhibition of actions potentials in secreting cell line is modulating by estrogen. *Nature*, Hampshire, U.K., v.282, p.253-256, 1979.
- DYM, M. and FAWCETT, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, v.3, P.308, 1970.
- DYM, M. The Male Reproductive System. In: WEISS, L. (ed). *Histology: cell and tissue biology*. 5. ed. New York: Mcmillan Press, c1983. cap.28, p. 1000-1052.
- EAVENSON, E. and CHRISTENSEN, H.N. Transport systems of neutral amino acid in the pigeon erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.242, p.5386- 5396, 1967.
- EDMONSON, J.W.; LUMENG, L. and LI, T.K. Comparative studies of alanine and α -aminoisobutyric acid uptake by freshly isolated rat liver cells. *Tehe Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 254, p.1653-1658, 1979.
- EDMONSON, J.W. and LUMENG, L. Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagon in hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, San Diego, USA, v.96, p.61-68, 1980.
- EKWALL, H.; JANSSON, A.; SJOBERG, P and PLOEN, L. Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Archives of Andrology*, San Diego, USA, v.13, p.27-36, 1984.
- ELSAS, L.J.; WHEELER, F.B.; DANNER, D.J. and DEHAAN, R.L. Amino acid transport by aggregates of cultured chicken heart cells-effect of insulin. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.250, p.9381-9390, 1975.
- ESKILD, W.; REE, A.H.; LEVY, F.O.; JAHNSEN, T. and HANSSON, V. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinoic-binding protein, and germ cell-specific mRNAs. *Biology of Reproduction*, Champaign, USA, v.44, p.53- 61, 1991.
- EWING, L.L. and ZIRKIN, B. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Progress in Hormone Research*, Orlando, USA, v.39, 599-635, 1983.
- FAKUNDING, J.L.; TINDALL, D.J.; DEDMAN, J.R.; MENA, C. R. and MEANS, A. Biochemical actions of follicle-stimulating hormone in the Sertoli cell of the rat testis. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.98, p.392-402, 1976.
- FAUTH, M.G.; BARRETO, K.P.; WASSERMANN, G.F. Insulin stimulatory action on amino acid uptake in bovine adrenal cortex or glomerulosa zone. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Bristol, Great Britain, v. 98A, p.513-515, 1991.
- FAWCETT, D.M. The Ultrastructure and function of Sertoli cell. In: Greep, R., Hamilton E., Washington, D.C. (eds), *Handbook of Physiology*, sec. 7, vol. 5, cap. 2, 1975 Endocrinology, American Physiological Society p.21-55

- FAWCETT, D.W. Tratado de Histologia. Mexico: Interamericana, McGraw-Hill, 11a. ed., 1993, cap. 31: p.802-857.
- FRANCHI-GAZZOLA, R.; GAZZOLA, G.C.; DALL'ASTA, V. and GUIDOTTI, G.G. The transport of alanine, serine and cysteine in cultured human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 257, p.9587, 1982.
- FLICKINGER, C.; FAWCETT, D.W. The junctional specialization of Sertoli cell in the seminiferous epithelium. *Anatomical Record*, New York, USA, v.158, p.207, 1970.
- FRITZ, I.B.; ROMMERTS, F.; LOUIS, B.G. and DORRINGTON, J.H. Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of an androgen-binding protein cell-enriched cultures. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, UK, v.46, p.17-24, 1976.
- FRITZ, I.B. (1978) In: *Biochemical Action of Hormones*, ed., Litwack, G. (Academic, New York), vol.5, pp.249-281.
- FRITZ, I.B. Site of action of androgens and follicle-stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In: Litwack G (ed), *Biochemical Actions of Hormones*. New York: Academic Press; 1978: 249-281.
- FUTTERMAN, S. and HELLER, J. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, β -galactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.247, p.5168-5172, 1972.
- GALDIERI, M. and NISTICO, L. Vitamin A modifies the glycopeptide composition of cultured Sertoli cells. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.7, p.219-226, 1986.
- GAZZOLA, G.C.; DALL'ASTA, V. and GUIDOTTI, G.G. The transport of neutral amino acid in cultured human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.255, p.929-936, 1980.
- GIGUERE, V.; ONG, E.S.; SEGUI, P. and EVANS, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, Hampshire, U.K., v.330, p.624-629, 1987.
- GLASS, C.K.; LIPKIN, S.M.; DEVARY, O.V. and ROSENFELD, M.G. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid - thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell*, Cambridge, U.K., v.59, p.697-708, 1989.
- GOLDFINE, I.D.; GARDNER, J.D. and NEVILLE, jr., D.M. Insulin action in isolated rat thymocytes. Binding of ¹²⁵I-insulin and stimulation of α -aminoisobutyric acid transport. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.247, p.6919-6926, 1972.
- GOLDFINE, I.D.; SIMONS, C.G.; SMITH, G.J. and INGBAR, S.H. Cycloleucine transport in isolated rat thymocytes: In vitro effects of triiodotironine and thyroxine. *Endocrinology*, Baltimore, USA, V.96, P.1030-1037, 1975.

- GODFRAIND, T.; MILLER, R. and WIBO, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacological Reviews*, Philadelphia, USA, v.38, p.321-416, 1986.
- GONDOS, B. Testicular development. In: A.D. Johnson and W.R. Gomes(eds). *The testis*, Academic Press, New York, 1977, v. 38, p. 321 - 416.
- GORCZJSKA, E. and HANDELSMAN, D.J. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 266, p.23739-2344, 1991.
- GORCZYNSKA, E. and HANDELSMAN, D.J. Requirement for transmembrane sodium flux in maintenance of cytosolic calcium levels in rat Sertoli cells. *American Journal Physiology*, Bethesda, USA, v.264, p.E863- E867, 1993.
- GRASSO, P. and REICHERT, L.E.Jr. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: Evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.125, p.3029-3036, 1989.
- GRASSO, P. and REICHERT, L.E. Jr. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{++}$ by cultured rat Sertoli cells does not require activation of cholera toxin- or pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.127, p.949-956, 1990.
- GRASSO, P., JOSEPH, M.P. and REICHERT, L.E. jr. A new role for follicle-stimulating hormone in the regulation of calcium flux in Sertoli Cells: Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.128, p.158-164, 1991.
- GRISWOLD, M.D. Protein secretion of Sertoli cells. *International Review Cytology*, New York, USA, v.110, p.133, 1988.
- GRISWOLD, M.D.; BISHOP, P.D.; KIM, K.; PING, R.; SIITERI, J.E. and MORALES, C. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Annals of New York Academy of Sciences*, New York, USA, v.564, p.154-170, 1989.
- GRISWOLD, M. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: L.D.Russell and M.D. Griswold, (eds). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida, p.493-508, 1993.
- GUIDOTTI, G.G.; GAZZOLA, G.C. and FRANCHI-GAZZOLA, R. Adaptive regulation of amino acid transport across the cell membrane in avian and mammalian tissues. *Advance Cytology Pharmacology*, San Diego, USA, v.2, p.155-162, 1974.
- GUIDOTTI, G.G.; BORGUETTI, A.F.; GAZZOLA, G.C.; TRAMACERE, M. and DALL'ASTA, V. Insulin regulation of amino acid transport in mesenchymal cells from avian and mammalian tissues. *Biochemistry Journal, Colchester Essex*, Great Britain, v. 160, p.281-286, 1976.

- GUIDOTTI, G.G.; BORGUETTI, A.F.; GAZZOLA, G.C. The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherland, v.515, p.329- 366, 1978.
- GUMA, F.T.C.R. *Ação do retinol na biossíntese de N-glicoproteínas em culturas de células de Sertoli*. Curitiba: UFPR/UFRGS, 1992. p. 171 Tese (doutorado em bioquímica). Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas - 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 - POA.
- HADLEY, M.A.; BYERS, S.W.; SUAREZ-QUIAN, C.A.; KLEINMAN, H.K. and DYM, M. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, Bethesda, USA, v.101, p.1511-1522, 1985.
- HANSSON, V.; CALANDRA, R.; PURVIS, K.; RITZEN, M. and FRENCH, F.S. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Vitamins and Hormones*, Orlando, USA, v.34, p.187-214, 1976.
- HARRISON, L.I. and CHRISTENSEN, H.N. Stimulation of differential effects on rats in membrane transport. *Journal of Theoretical Biology*, New York, USA, v. 49, p.439-459, 1975.
- HASHIMOTO, Y. Retinobenzoic acids and nuclear retinoic acids receptors. *Cell Structure and Function*, Kyoto, Japan, v.16, p.113-123, 1991.
- HOCH, F.L., Metabolic Effects of Thyroid Hormones. In: Greer, M.A. and Solomon, D.H. (eds.), *Handbook of Physiology*, section 7, vol. III, p.391, American Physiology Society, Washington, D.C., 1974.
- HOKIN, M.R. and HOKIN, L.E. Enzyme secretion and the incorporation of ³²P into phospholipids of pancreas slices. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.203, p.967- 977, 1953.
- HOKIN, L.E. and HOKIN, M.R. Effects of acetylcholine on the turnover of phosphoryl units in individual phospholipids of pancreas slices and brain cortex slices. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.18, p.102-110, 1955.
- HOLLENBERG, M.D. Action of insulin analogues on cultured human fibroblasts reflects biological potency, *Life Science*, New York, USA, v.18, p.521-527, 1976.
- HOSEY, M.M. and LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *Journal of Membrane Biology*, New York, USA, v.104, p.81-105, 1988.
- HUANG, H.F.S.; DYRENFURTH, I. and HEMBREE, W.C. Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A-induced recovery of spermatogenesis. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.112, p.1163-1171, 1983.

- HUANG, H.F.S.; GOULD, S. and BOCCABELLA, A.V. Modification of Sertoli cell functions in vitamin A - deficient rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, U.K., v.85, p.273-281, 1989.
- HUGGENVIK, J.I. and GRISWOLD, M.D. Retinol binding protein in rat testicular cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, U.K., v.61, p.403-408, 1981.
- HUGGENVIK, J.I.; IDEZERDA, R.L.; HAYWOOD, L.; LEE, D.C.; McKNIGHT, G.S. and GRISWOLD, M.D. Transferrin messenger ribonucleic acid: Molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.120, p.332- 340, 1987.
- HUGLY, S. and GRISWOLD, M. Regulation of levels of specific Sertoli cell mRNAs by vitamin A. *Developments in Biochemistry*, San Diego, USA, v.121, p.316-324, 1987.
- HUGLY, S.; ROBERTS, K. and GRISWOLD, M.K. Transferrin and sulfated glycoprotein-2 messenger ribonucleic acid levels in the testis and isolated Sertoli cells of hypophysectomized rats. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.122, p.1390-1396, 1988.
- HUHTANIEMI, I. and RITZÉN, E.M. Summary of the 6th european workshop on molecular and cellular endocrinology of the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.75, p.265-273, 1991.
- IGNARO, L.I.; LINT, T.F. and GEORGE, W.J. Hormonal control enzymes release from human neutrophils. Effects of genomic agents on enzyme release, phagocytosis, and cyclic nucleotid levels. *Journal Experimental Medical*, Philadlephia, USA, v.139, p.1395-1399, 1974.
- IRUSTA, O. and WASSERMANN, G.F. Factors influencing the uptake of [α - ^{14}C] aminoisobutyric acid by rat testes. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.60, p.463- 471, 1974.
- JAKUBOWIAK, A.; JANECKI, A. and STEINBERGER, A. Transferrin secretion in response to different modes of FSH stimulation and cycloheximide in superfused Sertoli cell cultures. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.9, p.390-396, 1988.
- JANECKI, A. and STEINBERGER, A. Polarized Sertoli cell functions in a new two-compartment culture system. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.7, p.69-71, 1986.
- JIA, X.C. and HSUEH, A.J.W. Sensitive in vitro bioassay for the measurement of serum follicle stimulating hormone. *Neuroendocrinology*, New York, USA, v.41, p.445-448, 1985.
- JOFFRE, M. and ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. *Journal of Physiology*, Bristol, Great Britain, v.400, p.481-499, 1988.

- JOST, A.; MAGRE, S. and AGELOUPOULOU, R. Early stages of testicular differentiation in the rat. In: *Human Genetic*, v.58, p.59-63, 1981.
- KARL, A.F. and GRISWOLD, M.D. Actions of insulin and vitamin A on Sertoli Cells. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, UK, 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*, Champaigne, USA, v.32, p.173-189, 1985.
- KIERSZENBAUM, A.L.; CROWELL, J.A.; SHABANOWITZ, R.B.; DePHILIP, R.M. and TRES, L.L. Protein secretory patterns of rat Sertoli and peritubular cells are influenced by culture conditions. *Biology of Reproduction*, Champaigne, USA, v.35, p.239-251, 1986.
- KILBERG, M.S.; CHRISTENSEN, H.N. and HANDLOGTEN, M.E. Cysteine as a system- specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, San Diego, USA, v.88, p.744-751, 1979.
- KING, R.J.B. Effects of steroid hormones and related compounds on gene transcription. *Clinical Endocrinology*, London, England, v.36, p.1-14, 1992.
- KLETZIEN, R.F.; PARRIZA, M.W.; BECKER, J.E.; POTTER, V.R. and BUTCHER, F.R. Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.251, p.3014-3020, 1976.
- KOENING, A.; GOLDSTONE, A. and LU, C.Y. Testosterone induces a rapid stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, USA, v.106, p.346-353, 1982.
- KOENING, A.; FAN, C.C.; GOLDSTONG, A. L; LU, C.Y. and TROUT, J.J. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. *Circulation Research*, New York, USA, v.64, p.415-426, 1989.
- KOESTER, J. Resting membrane potential and action potential. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. *Principles of Neural Sciences*, 3^a ed.; New York, Elsevier, 1991a, cap.5, p.49-57.
- KOESTER, J. Voltage-gated channels and the generation of the action potential. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. *Principles of Neural Sciences*, 3^a ed.; New York, Elsevier, 1991b, cap.8, p.75-86.
- KOSTYO, J.L. and SCHIMIDT, J.E. Inhibitory effects of cardiac glycosides and adrenal steroids on amino acid transport. *American Journal Physiology*, Bethesda, USA, v.204, p.1031-1038, 1963.

- LACROIX, M.; SMITH, F.E. and FRITZ, I.B. Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.9, p.227-236, 1977.
- LEBLOND, C.P., and CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York, USA, v.55, p.548-573, 1952.
- LE CAM, A and FREYCHET, P. Glucagon stimulates the A system for neutral amino acid transport in isolated hepatocytes of adult rat. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, San Diego, USA, v. 72, p.893-901, 1976.
- LE CAM, A. and FREYCHET, P. Neutral amino acid transport characterization of A and L systems in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 252, p.148-156, 1977.
- LE CAM, A. and FREYCHET, P. Effect of catecholamines on amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.102, p.379-385, 1978.
- LEE, V.W.K. and BURGER, H.G. Pituitary testicular axis during pubertal development. In: D.M. de Kretser; H.G, BURGER and B, HUDSON (eds) *The Pituitary and Testis* (Monographs on Endocrinology N°. 25), 1983, Springer-Verlag, Berlin, p.44-70.
- LEE, N.T.; CHAE, C.B. and KIERSZENBAUM, A.L. Contrasting levels of transferrin gene activity in cultured rat Sertoli cell and intact seminiferous tubules. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, Washington, USA, v.83, p.8177-8188, 1986.
- LEIDL, W. and HANSEL, W. Longitudinal growth of the seminiferous tubules in rats and its hormonal control. *Advances in the Biosciences*, Bethesda, USA, v. 10, p.117- 125, 1972.
- LERNER, J. Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Bristol, Great Britain, v.81A, p. 713-739, 1985.
- LISON, L. *Histochemie et cytochemie animals*. Paris, Gauthier-Villars, p. 607, 1960.
- LLINAS, R.R.; SUGIMORI, M. and CHERKSEY, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons: the P channel. *Annals of the New York Academy Sciences*, New York, New York, USA, v.560, p.103-111, 1989.
- LOBITZ, C.J. and NEVILLE, M.C. Control of amino acid transport in the mammary gland of the mouse. *Journal Supramolecular Structure*, Philadelphia, USA, v.6, p.355-362, 1977.
- LONG, C. ed. Chemical Data. In: *Biochemist's Handbook*. New Jersey, D. Van Nostrand, cap.1, p.85, 1961.

- LÓPEZ, M.G.; VILLAROYA, M.; LARA, B.; SIERRA, R.M.; ALBILLOS, A.; GARCIA, A.G. and GANDIA, L. Q-and L-type calcium channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS LETTERS*, Amsterdam, Netherlands, v.349, p.331-337, 1994.
- 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.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.193, p.265-275, 1951.
- MAO, Y.; GURR, J.A. and HICKOK, N.J. Retinoic acid regulates ornithine decarboxylase gene expression at the transcriptional level. *Biochemical Journal*, Colchester Essex, Great Britain, v.295, p.641-644, 1993.
- MARCUM, J.M.; DEDMAN, J.R.; BRINKLEY, B.R. and MEANS, A.R. Control of microtubule assembly-disassembly by Ca^{++} -dependent regulator protein. *Proceedings National Academy Science*, Washington, USA, v.75, p.3771-3775, 1978.
- MATTHEWS, R.M. and ZAND, R. Basis for substrate preference of amino acid transport system L over amino acid transport system A. *Biochemistry*, Washington USA, v. 16, p.3820-3824, 1977.
- MATHER, J.P.; ZHUANG, L.Z.; PEREZ-INFANTE, V. and PHILLIPS, D.M. Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium. *Annals New York Academy Sciences*, New York, USA, v. 383, p.44-69, 1982.
- Mc CARTHY, R.T.; ISALES, C.M.; BOLLAG, W.B.; RASMUSSEN, H. and BARRET, P.Q. Atrial natriuretic peptide differentially modulates T- and L-type calcium channels. *American Journal Physiology*, Bethesda, USA, v.28, p.F473-F478, 1990.
- Mc GIVAN, J.D.; BRADFORD, N.M. and MENDES-MOURÃO, J. The transport of branched-chain amino acids into isolated rat liver cells. *FEBS LETTERS*, Amsterdam, Netherlands, v.80, p.380-384, 1977.
- MEANS, A.R.; DEDMAN, J.R.; TASH, J.S.; TINDALL, D.S.; VAN SICKLE, M. and WELSH, M.J. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle-stimulating hormone. *Annual Review of Physiology*, Baltimore, USA, v.22, p.59-70, 1980.
- MEANS, A.R.; FAKUNDING, J.L.; HUCKINS, C.; TINDALL, D.J. and VITALE, R. Follicle stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, Orlando, USA, v.32, 477-527, 1976.
- MEYERS, S.A. and SWANSON, L.W. The effect of exogenous follicle-stimulating hormone treatment on anterior pituitary and testicular function in the prepubertal bull. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.6, p.371-377, 1983.

- MILLS, T.M. and FEIT, E.I. Amino acid transport in follicles isolated from the rabbit ovary. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.99, p. 1597-604, 1976.
- MILLS, N.C.; MILLS, T.M and MEANS, A.R. Morphological and biochemical changes which occur during postnatal development and maturation of the rat testis. *Biology of Reproduction*, Champaign, USA, v.17, p.124-130, 1977.
- MOORE, P.A; JAYME, D.W. and OXENDER, D.L. A role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of amino acid transport in mammalian cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.252, p.7427-7430, 1977.
- MILLARD, R.W.; GRUPP, G.; GRUPP, I.L.; DiSALVO, J. DePOVER, A. and SCHWARTZ, A. Chronotropic, inotropic, and vasodilator actions of diltiazem, nifedipine, and verapamil. *Circulation Research*, New York, USA, v.52 (suppl I), p.29-39, 1983.
- MITRANOND, V.; SOBHON, P.; TOSUKHOWONG, P. and 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.
- MONACO, L.; ADAMO, S. and CONTI, M. Follicle-stimulating hormone modulation of phosphoinositide turnover in the immature rat Sertoli cell in culture. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.123, p.2032-2039, 1988.
- MULDER, E.; PETERS, M.J.; vanBEURDEN, W.M.O.; GALDIERI, M.; ROMMERTS, F.F.G.; JANSZEN, F.H.A. and van der MOLEN, H.J. Androgen receptors in isolated cell preparation obtained from rat testicular tissue. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.70, p.331-332, 1976.
- NAPOLI, J.L. and RACE, K.R. The biosynthesis of retinoic acid from retinol by rat tissues "in vitro". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, USA, v.255, p.95-101, 1987.
- NEMERE, I. and NORMAN, A. Steroid hormone action at the plasma membrane: induced calcium uptake and exocytotic events. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.80, p.C165-C169, 1991.
- NISHIZUKA, Y.; TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; KIKKAWA, U. and KAIBUCHI, K. Phospholipid turnover in hormone action. *Recent Progress in Hormone Research*, Orlando, USA, v.40, p.301-341, 1984.
- NOY, N. and XU, Z. Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells. *Biochemistry*, Washington, USA, v.29, p.3878-3883, 1990.
- NY, T.; BJERSING, L.; HSUEH, A.J.W. and LOSKUTOFF, D.J. Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differentially by gonadotropins. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.116, p.1666-1668.

- O'DONNELL, M.E.; OWEN, N.E. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiological Reviews*, Bethesda, USA, v. 74, p. , 1994.
- OONK, R.B.; GROOTEGOED, J.A. and van der MOLEN, H.J. Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.42, p.39-48, 1985.
- OONK, R.B and GROOTEGOED, J.A. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Molecular an Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.55, p.33-43, 1988.
- ORTH, J. and CHRISTENSEN, A.K. Autoradiographic localization of specifically bound ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.103, p.1944-1948, 1978.
- ORTH, J.M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.115, p.1248-1255, 1984.
- OSTERMAN, J.; MURONO, E.P.; LIN, T. and NANKIN, H.R. Regulation of ornithine decarboxylase *in vitro*. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.4, p.175-182, 1983.
- OXENDER, D.L. and CHRISTENSEN, H.N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acid by the Ehrlich cell. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.238, p.3686-3699, 1963.
- OZZA, N.; MEANOCK, S.J. and DAVIES, A.G. Stimulation of transport of aminoisobutyric acid into the testis of immature mice by follicle-stimulating hormone. *Acta Endocrinologica, Berlin*, Germany, v.100, p.137-142, 1982.
- PADMANABHAN, V.; CHAPPEL, S.C. and BEITINS, I. An improved in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH): suitable for measurements of FSH in unextracted human serum. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.121, p.1089-1098, 1987.
- PAPADOPOULOS, V.; KAMTCHOUING, P.; DROSDOWSKY, M.A.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. and CARREAU, S. Adult rat Sertoli cells secrete a factor or factors with modulate Leydig cell function. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.114, p.459- 467, 1987.
- PARVINEN, M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocrine Reviews*. Baltimore, USA, v.3, p.404-417, 1982.
- PEARSE, A. G. E. *Histochemistry, theoretical and applied*. v.1, London, Churchill Livingstone, p. 1759, 1968.
- PELCZAR, M.J.; REID, R. and CHAN, E.C.S. Cultivo das bactérias. In: *Microbiologia*. vol.1, p.111-126, McGraw-Hill. São Paulo, 1980.

- PELLINIEMI, L.J. and DYM, M. The fetal gonad and sexual differentiation. In: D. Tulchisky and K. Ryan, (eds). *Fetal - Maternal Endocrinology*, w.b. Saunders and Company, Philadelphia, USA, 1980 p.252-280.
- PEREZ-SANCHES, V.H. and WASSERMANN, G.F. Amino acid transport in rat Sertoli cell enriched testes: studies on the mechanism of action of follicle stimulating hormone. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, Brasil, v.14, p.11-17, 1981.
- PETERSEN, O.H. and FINDLAY, I. Electrophysiology of the pancreas. *Physiological Reviews*, Bethesda, USA, v.67, p.1054-1116, 1987.
- PETKOVICH, M.; BRAND, N.J.; KRUST, A. and CHAMBON, P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, Hampshire, U.K., v.330, p.444-450, 1987.
- PORTER, S.B.; ONG, D.E.; CHYTIL, F. and ORGBIN-CRIST, M.C. Localization of cellular retinol binding protein in the testis and epididymis. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v.6, p.197-212, 1985.
- PRENTKI, M. and RENOLD, A.E. Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islet. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.23, p.14239-14244, 1983.
- QUIRK, S.M. and REICHERT, L.E. Jr. Regulation of the phosphoinositide pathway in cultured Sertoli cells from immature rats: Effects of follicle-stimulating hormone and fluoride. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.123, p.230-237, 1988.
- RANDOLPH, R.K. and ROSS, A.C. Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG₂ cells by exogenous fatty acids. *Journal of Lipids Research*, Bethesda, USA, v.32, p.809-820, 1991.
- RAO, A.J. and RAMACHANDRAN, J. Cyclic AMP production in isolated rat seminiferous tubule cell preparations: A potential in vitro assay for follicle stimulating hormone. *Life Science*, New York, USA, v.117, p.411-416, 1975.
- RATHNAM, P and SAXENA, B.B. Primary amino acid sequence of FSH from human pituitary glands. I. α -subunit. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.250, p.6735, 1975.
- RICH, K.A.; BARDIN, C.W.; GUNSALUS, G.L. and MATHER J.P. Age-dependent pattern of androgen-binding protein secretion from rat Sertoli cell in primary culture. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.113, p. 2284-2293, 1983.
- RICHARDS, C.D. and HESKETH, T.R. Implications for theories of anesthesia of antagonism between anaesthetic and non-anaesthetic steroids. *Nature*, Hampshire, U.K., v.256, p.179-181, 1975.

- RIGGS, T.R. and McKIRAHAN, K.J. Action of insulin on transport of L-alanine into the diaphragm in vitro. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.247, p.6450-6455, 1973.
- RILLEMA, J.A.; GOLDEN, K. and JENKINS, M.A. Effect of prolactin on α -aminoisobutyric acid uptake in mouse mammary gland explants. *American Journal Physiology*, Bethesda, USA, v.262, p.E402-E405, 1992.
- ROBERTS, K. and GRISWOLD, M.D. Testosterone induction of cellular protein in cultured Sertoli cells from hypophysectomized rats and rats of different ages. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.125, p.1174-1179, 1989.
- ROBERTSON, D.M.; FOULDS, L.M. and ELLIS, S. Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofusing: differences between sexes and after castration. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.111, p.385-391, 1982.
- ROMEIS, B. *Guia Formulário de Técnica Histológica*. 11 ed., Barcelona, Labor, 1928.
- ROMMERTS, F.F.G.; KRUGER-SEWNARAIN, B.Ch.; WOERKOM-BLIK van A.; GROOTEGOED, J.A. and 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 secretion of oestradiol and androgen binding protein. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdam, Netherlands, v.10, p.39-55, 1978.
- ROMMERTS, F.F.G. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? *Journal of Endocrinology*, Bristol, UK, v. 116, p. 7-9, 1988.
- ROMMERTS, F.F.G. Cell surface actions of steroids: A complementary mechanism for regulation of spermatogenesis? *Shering Foundation Workshop 4*. Springer-Verlag (eds. E. Nieschlag, V.F. Habenicht, p.1-19, 1992.
- RUSSEL, L.D. and PERTERSON, R.N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, San Diego, USA, v. 94, p.177-211, 1985.
- RUSSEL, L.D.; ALGER, L.E. and NEQUIN, L.G. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.120, p. 1204, 1987.
- SAR, M., S. HALL, E. WILSON and F. FRENCH. Androgen regulation of Sertoli Cell. In: L.D. Russell and M.D. Griswold, eds. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, 1993, Clearwater, Florida, p. 509-516.
- SEGAL, J. and GORDON, A. The effects of actinomycin D, puromycin, cycloheximide and hydroxyurea on 3',5,3-triiodo-L-thyronine stimulated 2-deoxy-D-glucose uptake in chick embryo heart cells in vitro. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.101, p.150-156, 1977.
- SEGAL, J. and INGBAR, S.H. An immediate increase in calcium accumulation by rat thymocytes induced by triiodothyronine: its role in the subsequent metabolic response. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.116, p.160-166, 1984.

- SEGAL, J. Adrenergic inhibition of the stimulatory effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium accumulation and cytoplasmic free calcium concentration in rat thymocytes. Further evidence in support of the concept that calcium serves as the first messenger for prompt action of thyroid hormone. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.116, p.2240-2248, 1988.
- SEGAL, J.; HARDMAN, J. and INGBAR, S.H. Stimulation of calcium-ATPase activity by 3,5,3'-tri-iodothyronine in rat thymocyte plasma membranes. *Biochemistry Journal*, Colchester Essex, Great Britain, v.261, p.749-754, 1989.
- SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-Triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: Evidence for a physiological role calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrana. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.127, p.17-24, 1990.
- SETCHELL, B.P. Do the Sertoli cells secrete the rete testis fluid?. *Journal of Reproduction and Fertility*, Oxford, v. 19, p.391, 1960.
- SHEN, S.T. and YU, Y.L.. A rapid and sensitive in vitro bioassay of follicle stimulating hormone: Estradiol-17 β formation by dispersed seminiferous tubule cells from immature rats. *Zoological Science, Tokyo*, Japan, v.8, p.733-742, 1991.
- SHERIDAN, P.J. At the Cutting Edge. Can a single androgen receptor fill the bill? *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Ireland, v.76, p.C39-C45, 1991.
- SHINGLETON, J.L.; SKINNER, M.K. and ONG, D.E. Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells. *Biochemistry*, Washington, U.S.A., v.28, p.9641-9647, 1989.
- SHOTWELL, M.A.; JAYME, D.W.; KILBERG, M.S. and OXENDER, D.L. Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.256, p.5244-5247, 1981.
- SHOTWELL, M.A.; MATTES, P.M.; HAYME, D.W. and OXENDER, D.L. Regulation of amino acid transport system L in chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.257, p.2974-2980, 1982.
- SHOTWELL, M.A.; KILBERG, M.S. and OXENDER, D. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochimica e Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, v.737, p.267-284, 1983.
- SICKLE, M.V.; OBERWETTER, J.M.; BIRNBAHMER, L.; MEANS, A.R. Developmental changes in the hormonal regulation of rat testis Sertoli cell adenylyl cyclase. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.109, p.1270-1280, 1981.
- SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. *Journal Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.255, p.9523, 1980.

- SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. Hormonal regulation of transferrin synthesis in cultured Sertoli cells. *Journal of Cell Biology, Bethesda USA*, v.91, p.191a, 1981.
- SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biology of Reproduction*, Champaign, USA, v.27, p.211-221, 1982.
- SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, v. 28, p.1225, 1983.
- SKINNER, M.K. and FRITZ, I.B. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proceeding National Academic Science*, Washington, USA, v.82, p.114-118, 1985.
- SKINNER, M.K.; NORTON, J.N.; MULLANEY, B.P.; ROSSELLI, M.; WHALWY, P.D. and ANTHONY, C.T. Cell-cell interactions and regulation of testis function. *Annals of New York Academy of Sciences, New York, USA*, v.637, p. 354-363, 1991.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interaction in the testis. *Endocrine Reviews*, Baltimore, USA, v.12, p.45- 77, 1991.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN W.G.: Correlation. In: *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, USA, p.172-195, 1973.
- SOKAL, R.R and ROHLF, S.F. (eds) In: Freeman, W.H. and Company Champaign, *Biometrics*, San Francisco, USA, 1969. p.204-252 and 299-342.
- SOLARI, A.J. and FRITZ, I.B. The ultrastructure of immature Sertoli cells. Maturation-like changes during culture and the maintenance of mitotic potentiality. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, v.18, p.329-345, 1978.
- SPEDDING, M. and PAOLETTI. III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, USA, v.44, p.363-376, 1992.
- SPRITZER, P.M. and WASSERMANN, G.F. Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. *Hormone and Metabolic Research*, New York, USA, v.17, 237-240, 1985.
- STEINAPIR, J.; SOCCI, R.; REINACH, P. Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochemical Biophysical Research Communication*, Dan Diego, USA, v.179, p.90-96, 1991.
- STEINBERGER, E.; STEINBERGER, A and PERLOFF, W.H. Studies on the growth in organ culture of testicular tissue from rats of various ages. *Anatomical Record*, New York, USA, v.148, p.581-589, 1964.
- STEINBERGER, E. Biogenesis of androgens. In: Gibian H; Plotz E.J.(eds.): *Mammalian Reproduction*, Heidelberg, Springer, p.112-140, 1970.

- STEINBERGER, E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiological Reviews*, Bethesda, USA, USA, v.51, p.1-22, 1971.
- STEINBERGER, A and STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cell in maturing rat testes *in vivo* and in organ culture. *Biology of Reproduction*, Champaign, USA, v.4, p.84- 87, 1971.
- STEINBERGER, E.; ROOT, A.; FICHER, M. and SMITH, K.D. The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Baltimore, USA, v.37, p.746, 1973.
- STEINBERGER, A.; HEINDEL, J.J.; LINDSEY, J.N.; ELKINGTON, J.S.H.; SANBORN, B.M and STEINBERGER, E. Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells. *Endocrine Research Communications*, Baltimore, USA, v. 2, p.261-272, 1975.
- STEINBERGER, A.; HINTZ, M. and HEINDEL, J.J. Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biological of Reproduction*, Champaign, USA, v.19, p.566-572, 1978.
- STEINBERGER, E. and STEINBERGER, A. Hormonal control of spermatogenesis. *Endocrinology*, v.3., p.2132-2136, 1989. In: De Groot L.J. (ed.), Philadelphia.
- SUN, Y.T.; IRBY, D.C.; ROBERTSON, D.M. and KRETZER, D.M. The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v.125, p.1000-1010, 1989.
- SZUTS, E.Z. and HAROSI, F.I. Solubility of retinoids in water. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, USA, v.287, p.297-304, 1991.
- TAN, K.N. and TASHJIAN jr, A.H. Voltage-dependente calcium channels in pituitary cells in culture. I. Characterization by Ca^{++} fluxes. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.259, p.418-426, 1984a.
- TAN, K.N. and TASHJIAN, A.H. Jr. Voltage-dependent calcium channels in pituitary cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.259, p.427-434, 1984b.
- TASH, J.S.; DEDMAN, J.R. and MEANS, A.R. Protein kinase inhibitor in Sertoli cell-enriched rat testis. Specific regulation by follicle-stimulating hormone. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v.254, p.1241-1247, 1979.
- TEERDS, K.J.; ROMMERTS, F.F.G.; ROOIJ, D.G.; STOCCO, D.M.; COLENBRANDER, B; WENSING, C.J.G. and HENNEN, G. Effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v. 120, p.97- 106, 1989.

- TEWS, J.K.; WOODCOCK, N.A. and HARPER, A.E. Stimulation of amino acid transport in rat liver slices by epinephrine, glucagon and adenosine 3', 5' monophosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, USA, v. 245, p.3026-3032, 1970.
- THOMPSON, J.N.; HOWELL, J. and PITT, G.A. Vitamin A and reproduction in rats. *Proceedings of Royal Society of London B.*, Bristol, Great Britain, v. 159, p.510-535, 1964
- TOEBOSCH, A.M.W.; ROBERTSON, D.M.; KLAIJ, I.A.; JONG, F.H. and GROOTEGOED, J.A. Effects of FSH and testosterone on highly purified rat Sertoli cell: inhibin α -subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH not by testosterone. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.122, p.757- 762, 1989.
- TOPPARI, J. and PARVINEN, M. *In vitro* differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle: morphologic and immunolocalization analysis. *Journal of Andrology*, Philadelphia, USA, v. 6, p.334-343, 1985.
- TRIGGLE, D.J. and SWAMY, V.C. Calcium antagonists. Some chemical-pharmacological aspects. *Circulation Research*, New York, USA, v.52 (suppl I), p.17-28, 1983.
- TUNG, P.S.; BURDZY, K. and FRITZ, I.B. Proteases are implicated in the changes in the Sertoli cell cytoskeleton elicited by follicle-stimulating hormone or by dibutyryl cyclic AMP. *Journal of Cellular Physiology*, Baltimore, USA, v.155, p.139-148, 1993.
- TUNG, P.S.; SKINNER, M.K. and FRITZ, I.B. Fibronectin synthesis is a marker of peritubular cell contaminants in Sertoli cell-enriched cultures. *Biology of Reproduction*. Champaign, USA, v.30, p.199-211, 1984.
- ULTEE-van GESSEL, A.M.; TIMMERMAN, M.A. and JONG, F.H. Effects of treatment of neonatal rats with highly purified FSH alone and in combination with LH on testicular function and endogenous hormone levels at various ages. *Journal of Endocrinology*, Bristol, Great Britain, v.116, p.413-420, 1988.
- VAN DAMME, M.P.; ROBERTSON, D.M.; MARANA, R.; RITZEN, E. and DICZFALUSY, E. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinologica*, Baltimore, USA, v.91, p.224-237, 1979.
- WAITES, G.M.H.; SPEIGHT, A.C. and JENKINS, N. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, Reading, U.K, 1985.
- WAITES, G.M.H. Fluid secretion. In: Johnson, A., Gomes w. (eds). *The Testis*. 1977, vol.4, Academic Press, New York, 91-123.

- WANG, C. and LEUN, G. Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology*, Baltimore, USA, v. 112, p.1201-1207.
- WARREN, D.W.; HUHTANIEMI, I.T.; TAPANAIMEN, J.; DUFAU, M.L. and C
Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis.
Endocrinology, Baltimore, USA, v.114, p.470-476, 1984.
- WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.;
LOSS, E.S. and McCONNEL, L.L. Biochemical actors in involved in the FSH
action on amino acid transport in immature rat testes. *Hormone and Metabolic
Research*, New York, USA, v.24, p.276- 279, 1992 a.
- WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.;
SILVA.; LOSS, E.S and McCONNEL, L.L. Electrophysiological changes of Sertoli
cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Hormone and
Metabolic Research*, New York, USA, v.24, p.326-328, 1992 b.
- WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; McCONNEL, L.L. and GRILLO, M.L.
FSH- induced rapid hiperpolarisation followed by a Ca^{++} channel-mediated
depolarization in rat Sertoli cells. *Medical Science Research*, London, England, v.18,
p.175- 176, 1990.
- WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B. and GRILLO, M.L. Role of microtubules
and protein synthesis on the stimulatory action of FSH on amino acid uptake in rat
testes. *Medical Science Research*, London, England, v.17, p.737-738, 1989a.
- WASSERMANN, G.F.; FAUTH, M.G. and MACHADO, V.L.A. Insulin action on
amino acid uptake by rat adrenal glands "in vitro". *Medical Science Research*,
London, England, v.17, p.675-676, 1989b.
- WASSERMANN, G.F. and LOSS, E.S. Effect of a calcium channel blocker, verapamil,
on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes. *Medical Science
Research*, London, England, v.17, p.779-780, 1989.
- WIEB, J.P. and WOOD, P.H. Selective suppression of follicle-stimulating hormone by
3- hydroxy-4-pregnen-20-one, a steroid found in Sertoli cells. *Endocrinology*,
Baltimore, USA, v.120, p.2259-2264, 1987.
- WILSON, R.M. and GRISWOLD, M.D. Secreted proteins from rat Sertoli cells.
Experimental Cell Research, San Diego, USA, v.123, p.127-135, 1979.
- WINTER, C.G. and CHRISTENSEN, H.N. Contrasts in neutral amino acid transport by
rabbit erythrocytes and reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda,
USA, v.240, p. 3594-3600, 1965.
- WOLF, G. Recent progress in vitamin A research: nuclear retinoic acid receptor and
their interaction with gene elements. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham,
USA, v.1, p.284-289, 1990.

- WONG, B.S.; LECAR, H. and ADLER, M. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Biophysical Journal*, New York, USA, v.39, p.313- 317, 1982.
- WOOL, I.G. Corticosteroids and accumulation of ¹⁴C-labeled amino acids and histamine by isolated rat diaphragm. *American Journal of Physiology*, Bethesda, USA, v. 199, p. 715- 718, 1960.
- YING, S.Y. Inhibins, activins, and follistatins: Gonadal proteins modulating the secretion of Follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, Baltimore, USA, v.9, p.267- 294, 1988.